

FIA-PI-C-2003-1-D-151

Informe Técnico Final

Proyecto: "Diversificación de la actividad salinera mediante el cultivo semi-intensivo del crustáceo *Artemia* para la producción de quistes en la localidad de La Villa, Pichilemu, VI Región"

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	17 ABR 2007
Hora	11:25
N° Ingreso	17:43

Código FIA-PI-C-2003-1-D-151

17 de Abril de 2007

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Item	Contenido	Pag.
	Antecedentes Generales	1
I.	Resumen ejecutivo	2
II.	Texto Principal	3
	1. Objetivos del proyecto.....	3
	2. Metodología.....	4
	2.1. Construcción de laboratorio.....	4
	2.2. Equipamiento de Laboratorio.....	4
	2.3. Desbarrado de calles y canales.....	4
	2.4. Modificación de estanques.....	5
	2.5. Llenado de corralones y estanques.....	5
	2.6. Monitoreo de variables abióticas.....	6
	2.7. Caracterización de la cepa local de <i>Artemia</i>	6
	2.8. Obtención de quistes para inoculación.....	10
	2.9. Gira tecnológica a Salinas de Grossos (Brasil).....	10
	2.10. Cultivo de microalgas en laboratorio.....	11
	2.11. Fertilización de estanques.....	11
	2.12. Seguimiento del desarrollo algal	12
	2.13. Decapsulación y eclosión de quistes.....	13
	2.14. Evaluación de quistes.....	13
	2.15. Transporte e inoculación de nauplios	14
	2.16. Monitoreo de la población de <i>Artemia</i>	15
	2.17. Construcción de tamices	15
	2.18. Construcción de secadores	16
	2.19. Montaje de ensayo en Osorno.....	17

2.20. Monitoreo (ensayo Osorno).....	18
2.21. Recolección de quistes.....	18
2.22. Limpieza de quistes.....	18
2.23. Secado de quistes.....	19
2.24. Evaluación del tiempo de deshidratado en salmuera sobre el contenido de humedad y porcentaje de eclosión de quistes.....	20
2.25. Almacenamiento de quistes.....	20
2.26. Cosecha de biomasa.....	21
2.27. Procesamiento de biomasa.....	21
2.28. Prueba de empaque de quistes y biomasa.....	22
2.29. Pruebas de secado de quistes.....	22
2.30. Pruebas de secado de biomasa.....	23
2.31. Cosecha de sal.....	23
2.32. Contacto con eventuales compradores.....	24
2.33. Prueba de cultivo de <i>Artemia</i> durante el invierno.....	24
2.34. Difusión.....	25
2.35. Movimiento de tierra.....	25
2.36. Validación de modelo predictivo de producción de quistes.....	26
3. Actividades del proyecto.....	26
4. Resultados.....	33
1. Modificación de estanques.....	33
2. Llenado de corralones y estanques.....	34
3. Monitoreo de variables abióticas.....	35
4. Caracterización de la cepa local de <i>Artemia</i>	39
4.1. Análisis morfológico.....	39
4.2. Análisis cariológico.....	40
4.3. Análisis electroforético.....	44
4.4. Análisis morfométrico de quistes y nauplios de <i>Artemia</i>	45
4.5. Análisis electroforético y molecular.....	47
5. Obtención de quistes para inoculación.....	55
6. Gira tecnológica a salinas de Grossos (Brasil).....	55
7. Cultivo de microalgas en laboratorio.....	57
8. Fertilización de estanques.....	57
9. Seguimiento del desarrollo algal.....	58
10. Decapsulación y eclosión de quistes.....	60
11. Evaluación de quistes.....	61
12. Transporte e inoculación de nauplios.....	63
13. Monitoreo de la Población de <i>Artemia</i>	63

14. Construcción de tamices.....	69
15. Monitoreo de ensayo (Osorno).....	70
16. Recolección de quistes.....	73
17. Limpieza de quistes.....	81
18. Secado de quistes.....	81
19. Almacenamiento de quistes.....	82
20. Evaluación del tiempo de deshidratado en salmuera sobre el contenido de humedad y porcentaje de eclosión de quistes.....	82
21. Cosecha de biomasa.....	84
22. Procesamiento de biomasa.....	85
23. Pruebas de secado de biomasa.....	85
24. Pruebas de empaque para quistes y biomasa.....	88
25. Cosecha de sal.....	89
26. Contacto con eventuales compradores.....	89
27. Prueba de cultivo de <i>Artemia</i> durante el invierno.....	90
28. Movimiento de tierra.....	91
29. Validación de modelo predictivo de producción de quistes.....	91
5. Fichas Técnicas y Análisis Económico.....	92
5.1. Ficha técnica de la especie.....	92
5.2. Ficha técnica del producto (quistes).....	93
5.3. Ficha técnica del producto (biomasa).....	94
5.4. Protocolo para decapsulación de quistes.....	95
5.5. Análisis de perspectiva del rubro.....	96
5.6. Modelo de negocios.....	96
5.7. Competencia.....	98
5.8. Estrategia de comercialización.....	100
.....	

6.	Impactos y logros del proyecto.....	106
	6.1. Impactos científico-tecnológicos	106
	6.2. Impactos tecnológicos	106
	6.3. Impactos sociales y otros	107
7.	Problemas enfrentados.....	108
	7.1. Técnicos.....	108
	7.2. Administrativos.....	110
	7.3. Gestión.....	111
8.	Conclusiones y Recomendaciones.....	111
	1. Aspectos Técnicos.....	111
	
	2. Aspectos Económicos.....	113
	
	3. Aspectos de Gestión.....	114
III.	Informe de Difusión.....	115
IV.	Anexos.....	117
	I Informe de Visita a Terreno (Enero 2004).....	117
	II Eclosión de quistes de Artemia de la Bahía de San Francisco.....	123
	III Efecto de la salinidades la producción de quistes de la Bahía de San Francisco y La Villa.....	129
	IV Certificado de calidad de quistes (2004). ARC, Universidad de Gante.....	134

V Experiencia de liofilización de biomasa de Artemia.....	135
VI Certificado de calidad de quistes (2005). ARC, Universidad de Gante.....	139
VII Análisis proximal de biomasa deshidratada por calor. ARC, Universidad de Gante.....	140
VIII Análisis proximal de biomasa liofilizada. ARC, Universidad de Gante.....	141
IX Evaluación del tiempo de permanencia en salmuera sobre el contenido de humedad en quistes.....	142
X Análisis genético de Artemia utilizando ADN (RFLP).....	148
Bibliografía.....	156

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Contenido	Pag.
Tabla 1. Lista de especies de <i>Artemia</i> utilizadas en este estudio incluyendo la localidad, abreviación y país de origen.....	8
Tabla 2. Lista de enzimas y buffers usados en electroforésis de <i>Artemia</i>	9
Tabla 3. Tareas ejecutadas durante el periodo comprendido entre noviembre de 2003 y junio de 2004.....	28
Tabla 4. Tareas ejecutadas entre junio de 2004 y octubre de 2004.....	29
Tabla 5. Tareas ejecutadas entre octubre de 2004 y abril de 2005.....	30
Tabla 6. Tareas ejecutadas entre mayo y septiembre de 2005.....	31
Tabla 7. Tareas ejecutadas entre octubre de 2005 y julio de 2006.....	31
Tabla 8. Determinación del número cromosómico en tres poblaciones de <i>Artemia</i>	41
Tabla 9. Resumen determinación del número de cromocentros en tres poblaciones de <i>Artemia</i>	42
Tabla 10. Diámetro de los quistes de <i>Artemia</i> y longitud total de la larva instar I.....	46

Tabla 11. Frecuencias alélicas y resumen de estimaciones de variabilidad genética de 21 poblaciones de <i>Artemia</i>	49
Tabla 12. Matriz de distancia (bajo la diagonal) y/o identidad genética de Nei (sobre la diagonal).....	52
Tabla 13. Diversidad de haplotipos de <i>Artemia</i> generados de la secuencias de un fragmento de 588bp de la subunidad de la citocromo oxidasa c.....	53
Tabla 14. Registro de la temperatura, salinidad, tiempo incubación (horas) y eficiencia eclosión (%) de <i>Artemia</i> durante la decapsulación-eclosión realizadas para la inoculación en la salina.....	61
Tabla 15. Contenido de ácidos eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA) en nauplios de <i>Artemia</i> recién eclosionados.....	62
Tabla 16. Porcentajes de eclosión de muestras de quistes de las dos temporadas productivas, analizados en el ARC (Bélgica).....	62
Tabla 17. Características cualitativas de los quistes de <i>Artemia</i> de PIC.....	63
Tabla 18. Valores promedio del porcentaje de machos, hembras, hembras con quistes y hembras con larvas para cada estanque por mes.....	64
Tabla 19. Condición reproductiva de las hembras (%) en el estanque CT1 y CT2 durante el periodo de estudio; hembras (H), hembras con quistes (H c/Q) y hembras con larvas (H c/L).....	65
Tabla 20. Condición reproductiva de las hembras (%) en el estanque CT3 y PT1 durante el periodo de estudio; hembras (H), hembras con quistes (H c/Q) y hembras con larvas (H c/L).....	65
Tabla 21. Valores promedio del porcentaje de machos, hembras, hembras con quistes y hembras con larvas para cada estanque por mes con respecto a la población de adultos para la temporada 05-06.....	66
Tabla 22. Condición reproductiva de las hembras (%) en el estanque CT1 y CT2 durante el periodo 2005-2006 para el total de la población; hembras (H), hembras con quistes (H c/Q) y hembras con larvas (H c/L).....	67

Tabla 23. Condición reproductiva de las hembras (%) en el estanque CT3 y PT1 durante el periodo 2005-2006 para el total de la población; hembras (H), hembras con quistes (H c/Q) y hembras con larvas (H c/L).....	67
Tabla 24. Descendencia de <i>Artemia</i> de las cepas San Francisco USA y La Villa (Chile) a distintas salinidades experimentales.....	71
Tabla 25. Análisis de Varianza del efecto de la salinidad en la generación de descendientes enquistados en la cepa de <i>Artemia</i> de la Bahía de San Francisco (USA) y de La Villa (Chile). * Significativo (P< 0,05)	71
Tabla 26. Análisis de varianza del efecto de las salinidades experimentales en el número total de descendientes para las poblaciones PIC y SFB.....	72
.....	
Tabla 27. Test <i>a posteriori</i> Tukey del análisis de varianza del efecto de las salinidades experimentales en el número total de descendientes en las poblaciones de PIC y SFB.....	73
Tabla 28. Producción de quistes para la temporada 2005-2006. B+M: total quistes cosechados (peso húmedo) periodo 2005-2006; B: producción final en gramos peso seco; PC: % de pérdidas por condición y PH: % pérdidas por humedad.....	80
Tabla 29. Rendimiento (%) de los grupos de quistes colectados para el periodo comprendido entre febrero y abril de 2005 en las salinas de la villa.....	82
Tabla 30. Porcentaje y eficiencia de eclosión a las 24, 48 y 72 h de quistes de <i>Artemia</i> almacenados post-cosecha en contenedores durante 1, 2, 3, 4 y 5 semanas en salmuera durante el periodo 2005-2006.....	83
Tabla 31. Análisis de varianza del efecto de la permanencia de los quistes en salmuera sobre el porcentaje de humedad de los quistes <i>Artemia</i>	84
Tabla 32. Test <i>a posteriori</i> test a Tukey del efecto de la permanencia de los quistes de <i>Artemia</i> en salmuera durante distintos periodos de tiempo.....	84
Tabla 33. Biomasa de <i>Artemia</i> : Registro del proceso de liofilización temporada 2004-2005.....	87

Tabla 34. Tabla de productos obtenidos en el cultivo de <i>Artemia</i> y sus precios.....	101
Tabla 35. Flujo de caja desagregado por ítem	103
Tabla 36. Continuación flujo de caja desagregado por ítem	104
Tabla 37. Flujo de caja que incluye T.I.R. y V.A.N.	105
Figura 1. Modificaciones realizadas a los estanques durante la temporada 2003-2004 para el cultivo de <i>Artemia</i> . CT: estanque profundizado en el eje transversal; PT: estanque profundizado perimetralmente; CL: Estanque profundizado en el eje longitudinal.....	5
Figura 2. Medición quistes y larvas de <i>Artemia</i> . A. Calibración del Ocular graduado; B. Medida de diámetro de los quistes; C. Medida longitud de larva Instar I.....	9
Figura 3. Estanque recubierto con mangas de polietileno de 4 m de ancho traslapadas, y sellada con cinta para impermeabilización de tuberías.....	34
Figura 4. Muestra las salinidades y temperaturas semanales promedio durante el periodo productivo 2003-2004.....	34
Figura 5. Muestra salinidades y temperaturas promedio registradas en las unidades de cultivo durante la temporada 2004-2005.....	36
Figura 6. Muestra salinidades y temperaturas promedio registradas en las unidades de cultivo durante la temporada 2005-2006.....	36
Figura 7. Evolución de variables ambientales durante la temporada productiva 2003-2004. TA: temperatura ambiente; ST: sensación térmica; VP: velocidad de viento promedio; y VM: velocidad máxima del viento.....	37
Figura 8. Evolución de variables ambientales durante la temporada productiva 2004-2005. TA: temperatura ambiente; ST: sensación térmica; VP: velocidad de viento promedio; y VM: velocidad máxima del viento.....	37

Figura 9. Evolución de variables ambientales durante la temporada productiva 2005-2006. TA: temperatura ambiente; ST: sensación térmica; VP: velocidad de viento promedio; y VM: velocidad máxima del viento.....	38
Figura 10. Análisis discriminante en base a caracteres morfológicos entre <i>A. franciscana</i> (SFB) y cepa local (PCH-2003, PCH) y <i>A. persimilis</i>	38
Figura 11. Análisis discriminante en base a caracteres morfológicos entre <i>A. franciscana</i> (SFB) y cepa local (PCH-2003, PCH) y <i>A. persimilis</i> ...	39
Figura 12. Fotografías de espinas en pene basal.....	40
Figura 13. Fotografías de frontal knob.....	40
Figura 14. Fotografías de cromosomas meióticos de tres poblaciones de <i>Artemia</i>	43
Figura 15. Fotografías de cromocentros en núcleos interfásicos de tres poblaciones de <i>Artemia</i>	44
Figura 16. Análisis de Cluster usando el método de análisis UPGMA (unweighted pair group method) basado en la distancia de Nei.....	45
Figura 17. Longitud total ($\mu \pm SD$) y diámetro de quistes hidratados ($\mu \pm SD$) de <i>Artemia</i> de poblaciones chilenas y muestras referenciales.....	46
Figura 18. Dendrograma generado a partir de loci aloenzimáticos usando el método de análisis de vecindad (Neighbor-joining tree) para las distancias de Nei (1978).....	48
Figura 19. Relación filogenética de especies de <i>Artemia</i> basado en el fragmento COI de 588bp.....	54
Figura 20. Aislamiento y cultivo de microalgas a partir de una muestra de agua de la localidad de La Villa. a) Algas sembradas en placas de agar; b). Algas sembradas en matraces a salinidades de 100 ppt...	58
Figura 21. Microalga <i>Dunaliella salina</i> . A. Flagelos. B. Cloroplasto.....	59
Figura 22. Microalga tentativamente del género <i>Chroococcus</i>	59

Figura 23. Aplanóspora de <i>Dunaliella salina</i> (<i>Dunaliella</i> enquistada) rodeada de halobacterias.....	59
.....	
Figura 24. Curva de crecimiento de las algas <i>D. salina</i> y <i>Chroococcus</i> bajo condiciones controladas a salinidades de 100 ppt.....	60
Figura 25. Densidad poblacional en las unidades productivas con distintas modificaciones, durante la temporada 2003-2004.....	68
Figura 26. Muestra la densidad poblacional a lo largo de la temporada 2004-2005.....	69
Figura 27. Muestra la densidad poblacional a lo largo de la temporada 2005-2006.....	69
Figura 28. Descendencia de <i>Artemia</i> de las cepas PIC y SFB a distintas salinidades experimentales.....	72
Figura 29. Muestra la producción de quistes en el estanque CT1, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población.....	74
Figura 30. Muestra la producción de quistes en el estanque CT2, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población.....	74
Figura 31. Muestra la producción de quistes en el estanque CT3, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población.....	75
Figura 32. Muestra la producción de quistes en el estanque PT1, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población.....	75
.....	
Figura 33. Muestra la producción de quistes en el estanque PT2, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población.....	76
.....	
Figura 34. Muestra la producción de quistes en el estanque PT3, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población.....	76
.....	

Figura 35. Muestra la producción de quistes en el estanque CL1-1', contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población.....	77
Figura 36. Muestra la producción de quistes en el estanque CL1-1', contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población.....	77
Figura 37. Muestra la producción de quistes en el estanque CT1, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población durante la temporada 2004-2005.....	78
Figura 38. Muestra la producción de quistes en el estanque CT2, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población durante la temporada 2004-2005.....	79
Figura 39. Muestra la producción de quistes en el estanque CT3, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población durante la temporada 2004-2005.....	79
Figura 40. Muestra la producción de quistes en el estanque PT1, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población durante la temporada 2004-2005.....	80
Figura 41. Curva de secado quistes en deshidratador solar temporada 2004-2005.....	81
Figura 42. Porcentaje de humedad y eclosión de quistes de <i>Artemia</i> almacenados durante 1, 2, 3, 4 y 5 semanas en contenedores con salmuera durante la temporada 2005-2006.....	83
Figura 43. Curva de secado de biomasa en el deshidratador solar temporada 2004-2005. a) Paño de tela batista; b) Malla baby citrus.....	86
Figura 44. Curva de secado, mediante el proceso de liofilización, de biomasa congelada de <i>Artemia</i> provenientes de la localidad de La Villa, Pichilemu (2003-2004).....	88
Figura 45. a) y b) pretil de la salina socavado por la crecida del estero Nilahue durante la temporada 2005-2006.....	91

Antecedentes Generales

Antecedentes Proyecto		
Código	FIA-PI-C-2003-1-D-151	
Nombre	<i>Diversificación de la actividad salinera mediante el cultivo semi-intensivo del crustáceo Artemia para la producción de quistes en la localidad de La Villa, Pichilemu, VI Región.</i>	
Antecedentes Proyecto	Programado	Real
Región o Regiones de Ejecución	VI Región del Libertador Bernardo O'Higgins, Provincia Cardenal Caro	VI Región del Libertador Bernardo O'Higgins, Provincia Cardenal Caro
Agente Ejecutor	Marco Antonio Labarca Parraguez	
Agente(s) Asociado(s)	Laboratorio de Genética & Acuicultura, Universidad de Los Lagos (Campus Osorno)	Laboratorio de Genética & Acuicultura, Universidad de Los Lagos (Campus Osorno)
Coordinador del Proyecto	Marco Antonio Labarca Parraguez	Marco Antonio Labarca Parraguez
Costo Total		
Aporte del FIA		
Periodo de Ejecución		

I. RESUMEN EJECUTIVO

Este proyecto es un intento pionero en Chile por desarrollar la producción de biomasa y quistes de *Artemia* de calidad apropiada para su uso en acuicultura, específicamente en larvicultura de peces y crustáceos, como actividad complementaria a la producción de sal por evaporación que en las salinas ubicadas entre Cáhuil y La Villa (Pichilemu) se realiza desde épocas pre-Hispánicas.

A pesar de que la actividad propuesta está limitada por razones ambientales (necesidad de alta tasa de evaporación durante la temporada estival, y las inundaciones invernales) los resultados obtenidos durante tres temporadas productivas son alentadores y señalan la factibilidad técnico biológica de desarrollar el cultivo de *Artemia* a escala comercial.

Durante la ejecución de proyecto (temporadas 2003 – 2004, 2004 – 2005 y 2005-2006) debieron evaluarse diversos aspectos relacionados con el cultivo de *Artemia*, entre los que se destacan: i) densidad de inoculación de nauplios; ii) sistema de cultivo (mono y multiciclo); iii) cultivo masivo de microalgas en terreno; iv) evaluación de distintos fertilizantes y sus dosificaciones; v) sistema de recolección de quistes; vi) cosecha de biomasa; vii) procesamiento y evaluación de quistes y biomasa; viii) empaque de quistes y biomasa. En el sistema mono-ciclo que fue utilizado durante la primera temporada, nauplios de *Artemia* fueron inoculadas sólo una vez durante la estación. Mientras que en el sistema multi-ciclo (2004-2005 y 2005-2006) las unidades productivas fueron drenadas y reinoculadas en tres oportunidades durante la temporada.

La temporada 2003 – 2004 se modificaron parcialmente seis unidades productivas, lo que permitió contar con un volumen de cultivo de 39,79 m³. Mientras que para la temporada 2004 – 2005 se contó con tres estanques profundizados totalmente (mediante excavación), obteniéndose un volumen total de 217,8 m³ destinados al cultivo de *Artemia*. Los resultados obtenidos para la primera y segunda temporada fueron de 111 g de quistes (ww) y 6.500 g de biomasa (ww), y 3.084 g (ww) de quistes y 15.000 g (ww) de biomasa, respectivamente. De acuerdo a estos resultados, el incremento del volumen disponible para el cultivo de *Artemia* en 5,5 veces se tradujo en un incremento de 75, 5 y 2,32 veces en la producción de quistes y biomasa, respectivamente. Finalmente, durante la extensión del proyecto (octubre de 2005 a julio de 2006) se cosecharon 800 g de quistes y 23.800 g de biomasa, ambos sobre la base de peso húmedo (ww).

II. INFORME TÉCNICO (TEXTO PRINCIPAL)

1. Objetivos del Proyecto:

En cuanto al objetivo general planteado, cual es la "*Diversificación de la actividad extractiva de la sal por medio del cultivo masivo de Artemia para abastecer de quistes a la industria acuícola*", a juicio del proponente y del equipo técnico éste se ha cumplido. Ello, considerando que sobre la base de los resultados obtenidos no sólo se ha dado inicio a una nueva empresa dedicada a la producción, procesamiento y comercialización de sal y recursos hidrobiológicos, sino que además se ha registrado la marca "ECOARTEMIA" (Diario Oficial 24/11/2006) y se está gestionado la obtención de recursos a través del Programa de Innovación Empresarial Individual de Innova Chile (CORFO), lo que permitirá dar continuidad y el escalamiento productivo a la iniciativa financiada por la Fundación para la Innovación Agraria. No obstante, cabe señalar que este juicio se hace sobre el entendido que la "diversificación" no se logra con un acto aislado, sino que es alcanzada a través de un proceso de mediano a largo plazo.

Respecto de los objetivos específicos, el balance efectuado es positivo, toda vez que 12 de los 14 planteados por la propuesta se cumplieron en su totalidad (85,7%) mientras que los dos restantes (14,3%) sólo se cumplieron parcialmente. Uno de estos objetivos establece como meta productiva la obtención de 85 kg de quistes, sin embargo, sólo se obtuvieron 8 kg. Mientras que el segundo objetivo logrado parcialmente plantea el mejoramiento de ingresos tanto del proponente como de los trabajadores medieros, ello como una consecuencia directa de la introducción del cultivo de *Artemia* a la producción de sal. Esto sólo se ha cumplido sólo para los trabajadores medieros, quienes recibieron entre el 80 y 100% de la producción de sal.

2. Metodología del Proyecto:

2.1. Construcción de laboratorio

Se levantó una construcción de 55 m², la que fue acondicionada de acuerdo a los requerimientos del proyecto con: i) una sección húmeda en donde se realizan las tareas de decapsulación-eclosión de quistes, lavado y mantención de quistes, y lavado de biomasa; ii) la sección seca, en donde se mantienen y utilizan los equipos de laboratorio como lupas y microscopio; iii) área de secado, pesado y empaque; y iv) una zona que es utilizada principalmente como bodega.

2.2. Equipamiento de Laboratorio

La zona húmeda del laboratorio se encuentra equipada con seis estanques cilindro-cónicos de acrílico con una capacidad de 60 l cada uno, una red de aire generado por un soplador de 0,5 HP. Además del aire, cada estanque cuenta con un sistema de iluminación independiente de aproximadamente 2.000 Lux.

Tanto el agua dulce como salada es mantenida en estanques de 1 m³, ubicados en el exterior y dispuestos a una altura de 3 m. Desde aquí, el agua es conducida por gravedad a través de tuberías de 1 y 1,5" para el agua dulce y salada, respectivamente.

2.3. Desbarrado de calles y canales

Se realizó al inicio de cada temporada, una vez que hubo cedido la inundación invernal. La actividad consiste en el retiro del barro acumulado durante la crecida, y fue ejecutada por el trabajador salinero.

2.4. Modificación de estanques

Durante la primera temporada del proyecto se efectuaron modificaciones parciales en seis estanques del sitio el Pílon (salina 1) y en dos del sitio Las Pajillas (salina 2). Las modificaciones realizadas (Figura 1) permitieron contar con un volumen útil de 39,79 m³.

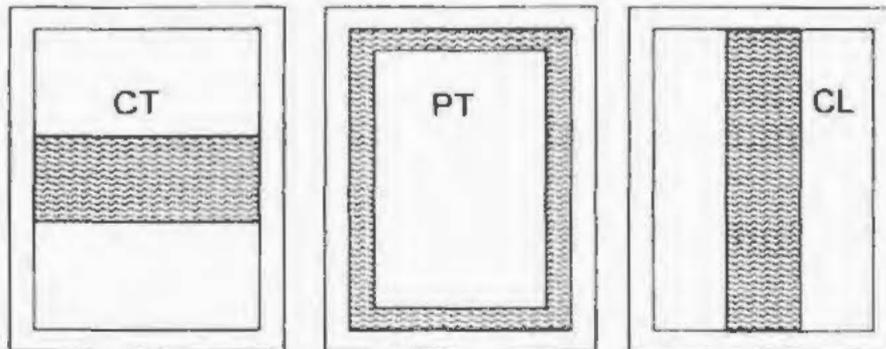


Figura 1. Modificaciones realizadas a los estanques durante la temporada 2003-2004 para el cultivo de *Artemia*. CT: estanque profundizado en el eje transversal; PT: estanque profundizado perimetralmente; CL: Estanque profundizado en el eje longitudinal.

Con el fin de incrementar la producción, durante la segunda temporada (2004-2005) se profundizaron completamente diez estanques. De ellos, cinco fueron profundizados vía excavación y los restantes mediante el levantamiento de los parapetos. El volumen generado por las modificaciones fue de 1.210 m³. Hacia fines de esta temporada se probó la compactación de los estanques profundizados mediante el levantamiento de pretiles, utilizando una placa compactadora.

En el periodo contemplado para la extensión del proyecto se probaron mangas de polietileno para la impermeabilización de los estanques antes mencionados. En el primer intento se utilizaron 3 segmentos de manga de 2 m de ancho traslapadas 0,5 m. La segunda prueba se realizó con dos segmentos de manga de polietileno de 4 m traslapadas 0,5 m y sellada con cinta para impermeabilización de tuberías 3M.

2.5. Llenado de corralones y estanques

Mientras el nivel de la laguna lo permitió, el llenado de los corralones se efectuó utilizando la diferencia de pendientes. Sin embargo, cuando el nivel de la laguna descendió, la operación debió realizarse con ayuda de una motobomba de 3", pudiendo utilizarse la diferencia de pendientes sólo para el llenado de las unidades productivas. En general, el

llenado de los corralones se realizó cada quince días, debiendo utilizarse la motobomba durante 36 a 48 horas.

2.6. Monitoreo de variables abióticas

Diariamente se registró la temperatura del agua, para ello se utilizó un termómetro de mercurio con rango de -10 a 100° C y resolución de $\pm 0,1^{\circ}$ C. Mientras que la salinidad fue medida con un refractómetro marca Atago con rango de 0 a 100 ppt y cuando las salinidades superaron dicho rango se usaron areómetros de Baumé con rangos de 10 a 20° y 20 a 30° Bé ($\pm 0,1^{\circ}$ Bé). En tanto que variables como temperatura ambiental, sensación térmica y velocidad del viento se midieron con un termoanemómetro digital con resolución de $\pm 0,1^{\circ}$ C – Km/h.

2.7. Caracterización de la cepa local de *Artemia*

Pichilemu representa el límite sur de distribución para *A. franciscana* y el límite norte para *A. persimilis*, de aquí que el disponer de marcadores discriminantes para la identificación de ambas especies (cuyos quistes son diseminados naturalmente por el viento y aves acuáticas) es de utilidad productiva. Esto debido a que *A. franciscana*, y en particular algunas de sus poblaciones, es la especie más ampliamente comercializada. Finalmente, monitorear la variabilidad genética (n° de alelos, porcentaje de loci polimórficos y heterocigosidad) permite asociar los resultados productivos con relación a la condición genética de la población y/o delimitar efectos ambientales y genéticos para ciertas características que caracterizan a la población en cierto momento (incremento de quistes, por ejemplo).

Durante el período que se informa en el laboratorio de Genética & Acuicultura de la Universidad de Los Lagos (Osorno) se realizaron las siguientes actividades:

- a) Caracterización y seguimiento de la población de *Artemia franciscana* de la localidad de La Villa, utilizando las técnicas de análisis morfológico de quistes y nauplios, cariológico, electroforético y molecular estandarizadas en el laboratorio.
- b) Establecimiento de un experimento para simular bajo condiciones controladas el efecto de la salinidad sobre la producción de quistes y biomasa de *Artemia*. La finalidad es identificar la salinidad que favorezca la producción de biomasa y quistes para replicar, dentro de lo posible, estas condiciones en terreno.

Análisis morfométrico de quistes y nauplios de Artemia

Quistes de *Artemia* colectados desde PIC, de las poblaciones chilenas de CEJ y CIS, de las poblaciones referenciales SFB y BAI (abreviaciones ver Tabla 1) fueron sumergidos en agua hasta que alcanzaron el estado de hioratación (forma esférica). Luego, el diámetro de 50 quistes fue medido utilizando un microscopio marca Nikon con un objetivo graduado, previamente calibrado (Fig. 2a y b). Cada uno de los quistes medidos fue eclosionado individualmente a fin de establecer el tamaño larval en el estado Instar I (n=50), utilizando un microscopio Nikon con un objetivo graduado (Figura 2c). Se calculó el valor promedio del diámetro de quistes y longitud de las larvas Instar I.

Análisis electroforético y molecular

Quistes de poblaciones de distintas áreas geográficas del mundo fueron eclosionados y cultivados bajo condiciones estandarizadas para incluirlos en este estudio (Tabla 1). Las muestras de PIC (abreviaciones ver Tabla 1) fueron enviadas vivas al laboratorio y de acuerdo al procedimiento de rutina (Gajardo et al. 1995), parte de los animales fueron fijados en etanol (99%) para su análisis molecular, otra parte fueron congelados para su posterior análisis electroforético y los restantes se utilizaron para establecer cultivos. El análisis electroforético está basado en los 7 sistemas enzimáticos (Tabla 2) y en los loci satisfactoriamente resueltos para todas las poblaciones. La similitud entre alelos de diferentes poblaciones fue verificada corriendo en el mismo gel individuos de cada una de las poblaciones analizadas. El análisis de los datos se realizó usando el programa GDA (el que utiliza las frecuencias génicas para los cálculos de diversidad y la estimación a partir de éstas de las distancias genéticas, de acuerdo al protocolo de Nei (ver Tabla de distancias o similitudes genéticas). Para el análisis molecular DNA fue aislado utilizando el kit comercial QIAamp® y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue utilizado para amplificar un fragmento de 680 bp de la subunidad I de la citocromo oxidasa utilizando los partidores LCO1490 y HCO2918. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25µl que contenía 2 y hasta 4 µl de DNA genómico, 0,2µl de cada partidador, buffer PCR (1x) conteniendo 2.5mM de Mg⁺², 2.5 mM de dNTP's y 0.1 unidad de la enzima taq polimerasa . El régimen térmico utilizado consistió en un ciclo de 5 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 1minuto a 94°C, 1,5 minutos a 47°C, y un minuto a 72°C, seguido por un ciclo de 5 minutos a 72°C. Los productos PCR fueron visualizados en geles

de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Los productos de PCR fueron posteriormente purificados usando el kit comercial QIAquick® PCR purification los que fueron secuenciados en ambas direcciones usando un terminador químico utilizando un régimen térmico de un ciclo de 3 minutos a 96°C, 30 ciclos de 15 segundos a 96°C, 10 segundos a 50°C y 4 minutos a 60°C en un secuenciador automático (ABI3100). Las secuencias en ambas direcciones de cada individuo fueron alineadas utilizando en programa Sequencher 4.1.4.

Tabla 1. Lista de especies de *Artemia* utilizadas en este estudio incluyendo la localidad, abreviación y país de origen.

ESPECIE	LOCALIDAD	ABREVIACION	PAIS
A. sinica	Xiechi Lake, Yuncheng	XIE	China
A. tibetiana	Lagkor Co, Tibet	LAG	China
A. salina	Wadi Natrum	WAD	Egipto
A. persimilis	Buenos Aires	BAI	Argentina
	Laguna de Los Cisnes	CIS	Chile
	Laguna Amarga	AMA	Chile
A. franciscana	El Convento	CON	Chile
	Salar Lamara	LLA	Chile
	La Rinconada	RIN	Chile
	Pichilemu	PIC	Chile
	Macao	MAC	Brasil
	Bahía San Francisco	SFB	Estados Unidos
A. parthenogenetica	Aibi Lake, Xinjiang	AIB	China
	Citros, Pieria	CIT	Grecia
	Kalloni	KAL	Grecia
	Karabogaz-gol	KAR	Turkmenistán
	Karasjuk Lake	KAR_1	Kazakhstan
	Altai Area	ALT	Kazakhstan
	Kuchuksoe Lake	KUC	Rusia
	Margherita di Savoia	MAR	Italia
	Vineta Swakopmund	VIN	Namibia
Qarun Lake	QAR	Egipto	

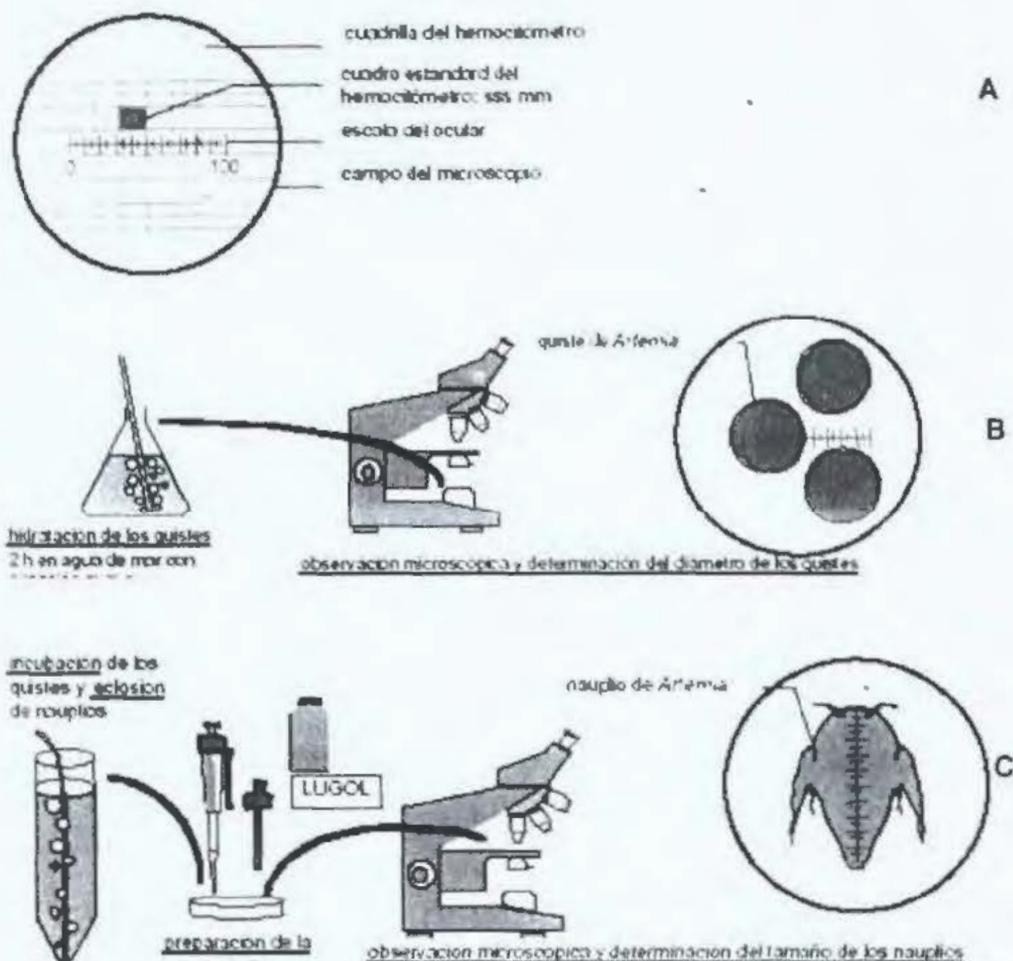


Figura 2. Medición quistes y larvas de *Artemia*. A. Calibración del Ocular graduado; B. Medida de diámetro de los quistes; C. Medida longitud de larva Instar I

Tabla 2. Lista de enzimas y buffers usados en electroforesis de *Artemia*.

Enzimas	Código	Buffers
Glutamato oxalacetato trasmitasa	Got-2	TEB-Mg ⁺²
Malate dehidrogenasa	Mdh	TC-7
Esterasa-D	Est-d	TC-7
Enzima Malica	Me	TC-7
6-fpsfogluconato dehidrogenasa	6pgdh	TC-7
Di-peptidasa	Pep	TEB-Mg ⁺²
Peroxiadasa	Per	TEB-Mg ⁺²

2.8. Obtención de quistes para inoculación

La identificación de la *Artemia* presente en las salinas de Cáhuil (1) fue muy importante para la toma de decisión respecto de la variedad a inocular en los estanques y lo será posteriormente para el monitoreo de la misma durante los ciclos productivos. Es decir, los datos obtenidos al comienzo representan una línea base, pocas veces disponibles en un proceso productivo. Aunque la decisión de la cepa a inocular está principalmente basada en sus características económicas, es importante además considerar la adaptación de la misma a las condiciones ambientales locales a fin de lograr una biomasa acorde a lo esperado. De esta forma la variedad presente en los estanques en los ciclos productivos inter-anales y sus características genéticas son de importancia para los fines perseguidos.

Se solicitó al Artemia Reference Center (ARC, Universidad de Gante, Bélgica) 500 g de quistes de una cepa de *Artemia* con características similares a las presentadas por la cepa local y que, además, presentaran alta producción de quistes. Considerando tales requerimientos el ARC remitió para el proyecto quistes de *Artemia* de la cepa San Francisco Bay 1574 (SFB 1574).

2.9. Gira tecnológica a Salinas de Grossos (Brasil)

La gira se desarrolló en el periodo comprendido entre los días 19 y 24 de enero de 2004. Participaron de esta actividad: Mayda Hauva, Marco Labarca, Dante Cornejo, Mauricio Martínez y Gonzalo Gajardo.

El arribo fue en la ciudad de Natal, Rio Grande do Norte, donde el grupo fue recibido por el Dr. Marcos Camara Rocha, profesor de la universidad de Rio Grande do Norte y consejero científico del proyecto desarrollado en las salinas de Grossos.

Las salinas de Grossos se encuentran aproximadamente a 1 hora (en vehículo) de Mossoró. Una vez en el pueblo de Grossos se realizó una visita a las dependencias de la empresa BioArtemia. El dueño, un ex salinero, explicó la historia de la empresa (hoy una empresa familiar) y las distintas etapas del proceso productivo. Posteriormente se visitaron las instalaciones y se conocieron las actividades de procesamiento de biomasa, embalaje y almacenamiento. Igualmente se visitaron las salinas en el área, finalizando con la visita a una empresa camaronera ubicada entre las localidades de Grossos y Mossoró, una de las actividades relevantes y con mayor proyección en el área.

2.10. Cultivo de microalgas en laboratorio

La calidad nutricional de los nauplios de *Artemia* obtenidos a partir de quistes tiene una estrecha relación con la dieta de la hembra que los produce. Puesto que el objetivo es producir quistes de calidad comercial para la industria acuícola, la alimentación de la población de *Artemia* en cultivo reviste especial importancia.

Durante la temporada 2003-2004, un inóculo de *Dunaliella salina* provisto por el Laboratorio de Genética & Acuicultura de la Universidad de los Lagos fue amplificado en el laboratorio de Barrancas para su posterior inoculación en los estanques sancochadores de las salinas. Los pobres resultados obtenidos hicieron que durante la siguiente temporada productiva se aislara la cepa local de *Dunaliella* sp. a partir de un inóculo obtenido desde los estanques cristalizadores. Una vez lograda la masificación del cultivo se llevó a cabo la inoculación de microalgas directamente en los estanques profundizados para el cultivo de *Artemia*.

Las dos temporadas siguientes se mantuvo un pequeño cultivo de la cepa local de la cepa local de *Dunaliella salina* en el laboratorio. Para ello se utilizaron dos estanques de acrílico con 16 litros de agua salada (55 ppt) que luego fueron amplificados en 1 o 2 estanques cilindro cónicos de 60 litros, según las necesidades.

2.11. Fertilización de estanques

Para la fertilización de estanques se utilizó el producto Enhance Algae. Si bien, durante la primera temporada se utilizó la dosificación recomendada por el fabricante (5 Kg por estanque), la siguiente temporada se probaron dosis de 3 y 4 Kg por estanque. Sólo para la fertilización del 15 de abril de 2005 se utilizaron fertilizantes agrícolas en los estanques CT1 Y CT2. Las dosis utilizadas fueron de 500 g de urea y 225 g de superfosfato triple ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

En las salinas comerciales con sistema semi-intensivo de cultivo de *Artemia* como las de La Villa, cuyas concentraciones de sal alcanzan la saturación, la proliferación de microorganismos que son utilizados como dieta por el microcrustáceo está limitada a aquellas que habitan ambientes halófilos. A través de la fertilización de los estanques se busca estimular la proliferación de fitoplancton y no el fitobentos ("lama") que no

constituye una dieta adecuada para *Artemia* y además retrasa la evaporación del agua para la cristalización de sal. Aguas con color verde-parduzco producto de la fertilización presentan normalmente altas concentraciones de partículas de detritos orgánicos y/o de algas. Sin embargo, la proliferación de microalgas no siempre es exitosa e inmediata. Algunos ejemplos de microorganismos halófilos bien adaptados y ampliamente distribuidos en salinas incluyen especies de halobacterias y microalgas. Dentro de las microalgas utilizadas como dieta de *Artemia* se incluyen Diatomeas (*Chaetoceros*, *Cyclotella*, *Phaedactylum*, *Nitzschia*), Clorofíceas (*Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Platymonas*, *Stichococcus*, *Steehanoptera*, *Brachiomonas*) y Crisofíceas (*Isochrysis*, *Monochrysis*, *Stichochrysis*, *Syracosohaera*) (Lavens y Sorgeloos, 1996). En la naturaleza, en tanto la especie más abundante es *Dunaliella salina* que posee la particularidad de crecer y reproducirse aún en aguas de salinas acumulando grandes concentraciones de β -caroteno.

2.12. Seguimiento del desarrollo algal

Para registrar el crecimiento de las algas en los estanques se tomó de cada uno una muestra de 250 ml la que fue homogenizada y fijada con lugol. Posteriormente se tomó una alícuota (pipeta Pasteur) para hacer el recuento en una cámara de Neubauer bajo el microscopio estereoscópico (40x).

Con el fin de identificar con precisión la composición del bloom algal obtenido en los estanques durante la segunda temporada, se enviaron muestras al Laboratorio de Genética & Acuicultura. El alga fue sembrada en condiciones asépticas en placas Petri conteniendo agar (3%) en medio Conwy (35 ppt). Las placas se mantuvieron en condiciones controladas de fotoperíodo (24:00) y temperatura (25°C \pm 2) durante 2 semanas para su proliferación.

Las algas sembradas en placas fueron transferidas a matraces de 250 ml con medio de cultivo Conwy a salinidades de 35 ppt y 100 ppt, siguiendo su crecimiento mediante recuento de células por medio de una cámara de Neubauer.

Las microalgas fueron clasificadas utilizando el "Manual Taxonómico del Fitoplancton de Aguas Continentales con especial referencia al Fitoplancton de Chile" (Parra et al., 1983) y

fotografiadas con una cámara fotográfica adaptada a un microscopio Nikon (10, 40 y 100x).

2.13. Decapsulación y eclosión de quistes

Se hidrataron quistes durante 1 hora en 500 ml de agua de mar (37 ppt) con aireación. Verificada la hidratación bajo lupa (quistes con forma cilíndrica), se adicionó el hidróxido de sodio (NaOH) y luego el hipoclorito de sodio (NaOCl). El cambio de coloración (desde café rojizo a un tono anaranjado) confirmó la reacción. La dosificación del agua y los reactivos corresponden a las señaladas por Lavens y Sorgeloos (1996).

La Decapsulación se dio por concluida cuando al muestrear con una cánula de vidrio se observó más del 80% de embriones en el fondo de la cánula (puesta en sentido horizontal). Finalmente, los embriones fueron vertidos sobre un tamiz de 100 μm y lavados con abundante agua.

La eclosión de los quistes se efectuó en estanques cilindro-cónicos con 12 litros de agua de mar, burbujeo constante y luz. Para evaluar el porcentaje de eclosión se analizó una muestra bajo una lupa estereoscópica a partir de las 24 horas de iniciado el proceso.

2.14. Evaluación de quistes

La eclosión y evaluación de calidad de los quistes de *Artemia* de la localidad de PIC se realizó de acuerdo a los estándares internacionales (ver Lavens & Sorgeloos, 1996) los que incluyen parámetros tales como porcentaje (%) de eclosión, eficiencia de eclosión, tasa de eclosión y sincronización. La evaluación fue certificada por el Laboratory of Aquaculture and *Artemia* Reference Center (Universidad de Gent, Bélgica) y paralelamente por el Laboratorio de Genética & Acuicultura (Universidad de Los Lagos, Osorno). Transcurridas 24 horas desde el inicio del proceso de eclosión, se tomó una alícuota (10 ml) de agua desde el estanque cilindro-cónico y se depositó en una cápsula Petri. Posteriormente se agregaron unas gotas de lugol para luego poder observar y contabilizar los estadios de desarrollo bajo la lupa estereoscópica. El recuento consideró tanto los embriones en estado de "paraguas" como los nauplios de *Artemia*. Este procedimiento se repitió a las 36, 48 y 72 horas.

A continuación se presentan las ecuaciones con que se calculó tanto el porcentaje de eclosión (a) como la eficiencia de eclosión (b):

$$(a) \quad \% E = \frac{N \times 100}{N + E}$$

donde:

%E= porcentaje de eclosión

N= número de nauplios contabilizados

E= número de embriones contabilizados

$$(b) \quad EE = \frac{N \times V}{M \times C}$$

donde:

EE= Eficiencia de eclosión (Nº de nauplios/g de quistes)

N= número de nauplios contabilizados

V= volumen del agua de mar utilizada (ml)

M= volumen de agua de la muestra (ml)

C= cantidad de quistes utilizados (g)

2.15. Transporte e inoculación de nauplios

El contenido de cada estanque de eclosión fue traspasado a estanques de 30 l de capacidad y transportados hasta las salinas. Antes de inocular, los bidones plásticos con los nauplios se mantuvieron por aproximadamente 45 minutos en el estanque para homogenizar la temperatura y reducir mortalidad. Como en otras oportunidades la inoculación se produjo alrededor de las 19 horas.

Durante la temporada 2003-2004 se inoculó a una densidad de 150 nauplios/l, bajo un esquema productivo monociclo (una sola inoculación durante la temporada). Mientras que las temporadas siguientes se empleo un esquema multiciclo (varios eventos de inoculación-cosecha-reinoculación), donde la primera inoculación de los estanques CT1, CT2 y PT1 se hizo con una densidad de 100 nauplios/l, y 60 nauplios/l en el estanque CT3. La densidad de inoculación para el segundo ciclo se mantuvo en el estanque CT3, mientras que en los estanques CT1 y CT2 se redujo a 50 nauplios/l. Durante la tercera temporada (periodo de extensión) los estanques fueron inoculados a una densidad de 60 nauplios/l.

Los ciclos de cultivo tuvieron una duración de entre 37 y 45 días. El criterio empleado para establecer la duración de cada ciclo fue básicamente la cantidad de quistes que se estuvieran produciendo.

2.16. Monitoreo de la población de Artemia

Durante la primera temporada (2003-2004) el monitoreo de la población de *Artemia* se efectuó semanalmente. En los estanques con zanjas transversales (CT) y longitudinales (CL) se tomaron 6 muestras (esquinas y centro de cada costado de la zanja) con una probeta de 250 ml. En la temporada siguiente (2004-2005) los estanques con *Artemia* fueron muestreados quincenalmente durante los meses de enero y febrero, en tanto los meses de marzo y abril se realizó semanalmente. Para ello se tomaron 10 muestras de 500 ml en distintos sitios del estanque (esquinas y centro tanto de la cara longitudinal como transversal).

En la temporada 2005-2006 el muestreo de la población se realizó semanalmente. Los individuos colectados se concentraron en un tamiz de 100 μm para luego ser aforados hasta un volumen conocido en una probeta de 250 ml. Desde ésta se tomó una alícuota y dos contramuestras de entre 1 a 5 ml (dependiendo de la concentración de individuos en la muestra), que fueron puestas en placas Petri para posteriormente ser contadas bajo lupa estereoscópica. Con el conteo se registró la cantidad total de individuos, su estadio de desarrollo (nauplio, juvenil y adulto) y en el caso de las hembras su condición reproductiva (con ovisacos vacíos, con embriones y con quistes).

2.17. Construcción de tamices

Para la construcción de tamices se empleó tela con un tramado de malla de 100 y 250 μm . En cuanto a los materiales y la forma, esta fue diversa y se relacionó exclusivamente con el uso que se les iba a dar. Así, se emplearon recipientes tipo bowl para limpiar quistes y concentrar los individuos adultos capturados en el muestreo. Mientras que para traspasar agua desde los estanques modificados hacia los recolectores y cristalizadores se utilizó un tambor de 220 litros al que se adicionaron 3 boquillas a 30 cm del extremo superior del tambor. Para la construcción de las boquillas se emplearon trozos (30 cm) de PVC

sanitario de 140 mm de diámetro. En el extremo del tubo que va hacia el interior del tambor se soldó una tapa de PVC (del tipo cementar) a la que previamente se le había cortado el centro y en su reemplazo se le había pegado tela de 100 µm de tramado.

2.18. Construcción de secadores

La temporada 2003-2004 el secado de quistes se hizo a temperatura ambiente. Para dicho fin se construyeron 12 bastidores de madera (0,44 x 0,30 m) a los que se les puso como fondo un trozo de tela (popelina). Para contener las bandejas se construyó un secador tipo repisa (1,2 x 1,5 x 0,45 m) de 3 niveles con perfil de fierro 25 x 25 x 3 mm.

A la luz de los bajos porcentajes de eclosión observados en los ensayos realizados por el Artemia Reference Center (ARC) con los quistes de la temporada 2004¹, durante la segunda temporada se probó el secado de quistes en un deshidratador solar. Este artefacto consta de dos partes: i) Colector de calor. Es una caja de 1,2 m de largo por 0,75 m de alto y 0,15 m de fondo. La pared exterior es de hojalata de 5 mm de espesor y en la cara interna del fondo tiene una capa de poliestireno expandido de 12 mm, y sobre ésta una cubierta de cholgüán. Cabe señalar que todas las caras internas del colector fueron pintadas de color negro. Las caras frontal y posterior del colector de calor están abiertas para la circulación del aire. Por la cara frontal ingresa el aire frío, y por la posterior sale el aire caliente hacia el horno de secado, al cual el colector queda unido en un ángulo de 45°; ii) horno de secado. Está constituido por una estructura de metal forrada, tanto interna como externamente, con hojalata de 5 mm. Entre estas paredes se usó planchas de poliestireno expandido de 50 mm, como material aislante. El horno de secado mide 1,35 m de largo por 0,71 de alto por 0,55 m de fondo. En la parte superior el horno cuenta con 4 templadores que permiten regular el flujo de aire dentro del horno. Internamente éste cuenta con rieles para soportar una carga de 16 bandejas (0,44 x 0,30 m) distribuidas en cuatro niveles. El registro de la temperatura dentro del horno se obtiene mediante la inserción del termómetro en un orificio de la puerta ubicada en una de las caras laterales del artefacto. No obstante la eficacia del secador solar demostró ser poco eficiente debido a la alta tasa de secado hasta lograr peso constante. De manera que durante la temporada 2005-2006 se utilizó la repisa construida al comienzo del proyecto la

¹ Quality Analysis of Artemia Cyst. Artemia Reference Center. 2004

cual fue modificada para poder reducir el tiempo de secado de los quistes y biomasa por medio del uso de un calefactor eléctrico de aire.

2.19. Montaje de ensayo en Osorno

La producción máxima de quistes y biomasa de *Artemia* están influenciadas por la dinámica local de la población, es decir, por la tasa de reclutamiento de la población. El rol de los quistes en una salina es el de inóculo ya que luego del invierno, durante el cual están anegadas y no hay producción de sal, darán origen a una nueva generación. En estanques manejados extensivamente, ligados a la productividad natural, sin un manejo específico en la entrada de agua, se estabilizarán a densidades generalmente mucho más bajas.

La literatura señala que *Artemia* al ser expuesta a salinidades altas, o bien a ambientes eutroficados (con amplias fluctuaciones de O₂ entre el día y la noche) podrían provocar un stress suplementario a la población favoreciendo la inducción de oviparidad. Esto puede suceder naturalmente, cuando la salina está en funcionamiento, especialmente en los últimos estanques de producción; o puede ser promovido (e incluso realizado a bajas salinidades) incrementando las tasas de fertilización. La oviparidad solo se inducirá cuando la densidad de población sea suficientemente alta como para que no tengan lugar nuevos reclutamientos. Las salinidades más bajas y regulares sumadas la disponibilidad de alimento favorecen la producción de biomasa en los estanques.

El objetivo de esta experiencia es evaluar el efecto de la salinidad en la inducción a la oviparidad en cepas de *Artemia* de la Bahía de San Francisco (USA) y La Villa (Chile).

Durante el año 2004, quistes de *Artemia franciscana* de la Bahía de San Francisco (USA) fueron eclosionados de acuerdo la metodología descrita por Lavens y Sorgeloos (1996), mientras que nauplios de *Artemia* de La Villa (Chile) fueron colectados desde los estanques de mantención de cepas de *Artemia* disponibles en el Laboratorio de Genética & Acuicultura, Universidad de Los Lagos. Una vez que los ejemplares alcanzaron el estado de juvenil pares (macho y hembra) de cada cepa (n=10) fueron cultivados a salinidades experimentales 35, 50, 75, 100, 125 y 150 ‰ en tubos Falcon (50ml). El año 2005 se realizó la misma experiencia usando sólo ejemplares de la cepa de Pichilemu.

2.20. Monitoreo (ensayo Osorno)

Parejas de juveniles de *Artemia* de la localidad de PIC (abreviaciones ver Tabla 6) con claro dimorfismo sexual fueron aislados en tubos Falcon (50 ml) y mantenidos a las siguientes salinidades experimentales 35, 50, 75, 100, 125 y 150‰. El agua de los tubos fue removida diariamente a fin de coleccionar y registrar la historia reproductiva de 10 pares de *Artemia* para cada salinidad experimental durante 45 días de cultivo. Los parámetros registrados fueron descendencia total, número de descendientes en forma enquistada y número larvas nauplii. Se realizó un análisis de varianza a fin de determinar el efecto de la salinidad en la historia de vida utilizando programa estadístico Statista.

2.21. Recolección de quistes

La recolección de quistes se llevó a cabo cada 4 días, a partir de la tercera semana desde la inoculación de los nauplios durante la temporada 2004-2005 y diariamente durante 2005-2006. Esta actividad se realizó preferentemente entre las 11 y 13 horas considerando que en ese período el viento predominante juntaba los quistes en una esquina desde donde era fácil coleccionarlos con una jarra. Posteriormente eran vertidos sobre un conjunto de tamices donde los primeros (colador plástico, tamiz 350 µm) cumplían la función de retener los elementos de mayor tamaño y el último (cono trunco de batista) retenía los quistes.

2.22. Limpieza de quistes

Los quistes coleccionados desde los estanques, no obstante encontrarse libres de impurezas de gran tamaño, se encontraban mezclados con otras que no lograban ser retenidas por los tamices utilizados (principalmente microalgas y larvas de *Artemia*), y que de no ser eliminadas podrían influir negativamente en la calidad final de los quistes. Así, una vez en el laboratorio, los quistes fueron depositados en un estanque cónico con salmuera a saturación y burbujeo durante 24 horas. Este procedimiento permitió separar por decantación los quistes de otras partículas, las que pudieron retirarse fácilmente abriendo la llave ubicada en la parte inferior del estanque. Luego, los quistes fueron transferidos a una salmuera (a saturación) limpia, en donde se acopiaron con quistes recoleccionados durante el transcurso de todo un mes. En la temporada 2005-2006 los quistes fueron

depositados en un estanque cónico con salmuera a saturación y burbujeo durante 24 horas para retirar las impurezas. Luego se mantuvieron en bolsas de batista completamente sumergidos en salmuera a saturación separados por día de cosecha en por un periodo de tiempo que fluctuó entre 1 y 6 semanas para evaluar la influencia del tiempo de permanencia en salmuera tanto en el porcentaje de eclosión como en el porcentaje de humedad. Trascurrido este tiempo los quistes fueron puestos en agua dulce durante 15 minutos para finalizar el proceso de limpieza. Con este último procedimiento los quistes en buenas condiciones decantan mientras que el resto, junto con otras impurezas flotan. Una vez separados los quistes decantados se eliminó el exceso de agua para posteriormente ser pesados y secados.

2.23. Secado de quistes

El proceso de secado empleado durante la temporada 2003-2004, consistió sólo en disponer los quistes en las bandejas habilitadas para tal efecto. Los quistes fueron pesados periódicamente hasta constatar peso constante, momento en el cual los quistes fueron puestos dentro de un desecador para mantenerlos deshidratados. La segunda temporada (2004-2005) fue probado el deshidratador solar por el personal del proyecto en Pichilemu. No se encontraron antecedentes de un artefacto como este para tales fines, de manera que se considera un producto innovador del proyecto. Dado su carácter original no se pudieron establecer *a priori* variables como carga por bandeja, carga total o tiempos de secado. El único antecedente encontrado respecto del secado de quistes es utilizando calor, en donde se sugiere una temperatura de secado inferior a 40° C (Lavens y Sorgeloos, 1996). Para mantener la temperatura interna del horno por debajo del límite antes señalado se usaron los templadores, y cuando su apertura resultó insuficiente se cubrió parcialmente el colector con malla Rachel. El tiempo de secado en el deshidratador solar excede el día de secado por lo que tanto los quistes como la biomasa se humedecían durante la noche. Es así que durante la temporada 2005-2006 los quistes fueron secados con la ayuda de un termoventilador en la repisa construida para la primera temporada.

2.24. Evaluación del tiempo de deshidratado en salmuera sobre el contenido de humedad y porcentaje de eclosión de quistes

En virtud de los bajos porcentajes de eclosión obtenidos para los quistes producidos en las temporadas anteriores y el alto contenido de humedad de éstos se planteó el desarrollo de una prueba que permitiera evaluar el efecto del tiempo de permanencia de los quistes en salmuera sobre el porcentaje de humedad de los quistes y el efecto de este último sobre el porcentaje de eclosión. Para ello, quistes de *Artemia* que fueron cosechados en la salina El Pilón en la localidad de La Villa y almacenados separadamente en un estanque cilindro-cónico con salmuera a saturación durante 1, 2, 3, 4 y 5 semanas. Los quistes fueron eclosionados en el Laboratorio de Genética & Acuicultura de la Universidad de Los Lagos separadamente en triplicado para cada uno de los periodos de almacenamiento evaluando la calidad de ellos sobre la base del porcentaje de eclosión (%E) y eficiencia de eclosión (EE). Transcurridas 24 horas desde el inicio del proceso de eclosión, se tomó una alícuota (1ml) de agua desde el estanque cilindro-cónico (n=5) y se depositó en una cápsula Petri. Posteriormente se agregaron unas gotas de lugol para luego poder observar y contabilizar bajo la lupa estereoscópica. El recuento consideró tanto los embriones y los estados "umbrella" como los nauplios de *Artemia*. El procedimiento se realizó de igual forma a las 48 y 72 h post- inoculación de los quistes.

Para el análisis de datos se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de 1 y 2 vías con el fin de evaluar los tiempos de permanencia de los quistes en salmuera sobre el porcentaje de humedad de los quistes y el porcentaje de eclosión de ellos. Se realizó posteriormente un análisis a posteriori Tukey con el fin de determinar cual y de que manera estas variables afectarían la calidad final de los quistes cosechados.

2.25. Almacenamiento de quistes

Los quistes producidos durante la primera temporada luego de secados, debieron ser mantenidos en un desecador. Durante las temporadas siguientes esto no fue necesario puesto que el envasado se efectuó al momento en que los quistes salieron del secador, asegurando así que el porcentaje de humedad al momento del sellado de las bolsas fuese el mínimo. Durante las temporadas siguientes luego de ser secados los quistes fueron envasados en bolsas trilamina aluminizadas y posteriormente selladas al vacío impidiendo

la rehidratación de los quistes y la exposición a los rayos UV, de manera que no se requirieron medidas especiales de conservación, transporte y almacenamiento.

2.26. Cosecha de biomasa

Para la cosecha de biomasa se utilizó un filtro construido a partir de un tambor plástico de 220 litros al que se le cortó la tapa y se le adosaron 3 boquillas de PVC sanitario (140 mm) ubicadas a 30 cm del borde superior, y otra de PVC sanitario (110 mm) ubicada diametralmente opuesta en relación a las otras y a unos 10 cm del borde inferior del estanque. A dos de las boquillas superiores se les puso malla de 100 μ m en el extremo ubicado al interior del tambor, mientras que la tercera se dejó totalmente abierta, al igual que aquella ubicada en la parte inferior. Al momento de cosechar, a las boquillas sin malla se les puso una manga de tela (batista) sujeta con un elástico y anudada en el otro extremo. También fueron probados sacos harineros en reemplazo de las mangas de batista.

Finalmente, el agua de los estanques fue conducida hasta el tambor utilizando una bomba de 3". De esta forma, el agua salió desde el tambor a través de la mangas de tela, quedando retenidos todos los individuos (*Artemia*).

2.27. Procesamiento de biomasa

La biomasa cosechada fue transportada hasta el laboratorio en las mangas filtrantes donde quedó retenida. El contenido de éstas fue vertido sobre una malla plástica de uso agrícola (baby citrus) puesta sobre la bandeja de lavado (bastidor de madera con malla mosquitera) y lavado con abundante agua dulce hasta la eliminación tanto de la tierra como de la arena. Una vez limpia, la malla fue levantada y mecida hasta eliminar el exceso de agua. La biomasa fue pesada en una balanza digital marca TEC de $\pm 0,5$ g de precisión y parte de ella dispuesta en bandejas (300 g) para su posterior secado en el deshidratador solar. Otra parte de la biomasa fue empacada al vacío (100 g aprox.) y posteriormente fueron congeladas para su envío al Laboratorio de Genética & Acuicultura para ser liofilizada. La biomasa recolectada durante la temporada 2005-2006 fue llevada y lavada en el laboratorio para luego parte ser dispuesta en bandejas y secada en una repisa con ayuda de un termoventilador para finalmente ser envasada al vacío en

paquetes de 5g. La biomasa restante fue envasada para ser congelada en porciones de 150 g.

2.28. Prueba de empaque de quistes y biomasa

Tanto los quistes como la biomasa de *Artemia* fueron envasados utilizando una máquina selladora de vacío DZ 500 T. Para el envasado se probaron bolsas metalizadas de tres capas y PVC de 15 µm de espesor. Para cada uno de los materiales antes mencionados se realizaron ensayos con 4 tiempos de vacío (10, 20, 25 y 40 seg), y 3 temperaturas (baja, media y alta) y tiempos de sellado (1,5 - 1,8 y 2,0 seg).

Cabe señalar que los ensayos se realizaron buscando sólo la eficacia mecánica del envase, ya que la eficacia de cada uno de estos materiales respecto de la mantención de condiciones óptimas de humedad, sólo puede ser evaluada en el tiempo sobre la base de la calidad de los quistes (porcentaje, sincronía y tasa de eclosión).

2.29. Pruebas de secado de quistes

En el período que abarca este informe se desarrollaron tres pruebas de secado de quistes. En la primera, efectuada durante la primera temporada los quistes fueron secados a temperatura ambiente sobre bandejas dispuestas en una repisa construida para tales efectos. Otra prueba fue ejecutada entre los días 16 y 18 de marzo de la temporada 2004-2005, en ella se dispusieron 1.236,2 g de quistes (peso húmedo) en el secador solar distribuidos en 8 bandejas. La carga de quistes por bandeja fluctuó entre los 146 y 225 g, con un promedio de 155 g/bandeja. Para efectos del posterior análisis de datos, se igualó 1 día de secado con 8 horas de estadía en el deshidratador. La última medición se efectuó a las 17:30 hr, momento del día en que el deshidratador ya no recibía radiación solar. Al anochecer los quistes permanecieron en el deshidratador, con el fin de establecer si éstos se humedecían, lo que fue verificado al pesar a la mañana siguiente las bandejas con quistes antes de que comenzara a aumentar la temperatura en el horno de secado.

Durante todo el proceso de secado se tuvo especial cuidado de que la temperatura al interior del horno nunca excediera los 40° C, lo que fue monitoreado con un termómetro ubicado en la puerta del deshidratador. Cuando la temperatura estuvo cercana al valor

crítico antes señalado, además de abrir totalmente los 4 templadores, el colector de calor fue cubierto parcialmente con malla Rachel.

La última prueba de secado se realizó en la temporada 2005-2006, aquí se introdujo aire caliente a la repisa de secado modificada por medio de un termocalefactor eléctrico hasta alcanzar peso constante.

2.30. Pruebas de secado de biomasa

La primera prueba de deshidratado de biomasa desarrollada durante la temporada 2004-2005 se realizó con 2.025 g de biomasa húmeda que fue distribuida entre 4 bandejas sobre una tela de batista. La carga promedio fue de 506,25 g/bandeja. La segunda prueba se ejecutó con 2.228 g de biomasa húmeda, la que se distribuyó en 6 bandejas (3 con tela batista y 3 con malla "baby citrus"). La carga promedio en las bandejas con tela fue de 343 g y de 400 g en las bandejas con malla "baby citrus".

Durante ambos ensayos la temperatura dentro del horno de secado fue monitoreada cada 1 hora con el termómetro ubicado en la puerta del deshidratador, momento en que además se pesó la biomasa contenida en las bandejas. La temperatura al interior del horno de secado se mantuvo bajo las mismas condiciones que en el secado de quistes. A diferencia de la segunda temporada, durante el periodo correspondiente a la extensión la biomasa fue secada en la repisa de secado modificada con aire caliente generado por un termoventilador eléctrico. La temperatura alcanzada dentro del secador estuvo alrededor de los 35 °C.

2.31. Cosecha de sal

La cosecha de sal se llevó a cabo cada 30 días aproximadamente, a partir de fines del mes de enero. Esta actividad fue ejecutada por el trabajador salinero quien debió, en primer lugar, extraer el exceso de agua desde los cristalizadores para luego poder apilar la sal y finalmente sacarla del cristalizador con ayuda de una carretilla. La sal cosechada fue apilada en un sitio aledaño la salina habilitado para dicho fin.

2.32. Contacto con eventuales compradores

Se enviaron muestras de quistes (2 y 4 g) y biomasa (30 y 50 g) de *Artemia* (liofilizada y deshidratada) a personas e instituciones vinculadas con actividades de cultivo (experimentales y comerciales) con el fin de que evaluaran el uso de los productos como eventuales dietas para el organismo que cultivan. Junto con las muestras se adjuntó el análisis de calidad emitido anteriormente por el Artemia Reference Center (U. de Gante).

2.33. Prueba de cultivo de *Artemia* durante el invierno

A fines del mes de junio de 2005 en el laboratorio de Barrancas se instaló a la intemperie un estanque circular con una capacidad de 10,17 m³. Luego éste fue llenado parcialmente con 6 m³ de agua de mar con una temperatura de 12° C y salinidad de 37 ppt a la que se adicionó sal hasta lograr una salinidad de 42 ppt. Posteriormente se agregó 1 Kg de fertilizante (Enhance algae) y un inóculo de 20 l de *Dunaliella salina* (cepa local). Paralelamente, se pusieron a eclosionar 4 g de quistes producidos durante el verano. Pasados tres días desde la inoculación con *D. salina*, el estanque evidenciaba un florecimiento de algas, momento en el cual fueron inoculadas las nauplios de *Artemia* a una densidad de 100 larvas/l. En abril de 2006 se repitió la experiencia de cultivo para la estación invernal con algunas diferencias como el número de estanques utilizados, que esta vez fueron 3 de 10,17 m³. Otra diferencia fue la alimentación, que esta vez estuvo constituida por una mezcla de 6 litros de *D. Salina* y 35 g de levadura de panificación por estanque. Esta mezcla fue suministrada diariamente por las mañanas en una sola ración.

La cosecha de los estanques se realizó por raleo, para lo que se usó una quecha fabricada con malla baby citrus de manera que retuviera principalmente juveniles y adultos. Para llevar a cabo la cosecha sin bombear el agua de los estanques se realizó de noche aprovechando la respuesta positiva de *Artemia* frente a la luz, para lo que se utilizó un foco y un tubo de PVC para concentrar el haz de luz. Transcurridos aproximadamente 30 minutos *Artemia* se concentró en la zona iluminada desde donde fue fácilmente colectada.

2.34. Difusión

De acuerdo a lo propuesto como actividades de difusión a desarrollar durante la primera temporada, se prepararon tres charlas expositivas en las localidades de Barrancas, Lo Valdivia (comuna de Paredones) y Pichilemu, los días 26 de junio, 3 y 9 de julio de 2004, respectivamente. Las dos primeras charlas se dictaron para los salineros quienes fueron convocados por medio de avisos radiales e invitaciones personales. La charla realizada en Pichilemu se pensó como una actividad de carácter institucional, razón por la cual se cursaron invitaciones a las autoridades locales así como también a los representantes de organismos públicos y privados vinculados a la producción. Mientras que para la segunda temporada productiva se realizó una actividad de difusión a través del programa televisivo Frutos del País el día 18 de febrero de 2005. Además se efectuó una charla de carácter institucional el día 30 de septiembre de 2005, en la pista municipal de Pichilemu.

En el periodo contemplado en la extensión del proyecto se llevaron a cabo las siguientes actividades de difusión: i) una charla de carácter informativo para la Asociación de Acuaristas de Chile (ACDA) el día 3 de septiembre de 2005; ii) visita en terreno el día 7 de enero de 2006; iii) firma de un convenio de cooperación con dicha institución el 3 de abril de 2006; iv) entrevista para el programa Tierra Adentro el 9 de febrero de 2006 (hasta el momento no ha sido transmitido); y v) a petición de los profesores del taller de ciencias del Liceo Agustín Ross de Pichilemu se realizó una charla expositiva el día 5 de julio de 2005. Las actividades de difusión se hicieron teniendo como objetivo dar a conocer las actividades desarrolladas en el marco del proyecto durante su ejecución, así como también sus principales resultados y proyecciones.

2.35. Movimiento de tierra

Con el objetivo de evitar o disminuir la inundación invernal de las salinas por la crecida del estero Nilahue se realizaron movimientos de tierra con maquinaria pesada para emparejar y rellenar los montículos de tierra que circundan la salina El Pilón.

Los trabajos se realizaron durante 15 días y el resultado final fue la creación de un pretil de 3 m de alto y 3 m de ancho en la corona, de manera que se posibilita el tránsito con un vehículo alrededor de la salina.

2.36. Validación de modelo predictivo de producción de quistes

Con el objetivo de poder estimar con un grado de certeza razonable (80%) la producción de quistes por medio de la densidad poblacional en un régimen de cultivo multiciclo se puso en práctica el método de muestreo propuesto por Baert et al. (2002). Este consiste en tomar muestras de biomasa de *Artemia* en la columna de agua con una red para muestreo de zooplancton. Las muestras obtenidas son aforadas en una probeta eliminando el exceso de agua para registrar el volumen de la muestra, que posteriormente es introducido en la curva de regresión (1) para obtener una estimación de la producción de quistes de la población existente en el estanque.

$$(1) \log (0,01 + \text{quistes cosechados}) = -3,613 + 0,021 * (\text{volumen biomasa})$$

3. Actividades del Proyecto:

Originalmente el proyecto contemplaba la ejecución de 80 actividades durante todo su desarrollo. De ellas sólo se realizaron 72, lo que significa que la eficacia lograda fue de un 90%. Sin embargo, en estricto rigor la eficacia lograda debiera ser 95%, ello dado que las actividades no realizadas fueron sólo 4, pero de carácter repetitivo, es decir debían realizarse durante las dos temporadas. Las actividades no ejecutadas corresponden a: i) secado de corralones; ii) desbarre de corralones; iii) fertilización de corralones; y iv) aclimatación de nauplios (larvas). Como se indicó oportunamente², el secado, desbarre y fertilización de los corralones no se realizó debido a que la inundación invernal se mantuvo hasta muy entrada la temporada, por tanto su ejecución habría significado el retraso de todo el resto del programa.

Por otra parte, durante la ejecución del proyecto se llevaron a cabo una serie de actividades que no estaban contempladas originalmente y que corresponden a:

- i) Cultivo de microalgas en el laboratorio y su posterior amplificación en estanques sancochadotes y de cultivo en las salinas. Estas actividades incluyen los eventos de fertilización e inoculación de los estanques. La necesidad de ejecutar estas tareas tiene su origen en la imposibilidad de realizar los trabajos de limpieza y desbarre de los

² Informe N° 1. Ítem 3, páginas 4 -5.

corralones con maquinaria pesada (estanques acumuladores) sino hasta muy entrada la temporada.

- ii) Profundización de estanques para el cultivo de *Artemia*. Debido a que las densidades de cultivo planteadas originalmente no dieron los resultados esperados, se decidió aumentar el volumen de agua disponible para cultivo como una forma de paliar la baja en la producción. Así, la forma para incrementar el volumen disponible fue la profundización de estanques tanto por la vía de la excavación como por el levantamiento de los pretilos.
- iii) Construcción de secador solar. Este artefacto se diseñó y creó dado que el tiempo de secado de los quistes a temperatura ambiente no era lo suficientemente rápido ni homogéneo. La construcción de este artefacto, trajo asociadas todas aquellas actividades relacionadas con la evaluación de la eficacia y eficiencia de este medio de secado.
- iv) Prueba de cultivo invernal. Como una forma de prospectar la factibilidad de extender el cultivo de *Artemia* más allá de la temporada estival, se implementó una experiencia de cultivo. Posteriormente, esta prueba se formalizó a través de una extensión del proyecto.

Tabla 3. Tareas ejecutadas durante el período comprendido entre noviembre de 2003 y junio de 2004.

Objetivo específ. Nº	Actividad Nº	Año	Descripción
8.2.1	1	2003	Construcción laboratorio (55 m ²)
8.2.1	2	2003	Equipamiento de laboratorio (instalación de estanques, energía eléctrica y red de aire)
8.2.1	6	2003	Desbarrado de calles y canales (salinas 1 y 2)
8.2.1	7	2003	Modificación de estanques (profundización)
8.2.1	8	2003	Llenado de estanques
8.2.2	1	2003	Llenado de corralones
8.2.2	2	2003	Monitoreo diario de variables abióticas (salinidad y temperatura)
8.2.3	1	2003	Caracterización morfológica, cariológica y electroforética de la cepa local de <i>Artemia</i>
8.2.4	1	2003	Obtención de quistes para inoculación
8.2.14		2004	Gira tecnológica a salinas de Grossos (Brasil)
		2003- 2004	Cultivo de microalga <i>Dunaliella</i> sp. en laboratorio
		2004	Fertilización de estanques sancochadores
		2004	Inoculación de estanques sancochadores con microalga <i>Dunaliella</i> sp.
8.2.4	2	2003	Eclosión de quistes
8.2.4	3	2003	Evaluación de quistes
8.2.4	5	2003	Transporte de larvas
8.2.4	6	2003	Inoculación de larvas
8.2.4	7	2003	Monitoreo y control de la población de <i>Artemia</i>
8.2.6	1	2003	Construcción de tamices
8.2.6	2	2003	Construcción de secadores
8.2.12	1	2003	Montaje de ensayo en Osorno
8.2.12	2	2003	Decapsulación de quistes (Osorno)
8.2.12	3	2003	Monitoreo
8.2.6	1	2004	Recolección de quistes
8.2.6	2	2004	Limpieza de quistes
8.2.6	3	2004	Secado de quistes
8.2.7	1	2004	Cosecha de biomasa
8.2.7	2	2004	Procesamiento de biomasa
8.2.9	1	2004	Cosecha de sal
8.2.9	2	2004	Evaluación de calidad de sal cosechada
8.2.10	1	2004	Preparación charla informativa

Tabla 4. Tareas ejecutadas entre junio de 2004 y octubre de 2004.

Objetivo específ. Nº	Actividad Nº	Año	Descripción
8.2.7.	2	2004	Procesamiento de biomasa (deshidratado)
8.2.10	1	2004	Preparación de charlas expositivas.
8.2.10	1	2004	Realización de charlas expositivas.
8.2.11	1	2004	Establecimiento de contactos con posibles compradores.
8.2.11	2	2004	Envío de muestras a eventuales compradores. Envío de muestras de quistes al ARC (U. de Gante, Bélgica).
8.2.6.	4	2004	Evaluación de calidad de quistes cosechados (U. de Gante, Bélgica)
8.2.1	5	2004	Arreglo de compuertas.
8.2.4	6	2004	Desbarrado de calles y canales.
8.2.1	7	2004	Llenado de estanques.
8.2.2	1	2004	Llenado de corralones.
8.2.5	1	2004	Mantenimiento del sistema de distribución de agua y parapetos. Cultivo de microalgas en laboratorio. Profundización de estanques: i) excavación; y ii) levantamiento de parapetos Fertilización de estanques para cultivo de microalgas.

Tabla 5. Tareas ejecutadas entre octubre de 2004 y abril de 2005.

Objetivo específico Nº	Actividad Nº	Año	Descripción
		2004 - 2005	Modificación de estanques
8.2.1	7	2004	Llenado de estanques
8.2.2	1	2004	Llenado corralón
8.2.2	2	2004 - 2005	Fertilización estanques
8.2.2	3	2004 - 2005	Monitoreo de salinidad
8.2.2	4	2004 - 2005	Seguimiento del desarrollo algal
8.2.4	1	2004 - 2005	Decapsulación de quistes
8.2.4	3	2004 - 2005	Transporte de larvas
8.2.4	4	2004 - 2005	Inoculación de larvas
8.2.4	5	2004 - 2005	Monitoreo de la población de <i>Artemia</i> inoculada
8.2.5	1	2005	Recolección de quistes
8.2.5	2	2005	Limpieza de quistes
8.2.5	3	2005	Secado de quistes
8.2.5	4	2005	Evaluación de quistes
8.2.5	5	2005	Almacenamiento de quistes
8.2.6	1	2005	Cosecha de biomasa
8.2.6	2	2005	Procesamiento de biomasa (congelado, deshidratado por calor y liofilización)
8.2.8	1	2004	Prueba de envasado de quistes
8.2.8	2	2004	Prueba de envasado de biomasa
8.2.8	1	2005	Cosecha de sal
8.2.11	1	2004	Contactos con eventuales compradores
		2005	Construcción de deshidratador solar

	2005	Prueba de materiales para bandejas de deshidratador solar
	2005	Pruebas de deshidratado de quistes
	2005	Pruebas de deshidratado de biomasa

Tabla 6. Tareas ejecutadas entre mayo y septiembre de 2005.

Objetivo específico Nº	Actividad Nº	Año	Descripción
		2005	Montaje de cultivo experimental durante el invierno
		2005	Pruebas de eclosión en ULA (Osorno)
		2005	Seguimiento genético cepa cultivada en Pichilemu
		2005	Preparación Informe final
		2005	Charla de difusión en Asociación de acuaristas de Chile (ACDA)
		2005	Preparación charla final
		2005	Charla de difusión en Pichilemu

Tabla 7. Tareas ejecutadas entre octubre de 2005 y julio de 2006.

Objetivo específico Nº	Actividad Nº	Año	Descripción
5.a	1	2005	Desbarrado de calles y canales
5.a	2	2005	Arreglo de compuertas
5.a	4	2005	Mantenimiento sistema de distribución de agua y diques
5.a	3	2005	Llenado de corralón
5.b	1	2005	Mantenimiento de estanques modificados (profundizados y parapetos levantados)
5.b	2	2005	Compactación del piso de los estanques modificados
5.b	3	2005	Recubrimiento de estanques modificados (6 con

5.a	5	2005	parapetos levantados) con polietileno Llenado de estanques
5.c	1	2005- 2006	Fertilización estanques para microalgas
5.c	2	2005- 2006	Seguimiento del desarrollo algal
5.a	6	2005- 2006	Monitoreo salinidad y temperatura
5.a	7	2006	Decapsulación de quistes
5.a	8	2006	Evaluación eclosión
5.a	9	2006	Transporte de larvas
5.a	10	2006	Inoculación de larvas
5.d	1	2006	Monitoreo y control población de Artemia
5.d	2	2006	Validar sistema predictivo de la producción de quistes sobre la base de la biomasa existente
5.e	1	2006	Recolección de quistes
5.h	1	2006	Evaluación tiempo de permanencia de los quistes en los estanques
5.h	2	2006	Evaluación del tiempo de permanencia de los quistes en salmuera
5.h	3	2006	Almacenamiento de quistes
5.h	4	2006	Limpieza de quistes
5.h	5	2006	Centrifugado de quistes
5.h	6	2006	Secado de los quistes
5.h	7	2006	Evaluación tiempo de secado de los quistes
5.f	1		Cosecha de biomasa salinas
5.g	1	2006	Montaje de estanques de 10 m ³ en laboratorio
5.g	2	2006	Llenado estanques de 10 m ³ en laboratorio
5.g	3	2006	Cosecha de biomasa laboratorio
5.f	1		Procesamiento de biomasa (congelado, deshidratado por calor y liofilización)
5.f	2		Envasado de biomasa
5.i	1		Evaluación de la calidad de los quistes y biomasa
5.j		2005- 2006	Contactos con eventuales compradores
		2006	Movimiento de tierra para emparejar y rellenar montículos circundantes a las salinas
		2006	Cosecha de sal
			Charla Liceo Agustín Ross
		2006	Elaboración y entrega de informe final

4. Resultados del Proyecto:

1. Modificación de estanques

La profundización parcial realizada en los estanques, independiente de su forma (perimetral, longitudinal o transversal) demostró eficacia. Vale decir, proveyeron a *Artemia* de un ambiente más estable, posibilitando tanto su sobrevivencia como reproducción (vivípara y ovovivípara) a lo largo de la temporada. Esta primera aproximación además de permitir verificar la hipótesis sugerida (Informe Técnico Programa de Consultores Calificados CO-V-2002-1-D-19)³, sirvió para vencer los temores existentes entre los trabajadores de las salinas, respecto del impacto negativo que tendrían las modificaciones sobre la producción de sal.

En general, todos los estanques profundizados totalmente presentaron problemas de pérdida de agua por infiltración, siendo más severa en aquellos en que se levantaron los parapetos. En éstos, la pérdida fue de aproximadamente un 50% del volumen total en 48 horas, impidiendo que pudieran utilizarse para el cultivo de *Artemia* y microalgas. En tanto que la pérdida de agua por infiltración en los estanques excavados fue menor (aproximadamente un 20% del volumen en 5 días). La compactación del fondo de los estanques profundizados por medio del levantamiento de pretilos usando una placa vibradora (Figura 3^a y 3^b) no dio los resultados esperados, al igual que la impermeabilización con mangas de polietileno de 2 m traslapadas. Sin embargo, se obtuvieron buenos resultados utilizando el recubrimiento con mangas de polietileno de 4 m de ancho traslapadas, y sellada en la unión con cinta para impermeabilización de tuberías 3M (Figura 4).

³ La baja densidad de *Artemia* podría explicarse por la poca profundidad de los estanques, lo que redundaría en la generación de condiciones de temperatura extrema que acarrearían grandes mortalidades. A ello, se suma el manejo del agua, pensado para la producción de sal, no de *Artemia*. Cabe señalar que *Artemia* se encuentra preferentemente en los estanques resancochadores (previos a los cristalizadores), de manera que una vez que el agua reúne las condiciones adecuadas es conducida al cristalizador, donde tanto *Artemia* como sus quistes se pierden.



Figura 3. a) Placa compactadora. b) Compactación de los estanques para prevenir la pérdida de agua por infiltración.



Figura 4. Estanque recubierto con mangas de polietileno de 4 m de ancho traslapadas y selladas con cinta para impermeabilización de tuberías.

2. Llenado de corralones y estanques

Usualmente las salinas "El Pílon" operan con dos corralones ubicados al noreste del sitio, sin embargo, desde fines de enero de 2005 sólo se utilizó el corralón pequeño debido a un aumento en la tasa de infiltración en éste (presumiblemente por un notable descenso

en el nivel de la laguna). Las consecuencias directas de esta situación fueron: i) el ingreso de agua de menor salinidad al sistema a causa del menor tiempo de exposición y por ende de evaporación a la que ésta se vio sometida; y ii) la periodicidad con que debió llenarse el corralón (cada dos semanas) dado su tamaño, lo que redundó en un mayor tiempo de uso de motobomba y de consumo de combustible.

El llenado de estanques se realizó sin mayores inconvenientes, salvo por el hecho de que debieron ser reabastecidos con mayor frecuencia de la que se tenía previsto, a causa de los problemas de infiltración expuestos anteriormente. Así, los estanques excavados pudieron mantenerse con una columna de agua de 0,4 m en promedio, mientras que aquellos con parapetos sólo fue posible mantenerlos con una profundidad promedio de 0,3 m.

3. Monitoreo de variables abióticas

La salinidad promedio durante la primera temporada del proyecto fue de 18,0; 14,0 y 17,1° Bé (grados Baumé) en los estanques con modificaciones transversales (CT), perimetrales (PT) y longitudinales (CL), respectivamente. Mientras que las temperaturas promedio durante el mismo periodo alcanzaron los 28,8; 26,2 y 27,0° C en los estanques con modificaciones transversales (CT), perimetrales (PT) y longitudinales (CL), respectivamente (Figura 5). Durante la temporada 2004-2005 las salinidades promedio en las unidades productivas CT1, CT2 y CT3 fueron de 11,5; 13,5 y 12,3 ° Bé, respectivamente. Mientras que las temperaturas promedio por estanque fueron de 23,3; 22,5 y 22,2° C (Figura 6). Finalmente, para la temporada 2005-2006 las salinidades promedio registradas en los estanques CT1, CT2, CT3 y PT1 fueron de 10,1, 11,7, 11,4 y 10,8 °Be respectivamente. Mientras que las temperaturas promedio registradas en los mismos estanques fueron de 20,3, 20,8, 21,5 y 21,4 °C (Figura 6).

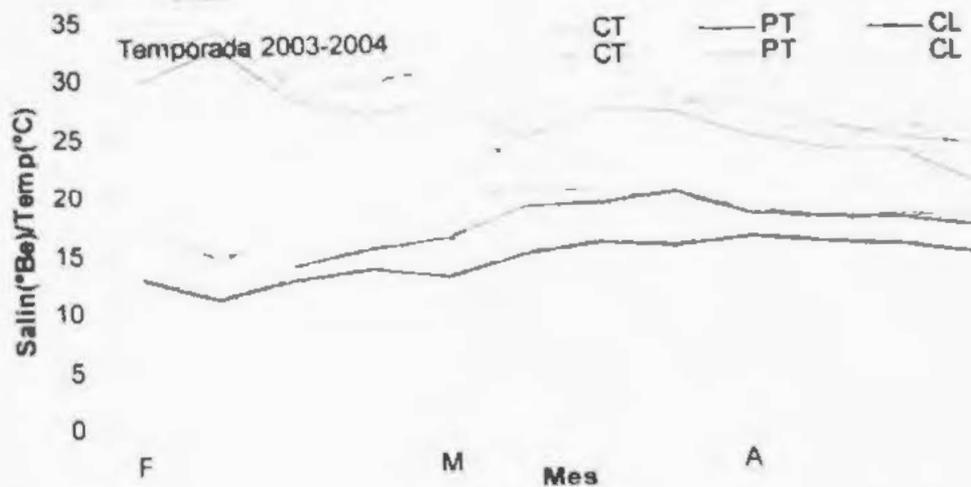


Figura 5. Muestra las salinidades y temperaturas semanales promedio durante el periodo productivo 2003-2004.

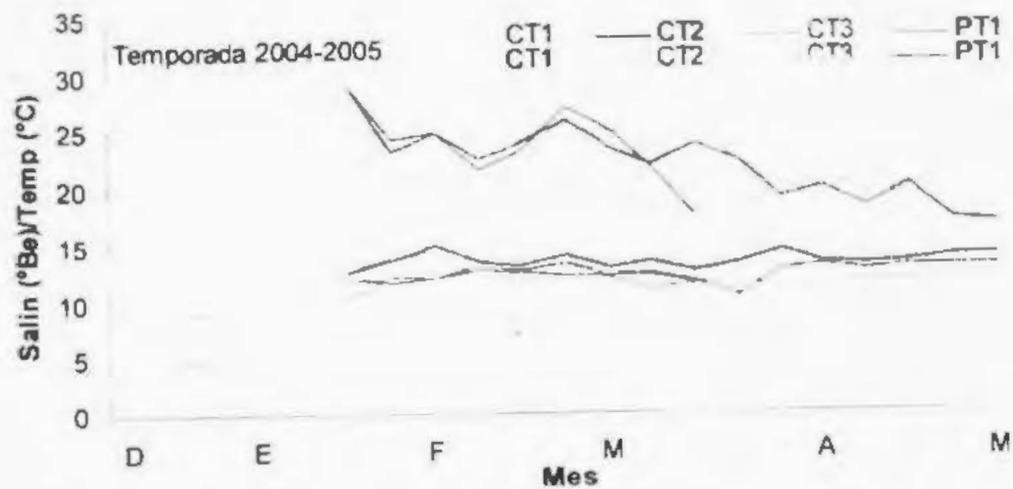


Figura 6. Muestra salinidades y temperaturas promedio registradas en las unidades de cultivo durante la temporada 2004-2005.

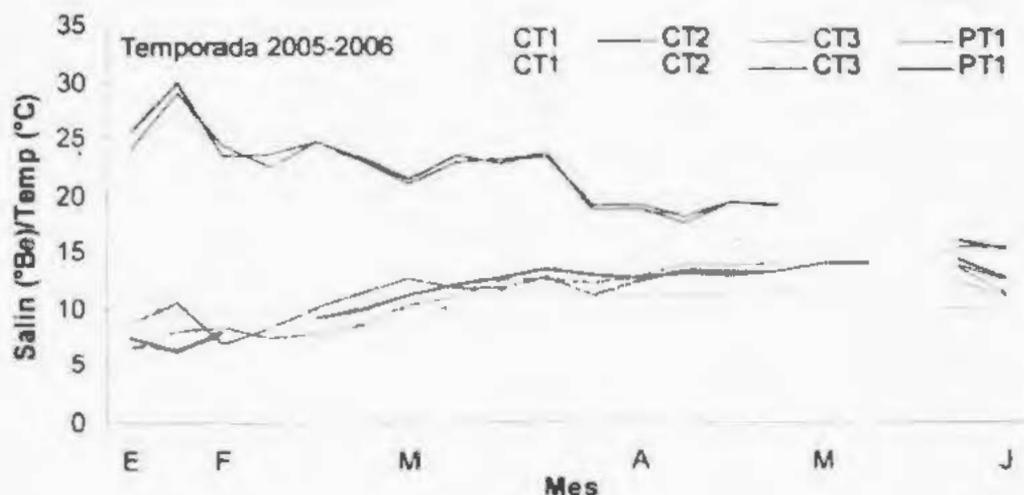


Figura 7. Muestra salinidades y temperaturas promedio registradas en las unidades de cultivo durante la temporada 2005-2006.

La evolución de otras variables abióticas medidas durante las temporadas productivas (2003-2004; 2004-2005 y 2005-2006) tales como temperatura ambiente (TA), sensación térmica (ST), velocidad promedio del viento (VP) y velocidad máxima del viento (VM), son mostradas en la Figura 8, 9 y 10, respectivamente.

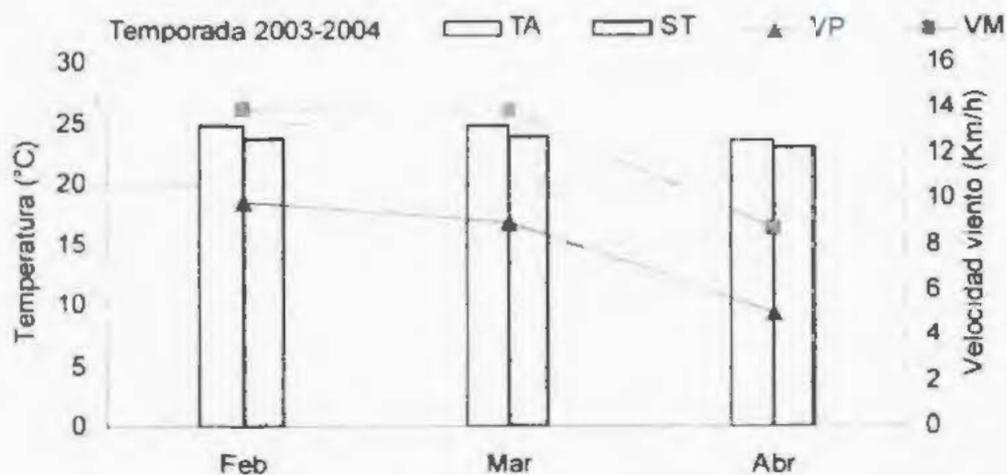


Figura 8. Evolución de variables ambientales durante la temporada productiva 2003-2004. TA: temperatura ambiente; ST: sensación térmica; VP: velocidad de viento promedio; y VM: velocidad máxima del viento.

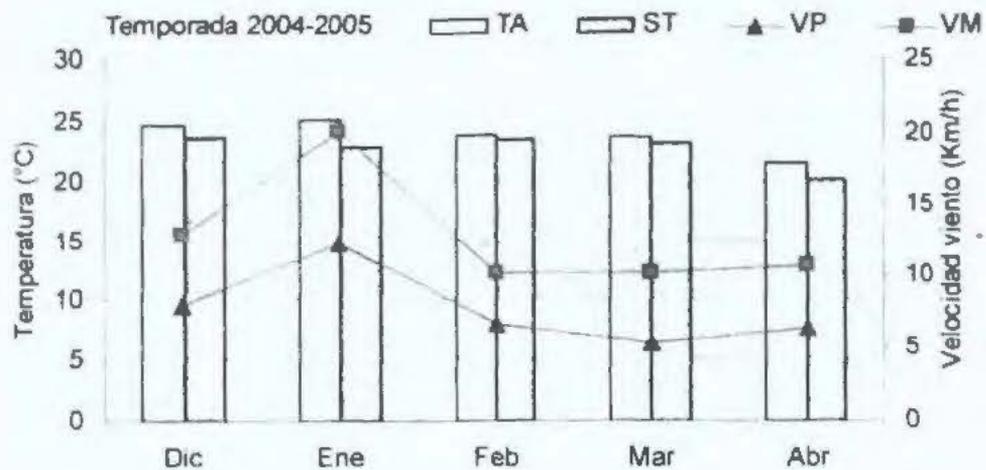


Figura 9. Evolución de variables ambientales durante la temporada productiva 2004-2005. TA: temperatura ambiente; ST: sensación térmica; VP: velocidad de viento promedio; y VM: velocidad máxima del viento.

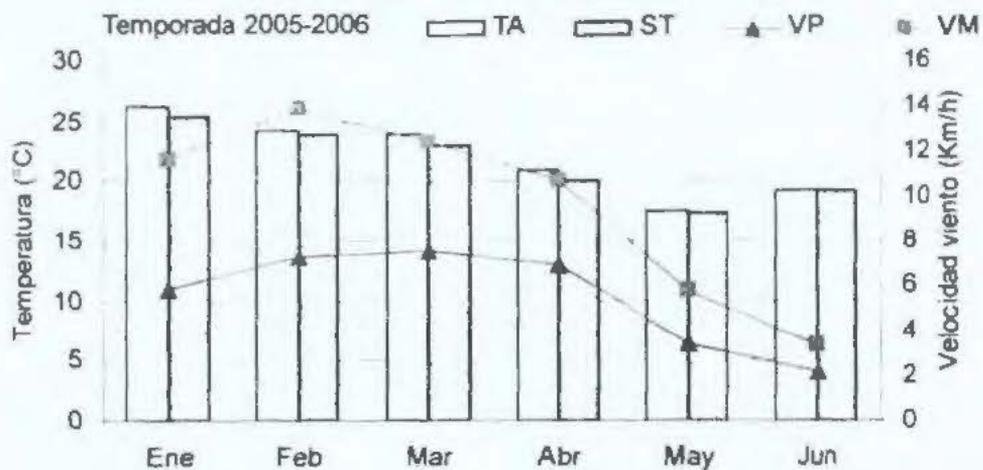


Figura 10. Evolución de variables ambientales durante la temporada productiva 2005-2006. TA: temperatura ambiente; ST: sensación térmica; VP: velocidad de viento promedio; y VM: velocidad máxima del viento.

4. Caracterización de la cepa local de *Artemia* Resultados Temporada 1 (2003-2004)

4.1 Análisis morfológico

Los resultados morfológicos están reflejados en la Figura 11 a continuación en la cual se compara la población de Pichilemu (PCH-2003) disponible en el lugar previo a la inoculación con el resto de las poblaciones de la BD, incluyendo a una población obtenida del lugar hace varios años atrás (PCH). La muestra PCH-2003 (cada individuo indicado con un 9) se asocia con San Francisco Bay (número 1 en el gráfico), USA, en el cuadrante superior derecho). En cambio la muestra de PCH antigua disponible en el laboratorio (de lugar indeterminado) se asocia con la muestra de referencia de *A. persimilis* (cuadrante superior izquierdo). Este último resultado confirma la necesidad señalada precedentemente en cuanto a monitorear las características de la población en años sucesivos.

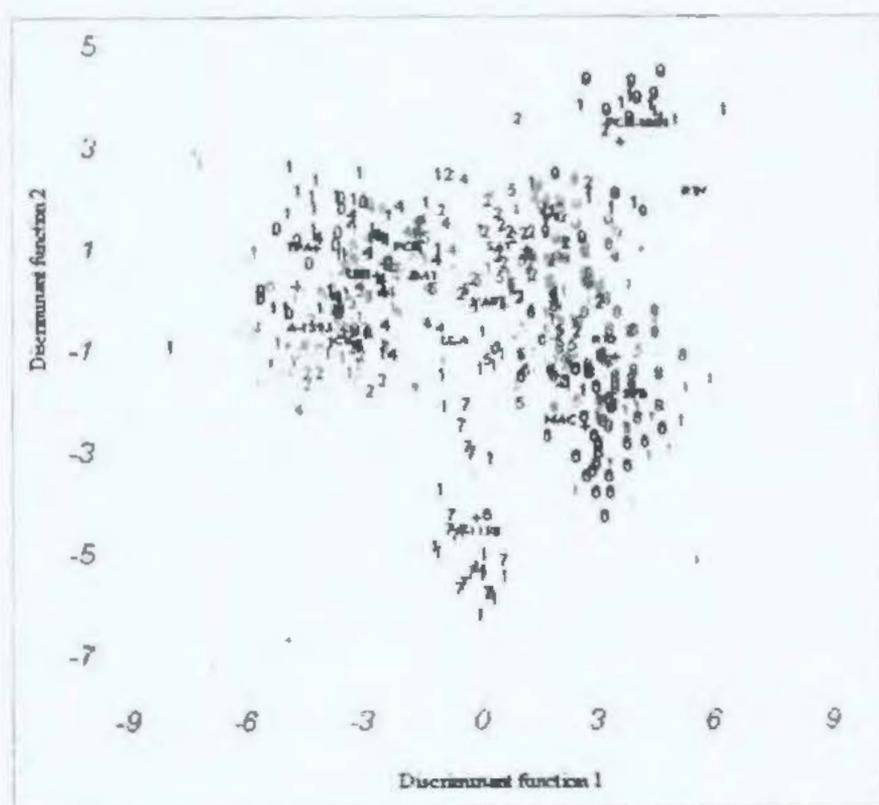


Figura 11. Análisis discriminante en base a caracteres morfológicos entre *A. franciscana* (SFB) y cepa local (PCH-2003, PCH) y *A. persimilis*.

consistente, pero refrenda aún más la necesidad de realizar los estudios que fueron considerados en el proyecto.

Tabla 8. Determinación del número cromosómico en tres poblaciones de *Artemia*.

Etapa meiosis	Meiosis	Poblaciones		
		RIN	CIS	PCH-2003
Metafases I y II	2n			
	18		1	
	19	1		
	20	2		2
	21	26	1	13
	22	11	19	6
	23	1	5	2
	24	1	1	1
	31		1	
Proliferación espermatogonial	34	1		
	37			1
	39	3		
	40	2		1
	41	5		
	42	8	1	5
	43	2		1
	44		1	2
	45			3
Total placas analizadas		63	30	37

Tabla 9. Resumen determinación del número de cromocentros en tres poblaciones de *Artemia*

Cromocentros	RIN	CIS	PCH-2003
X ± D.E.	9.50 ± 1.91	9.86 ± 1.44	1.85 ± 1.37
Nº núcleos analizados	35	30	30
Tipo de Heterocromatina	Abundante	Abundante	Débil

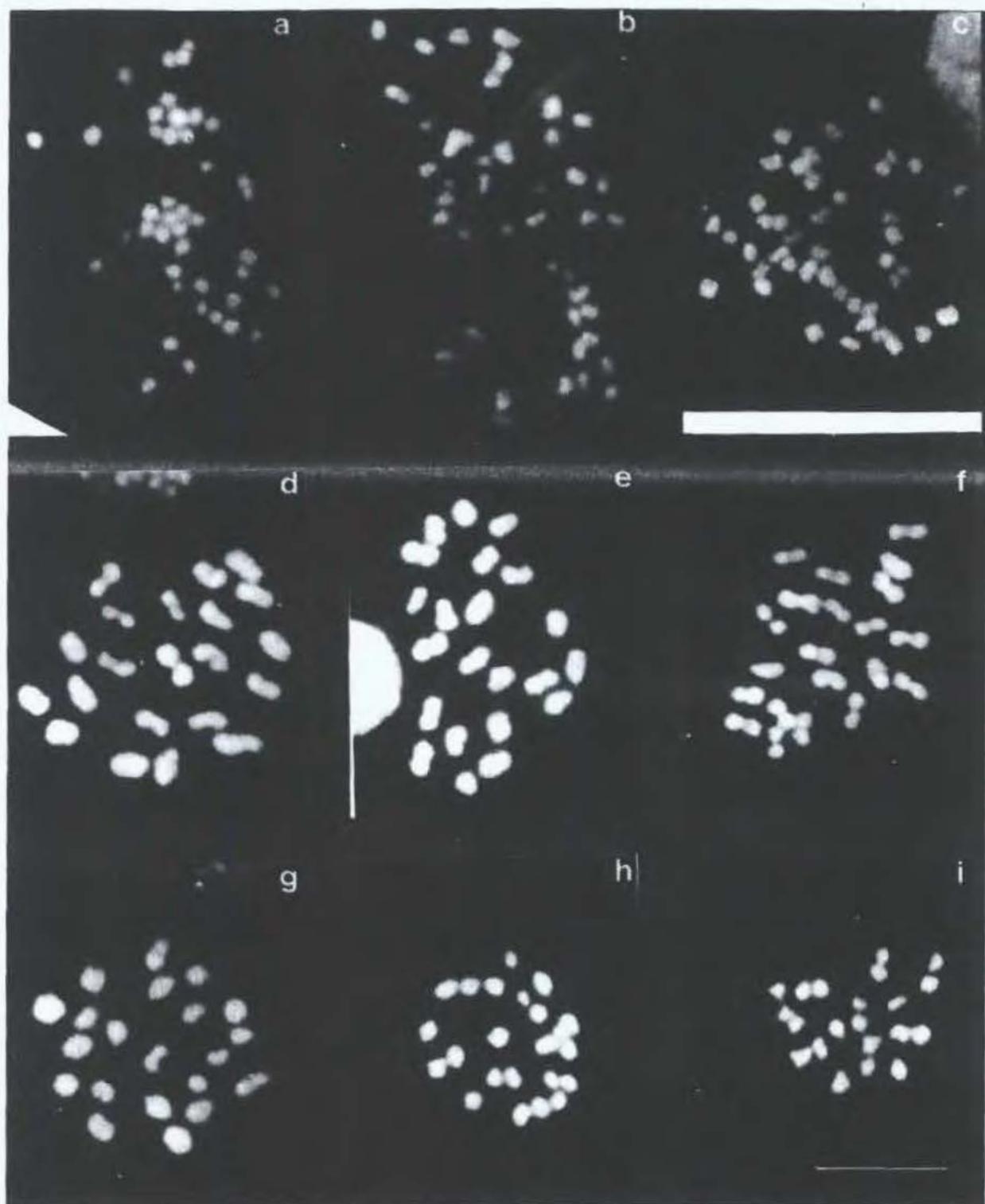


Figura 14. Cromosomas meióticos de tres poblaciones *Artemia* teñidos con Hoechst 33258. Rinconada a) proliferación espermatogonial; $2n = 42$, d) metafase I; $n = 21$ y g) metafase II; $n = 21$; Cisne; b) proliferación espermatogonial; $2n = 44$, e) metafase I; $n = 22$ y h) metafase II, $n = 22$ y Pichilemu-2003; c) proliferación espermatogonial; $2n = 42$, f) metafase I, $n = 21$ y i) metafase II, $n = 21$. La barra representa 10 μm .

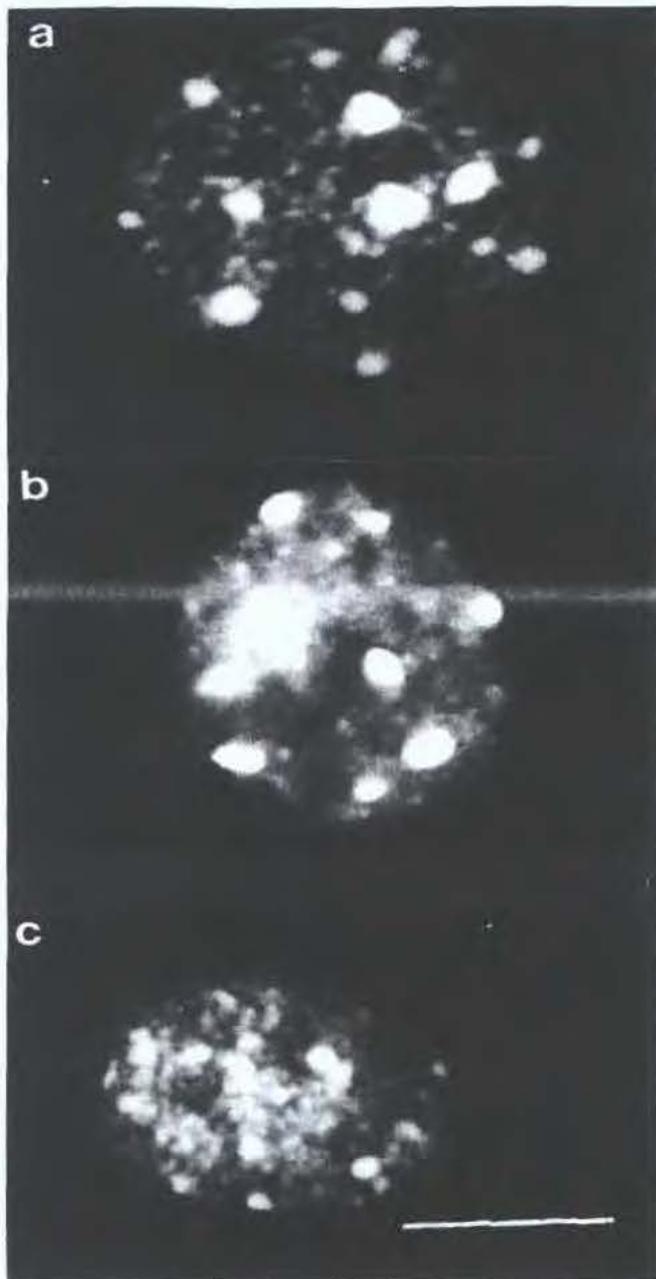


Figura 15. Cromocentros en núcleos Interfásicos en tres poblaciones de *Artemia*: a) Rinconada, b) Cisne y c) Pichilemu-2003. La barra representa 10 μm .

4.3 Análisis electroforético

Los datos de variabilidad demuestran que la población de Pichilemu (PCH-3) exhibe un promedio de 1.9 alelos por locus, un porcentaje de loci polimórficos entre 46.70 (criterio 0.95) y 53.3 (0.99) y una heterocigosidad observada de alrededor de 11 %, valores todos considerados dentro del rango habitual para *Artemia*.

Sobre la base de las distancias genéticas el análisis de Cluster (Figura 16) demuestra que la población de Pichilemu (PCH-3) se agrupa con San Francisco Bay (*A. franciscana*). En la

misma figura se incluye también la población de la discordia, obtenida con anterioridad a la realización del proyecto (de fuente y lugar desconocidos), la cual en concordancia con los datos morfológicos, cariológicos y electroforéticos se agrupa con la población de referencia de *A. persimilis*.

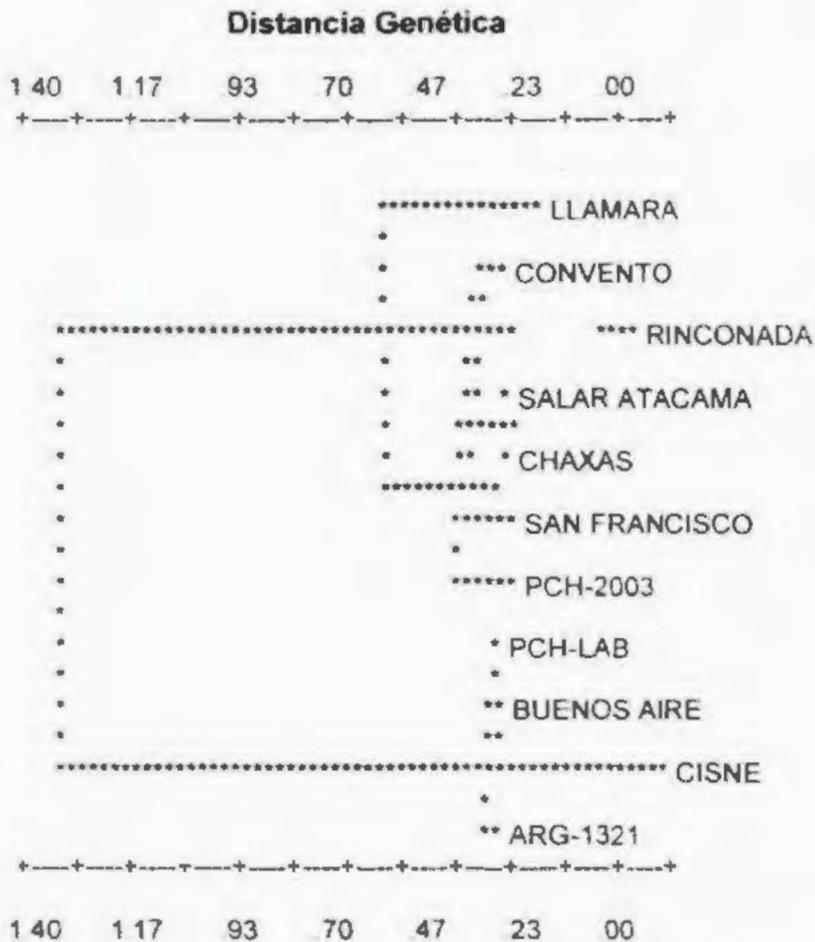


Figura 16. Análisis de Cluster usando el método de análisis UPGMA (unweighted pair group method) basado en la distancia de Nei.

Resultados Temporada 2 (2004-2005)

4.4 Análisis morfométrico de quistes y nauplios de Artemia.

El tamaño de la larva Instar I de *Artemia* reviste gran importancia al momento de elegir la cepa a utilizar como dieta. Así el cultivador busca necesariamente pequeñas presas para ofrecer a su cultivo objetivo, en este caso larvas de peces y crustáceos, que

poseen una diminuta boca, escasa capacidad natatoria y reducido tamaño. Es común que hatcheries en distintos continentes estén dispuestos a pagar elevados costos por la cepa de *A. franciscana* SS (*super small*) cuyo tamaño varía entre 410 y 420 μm . El diámetro promedio de los quistes hidratados de *Artemia* cultivada en la localidad de PIC fue de 202,8 ($\pm 8,4$) dando origen a larvas Instar I que en promedio alcanzaron las 393,9 μm ($\pm 6,1$). Ambos valores resultaron menores que los alcanzados por quistes e Instar I observados para la especie *A. franciscana* de la localidad de CEJ e incluso de la muestra SFB. Por otra parte las muestras de *A. persimilis* representadas por las poblaciones BAI y CIS excedieron ampliamente la talla alcanzada por la población de PIC (Tabla 10 y Figura 17).

Tabla 10. Diámetro de los quistes de *Artemia* y longitud total de la larva Instar I y (abreviaciones ver Tabla 1).

Población	Diámetro (μm)	SD	Longitud (μm)	SD
BAI	247,0	12,7	436,0	8,3
CIS	245,6	14,3	432,6	6,2
CEJ	212,0	13,1	432,2	8,0
SFB	204,2	13,4	407,7	4,6
PIC	202,8	8,4	393,9	6,1

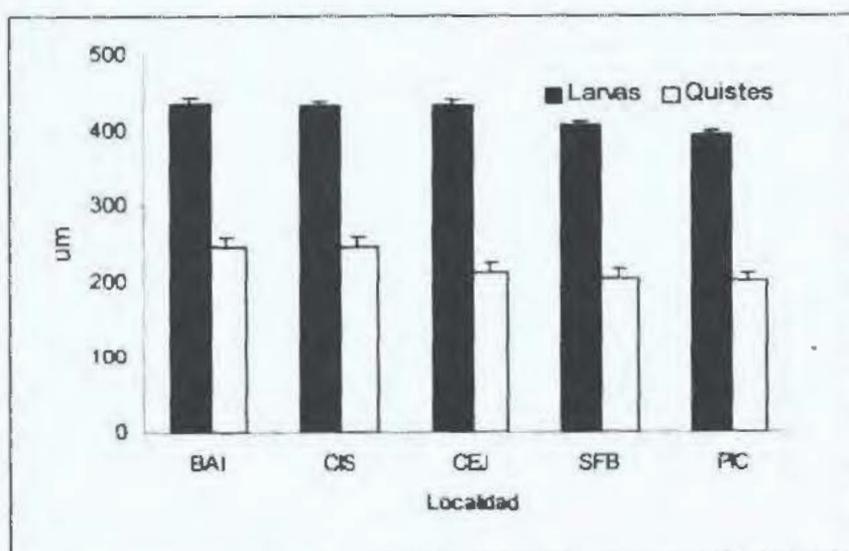


Figura 17. Longitud total ($\mu\pm\text{SD}$) y diámetro de quistes hidratados ($\mu\pm\text{SD}$) de *Artemia* de poblaciones chilenas y muestras referenciales (abreviaciones ver Tabla 6).

4.5 Análisis electroforético y molecular

Variabilidad aloenzimática fue detectada en los 9 loci resueltos a partir de los 7 sistemas enzimáticos utilizados. Un total de 49 alelos fueron identificados, siendo variables en 6 (29% locus *EST-D*) y hasta en 20 (95% loci *6-PGDH* y *PER-1*) de las 21 poblaciones estudiadas. Dentro de las muestras el número de loci polimórficos fluctuó desde 1 (11% en AMA) hasta 7 (78% en AIB) del total (9 loci) loci con un promedio de 49% (Tabla 11). Las poblaciones de *A. persimilis* (BAI, CIS, AMA) exhibieron muy bajo porcentaje de loci polimórficos (26 ± 1 ; $n=3$) comparado con el grupo de las Artemias partenogenéticas (51 ± 10 ; $n=9$), *A. franciscana* (51 ± 10 ; $n=5$), *A. salina* (67; $n=1$), *A. sinica* (56; $n=1$) y *A. tibetiana* (67; $n=1$). Cuatro loci (MDH-2, 6-PGDH, PER1 y PEP-1) exhibieron alelos privados en 5 poblaciones (CIS, LLA, CON, AIB y KAR) con frecuencias que fluctuaron entre 0,9 hasta 90.6%, mientras que alelos fijados se observaron en los loci EST-D y 6-PGDH marcando diferencias entre las especies Americanas *A. franciscana* y *A. persimilis*. La distancia de Nei (Nei, 1978) fluctuó entre 0.02 (AMA versus CIS) y 4.9 (SFB versus VIN). Las distancias entre *A. franciscana* y *A. persimilis* contra cada una y versus todas las otras especies fueron las mayores ($D > 1.0$), así como la registrada entre *A. tibetiana* y *A. sinica* fue muy pequeña y mientras que las restantes alcanzaron valores intermedios (Tabla 12).

La topología del dendrograma generado de los análisis aloenzimático confirmó la divergencia entre *A. persimilis*, *A. franciscana* y el clado de las Artemias partenogenéticas, *A. sinica*, *A. tibetiana* y *A. salina* (Figura 18). Entre las poblaciones chilenas, las de la especie *A. franciscana* se agrupan en un clado bien definido resuelto con altos valores de "bootstrapping" (todos mayores de 80%) donde se confirma la limitada distancia entre PIC y CON debido probablemente a la cercanía geográfica y el potencial número de migrantes entre ambas localidades.

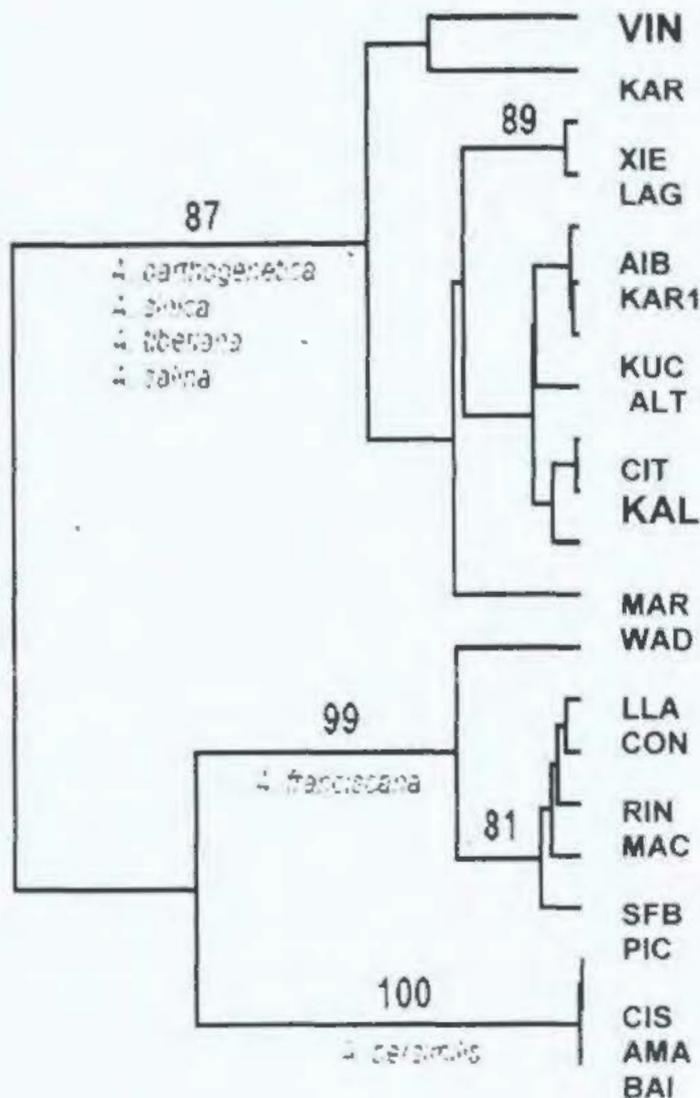


Figura 18. Dendrograma generado a partir de loci aloenzimaticos usando el método de análisis de vecindad (Neighbor-joining tree) para las distancias de Nei (1978).

El fragmento de 588bp de la subunidad I de la citocromo oxidasa c fue secuenciado exitosamente en 176 individuos registrándose un total de 42 haplotipos especie específicos (Tabla 13). *A. franciscana* arrojó el mayor número de haplotipos ($n=15$) seguido por *A. persimilis* y *A. parthenogenetica* ($n=8$) mientras que *A. tibetiana*, *A. salina* y *A. sinica* mostraron valores menores. Las poblaciones de *A. franciscana* de las localidades CON y PIC registraron haplotipos comunes lo que reafirma la similitud genética confirmada también por los loci aloenzimáticos. Por otra parte 3 haplotipos partenogenéticos estuvieron presentes en más de una población (Pg01 en QAR, CIT y KAL; Pg12 en QAR, KAR, MAR, KAL; Pg4 en todas excepto CIT). El fragmento secuenciado mutó la posición de

la primera, segunda y tercera posición de las bases en 18%, 3.6% y 91.3% respectivamente, mientras que el promedio de la composición de ellas fue de 34.2% de Timina, 23.3% de Citosina, 23.0% de Adenina y 19.5% Guanina. El dendrograma generado (Figura 19) a partir de las secuencias del fragmento mitocondrial reafirman la calidad basal de *A. persimilis* dentro del genero. Así mismo, *A. sinica*, *A. tibetiana*, *A. salina* y *A. franciscana* aparecen como un grupo monofilético hermano de *A. persimilis*.

Tabla 11. Frecuencias alélicas y resumen de estimaciones de variabilidad genética de 21 poblaciones de *Artemia* (abreviaciones ver Tabla 6).

	CON	LLA	RIN	PIC	MAC	SFB	BAI	CIS	AMA	WAD	XIE
<i>Got-2</i>											
n	37	28	31	36	13	16	2	33	3	18	17
A	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.8889	0.7059
B	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9242	1.0000	0.0000	0.0000
C	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0606	0.0000	0.0000	0.1176
D	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0152	0.0000	0.1111	0.1765
<i>MDH-1</i>											
n	49	32	43	58	12	22	42	54	29	22	26
A	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0185	0.0000	0.2273	0.9615
B	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.9815	1.0000	0.7727	0.0385
C	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>MDH-2</i>											
n	49	32	43	58	26	23	34	50	20	23	26
A	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.4783	1.0000
B	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5217	0.0000
C	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
D	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>EST-D</i>											
n	29	38	34	43	31	31	53	45	40	24	28
A	0.0172	0.9737	0.5588	0.0000	0.0000	0.0161	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
B	0.9828	0.0263	0.4412	1.0000	1.0000	0.9839	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
C	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
D	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.9643
E	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0357
<i>6-PGDH</i>											
n	25	35	38	46	29	35	49	51	39	27	9
A	1.0000	0.1143	0.9605	0.9891	0.3966	0.8000	0.0510	0.0000	0.0641	0.0000	0.0000
B	0.0000	0.0000	0.0395	0.0109	0.6034	0.2000	0.9490	0.9902	0.9359	0.0000	0.0000
C	0.0000	0.8571	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
D	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0098	0.0000	0.0000	0.0000
E	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0185	0.1667
F	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2963	0.1833
G	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2407	0.3000
H	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2593	0.2833
I	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1852	0.0667
J	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>PER-1</i>											
n	49	34	35	48	24	20	39	36	48	28	28
A	0.0000	0.0000	0.1571	0.0000	0.0000	0.0500	0.0256	0.0278	0.0000	0.3214	0.3214
B	0.6531	0.5735	0.7429	0.9479	0.6875	0.5000	0.1282	0.0278	0.0000	0.6429	0.6250

C	0.0102	0.0000	0.0000	0.0312	0.0000	0.0500	0.7692	0.8889	1.0000	0.0357	0.0179
D	0.3265	0.4265	0.1000	0.0208	0.3125	0.4000	0.0769	0.0556	0.0000	0.0000	0.0357
E	0.0102	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>PEP-1</i>											
n	41	37	39	50	12	19	45	43	28	28	30
A	0.2317	0.0000	0.0897	0.0000	0.0000	0.0263	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
B	0.1585	0.0000	0.2051	0.0000	0.0833	0.9737	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
C	0.3415	0.0811	0.5897	0.1000	0.6250	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
D	0.2683	0.9189	0.1154	0.9000	0.2917	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000
E	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
F	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
G	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>PEP-3</i>											
n	49	39	45	55	19	22	43	51	28	28	30
A	0.0714	1.0000	0.0000	0.5636	0.0526	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
B	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.9902	1.0000	1.0000	0.0000
C	0.9286	0.0000	0.9667	0.4364	0.9474	1.0000	0.0000	0.0098	0.0000	0.0000	0.0000
D	0.0000	0.0000	0.0333	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
E	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>MEE-1</i>											
n	14	21	33	39	15	16	28	26	8	31	27
A	1.0000	1.0000	0.9697	1.0000	1.0000	0.9375	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
B	0.0000	0.0000	0.0303	0.0000	0.0000	0.0625	1.0000	0.9231	1.0000	0.0000	0.0000
C	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0769	0.0000	0.9355	1.0000
D	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0645	0.0000
E	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	CON	LLA	RIN	PTC	MAC	SFB	BAI	CIS	AMA	WAD	XIE
P	0.4444	0.444	0.667	0.4440	0.444	0.556	0.222	0.444	0.111	0.667	0.556
A	1.889	1.556	2	1.556	1.556	1.778	1.444	2	1.111	2.111	2.222
Ap	3	2.25	2.5	2.25	2.25	2.4	3	2.75	2	2.667	3.2
Ho	0.086	0.107	0.073	0.083	0.154	0.146	0.011	0.018	0.014	0.111	0.112

Tabla 11, continuación

locus	VIN	AIB	CIT	LAG	ALT	KAR1	KUC	KAR	KAL	MAR
<i>GOT-2</i>										
n	20	16	23	15	7	20	15	21	20	25
A	0.9000	0.8125	0.6957	1.0000	1.0000	0.7500	1.0000	0.9048	1.0000	1.0000
B	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
C	0.1000	0.1875	0.0000	0.0000	0.0000	0.2500	0.0000	0.0952	0.0000	0.0000
D	0.0000	0.0000	0.3043	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>MDH-1</i>										
N	24	19	38	18	11	27	28	28	30	30
A	0.0000	0.2632	0.1316	1.0000	0.0000	0.0000	0.9643	0.0000	0.1333	0.0000
B	0.0000	0.7368	0.8684	0.0000	1.0000	1.0000	0.0357	0.0357	0.8667	1.0000
C	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.9643	0.0000	0.0000
<i>MDH-2</i>										
N	24	21	37	18	11	30	28	26	30	31
A	0.0000	0.8571	0.2162	1.0000	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.1000	0.1613
B	1.0000	0.0000	0.7838	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.9000	0.8387
C	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000
D	0.0000	0.1429	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>EST-D</i>										
N	16	23	28	26	13	27	36	30	22	28
A	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
B	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

C	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
D	1.0000	1.0000	1.0000	0.7885	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
E	0.0000	0.0000	0.0000	0.2115	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>6-PGDH</i>										
N	24	27	35	25	14	33	33	32	28	26
A	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
B	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
C	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
D	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
E	0.0000	0.3704	0.0286	0.0000	0.0000	0.1970	0.0303	0.1562	0.0000	0.0000
F	0.0000	0.1481	0.2286	0.1000	0.2143	0.1970	0.4394	0.1875	0.2857	0.2692
G	0.5000	0.3333	0.2857	0.4200	0.4286	0.2576	0.0455	0.2812	0.1964	0.2115
H	0.0000	0.1481	0.2857	0.1000	0.2143	0.2424	0.4394	0.2344	0.2857	0.2692
I	0.5000	0.0000	0.1714	0.3800	0.1429	0.1061	0.0455	0.1406	0.2321	0.2500
J	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>PER-1</i>										
N	24	27	32	25	14	30	33	32	26	28
A	0.0000	0.0000	0.1562	0.1600	0.0000	0.0000	0.0303	0.0312	0.3462	0.0893
B	0.0000	0.9630	0.8125	0.8400	0.9286	0.7333	0.8636	0.1875	0.6538	0.7500
C	0.9792	0.0370	0.0312	0.0000	0.0000	0.0167	0.0303	0.7812	0.0000	0.1607
D	0.0208	0.0000	0.0000	0.0000	0.0714	0.2500	0.0758	0.0000	0.0000	0.0000
<i>PER-1</i>										
N	24	27	32	26	14	30	33	32	26	29
A	0.0000	0.0000	0.0000	0.1923	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
B	0.0000	0.9630	1.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0938	1.0000	0.2414
C	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.7586
D	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
E	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
F	0.0000	0.0370	0.0000	0.8077	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
G	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.9062	0.0000	0.0000
<i>PER-3</i>										
N	24	12	32	26	14	30	28	32	26	28
A	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
B	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
C	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0357
D	0.5625	1.0000	1.0000	0.8462	1.0000	0.9333	1.0000	1.0000	1.0000	0.9643
E	0.4375	0.0000	0.0000	0.1538	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>MEE</i>										
N	20	32	38	26	13	34	35	34	31	32
A	0.0000	0.0312	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
B	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
C	1.0000	0.9688	1.0000	0.7692	0.9231	1.0000	1.0000	0.1471	1.0000	1.0000
D	0.0000	0.0000	0.0000	0.1923	0.0000	0.0000	0.0000	0.8529	0.0000	0.0000
E	0.0000	0.0000	0.0000	0.0385	0.0769	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	VIN	AIB	CIT	LAG	ALT	KAR1	KUC	KAR	KAL	MAR
P	0.444	0.778	0.556	0.667	0.333	0.444	0.333	0.667	0.444	0.556
A	1.444	2.0	2.0	2.0	1.556	1.889	1.889	2.111	1.667	1.889
Ap	2.0	2.286	2.8	2.5	2.667	3.0	3.0	2.667	2.5	3
Ho	0.213	0.107	0.102	0.154	0.115	0.163	0.163	0.115	0.107	0.163

P: porcentaje de loci polimórficos (criterio 0.99); A: Numero promedio de alelos por locus; Ap:: Numero de alelos por locus polimórficos; Ho: heterocigosidad observada

Tabla 12. Matriz de distancia (bajo la diagonal) y/o identidad genética de Nei (sobre la diagonal).

<i>Población</i>	<i>NAM</i>	<i>XIE</i>	<i>AIB</i>	<i>CIT</i>	<i>WAD</i>	<i>LAG</i>	<i>ALI</i>	<i>KAZ1</i>	<i>KUC</i>	<i>KAR</i>	<i>KAL</i>	<i>MAR</i>	<i>LLA</i>	<i>CON</i>	<i>RIN</i>	<i>SFB</i>	<i>PIC</i>	<i>CIS</i>	<i>BAI</i>	<i>AMA</i>	<i>MAC</i>
NAM		0.455	0.469	0.578	0.492	0.470	0.467	0.456	0.452	0.600	0.605	0.731	0.011	0.047	0.081	0.007	0.016	0.118	0.093	0.118	0.083
XIE	0.788		0.780	0.667	0.586	0.958	0.592	0.721	0.726	0.438	0.645	0.639	0.309	0.324	0.350	0.309	0.335	0.153	0.147	0.133	0.331
AIB	0.757	0.249		0.902	0.653	0.768	0.864	0.979	0.965	0.481	0.869	0.806	0.225	0.263	0.291	0.344	0.271	0.224	0.224	0.205	0.261
CIT	0.548	0.405	0.103		0.687	0.643	0.875	0.895	0.898	0.469	0.985	0.904	0.109	0.143	0.171	0.236	0.149	0.158	0.159	0.142	0.138
WAD	0.710	0.534	0.426	0.376		0.592	0.605	0.656	0.671	0.350	0.695	0.715	0.275	0.197	0.195	0.146	0.302	0.318	0.317	0.300	0.206
LAG	0.756	0.043	0.264	0.442	0.525		0.600	0.699	0.713	0.459	0.634	0.637	0.337	0.362	0.384	0.334	0.376	0.147	0.147	0.129	0.364
ALT	0.762	0.525	0.146	0.133	0.503	0.511		0.856	0.861	0.605	0.866	0.805	0.070	0.101	0.123	0.185	0.109	0.132	0.136	0.119	0.097
KAZ1	0.785	0.327	0.021	0.111	0.421	0.357	0.156		0.981	0.453	0.864	0.807	0.199	0.239	0.257	0.331	0.224	0.271	0.270	0.251	0.235
KUC	0.794	0.321	0.036	0.107	0.398	0.339	0.149	0.019		0.475	0.880	0.825	0.190	0.223	0.247	0.306	0.224	0.252	0.254	0.236	0.220
KAR	0.511	0.825	0.731	0.757	1.051	0.779	0.503	0.791	0.745		0.484	0.498	0.014	0.020	0.027	0.030	0.026	0.097	0.085	0.102	0.019
KAL	0.502	0.439	0.141	0.016	0.364	0.456	0.144	0.146	0.128	0.725		0.915	0.079	0.109	0.138	0.204	0.110	0.134	0.134	0.120	0.104
MAR	0.314	0.447	0.215	0.101	0.336	0.450	0.217	0.214	0.193	0.698	0.089		0.086	0.134	0.180	0.110	0.127	0.179	0.178	0.166	0.166
LLA	4.475	1.174	1.490	2.215	1.292	1.089	2.656	1.612	1.662	4.257	2.538	2.449		0.641	0.687	0.569	0.750	0.241	0.255	0.238	0.643
CON	3.066	1.127	1.337	1.945	1.623	1.017	2.292	1.431	1.501	3.929	2.213	2.013	0.445		0.950	0.937	0.926	0.249	0.269	0.252	0.946
RIN	2.511	1.051	1.233	1.765	1.633	0.956	2.098	1.359	1.398	3.603	1.979	1.714	0.376	0.051		0.887	0.861	0.262	0.282	0.265	0.910
SFB	4.916	1.176	1.068	1.446	1.927	1.097	1.687	1.105	1.184	3.505	1.591	2.211	0.564	0.066	0.119		0.826	0.281	0.297	0.281	0.897
PIC	4.109	1.093	1.307	1.906	1.196	0.979	2.217	1.497	1.496	3.636	2.209	2.064	0.288	0.077	0.150	0.191		0.242	0.264	0.247	0.874
CIS	2.137	1.874	1.498	1.844	1.145	1.921	2.025	1.306	1.377	2.335	2.008	1.720	1.424	1.389	1.341	1.269	1.418		0.998	0.998	0.327
BAI	2.377	1.916	1.494	1.841	1.148	1.920	1.992	1.309	1.370	2.469	2.011	1.727	1.366	1.312	1.264	1.215	1.331	0.002		0.996	0.340
AMA	2.137	2.017	1.583	1.948	1.204	2.047	2.131	1.383	1.445	2.279	2.124	1.793	1.438	1.377	1.329	1.268	1.400	0.002	0.004		0.319
MAC	2.487	1.106	1.345	1.980	1.578	1.011	2.337	1.448	1.515	3.978	2.267	1.797	0.442	0.055	0.095	0.109	0.134	1.118	1.078	1.143	

Tabla 13. Diversidad de haplotipos de *Artemia* generados de la secuencias de un fragmento de 588bp de la subunidad de la citocromo oxidasa c.

ESPECIE	ABREVIACION	Número de Haplotipos	Haplotipos
A. sínica	XIE	3	Si01, Si02, Si03
A. tibetiana	LAG	5	Ti01, Ti02, Ti03, Ti04, Ti05
A. salina	WAD	3	Sa01, Sa02, Sa03
A. persimilis	BAI	3	Pe04, Pe05, Pe06
	CIS	2	Pe03, Pe09
	AMA	3	Pe01, Pe07, Pe08
A. franciscana	CON	2	Fr01, r02
	LLA	4	Fr09, Fr10, Fr11, Fr12
	RIN	-	-
	PIC	4	Fr02, Fr06, Fr07, Fr08
	MAC	3	FR13, Fr14, Fr15, Fr16
	SFB	2	Fr04, Fr05
		AIB	1
A. parthenogenetica	CIT	3	Pg01, Pg02, Pg03
	KAL	3	Pg01, Pg04, Pg12
	KAR	2	Pg04, Pg12
	KAR 1	-	-
	ALT	-	-
	KUC	2	Pg13, Pg04
	MAR	2	Pg04, Pg12
	VIN	2	Pg04, Pg15
	QAR	3	Pg01, Pg04, Pg12

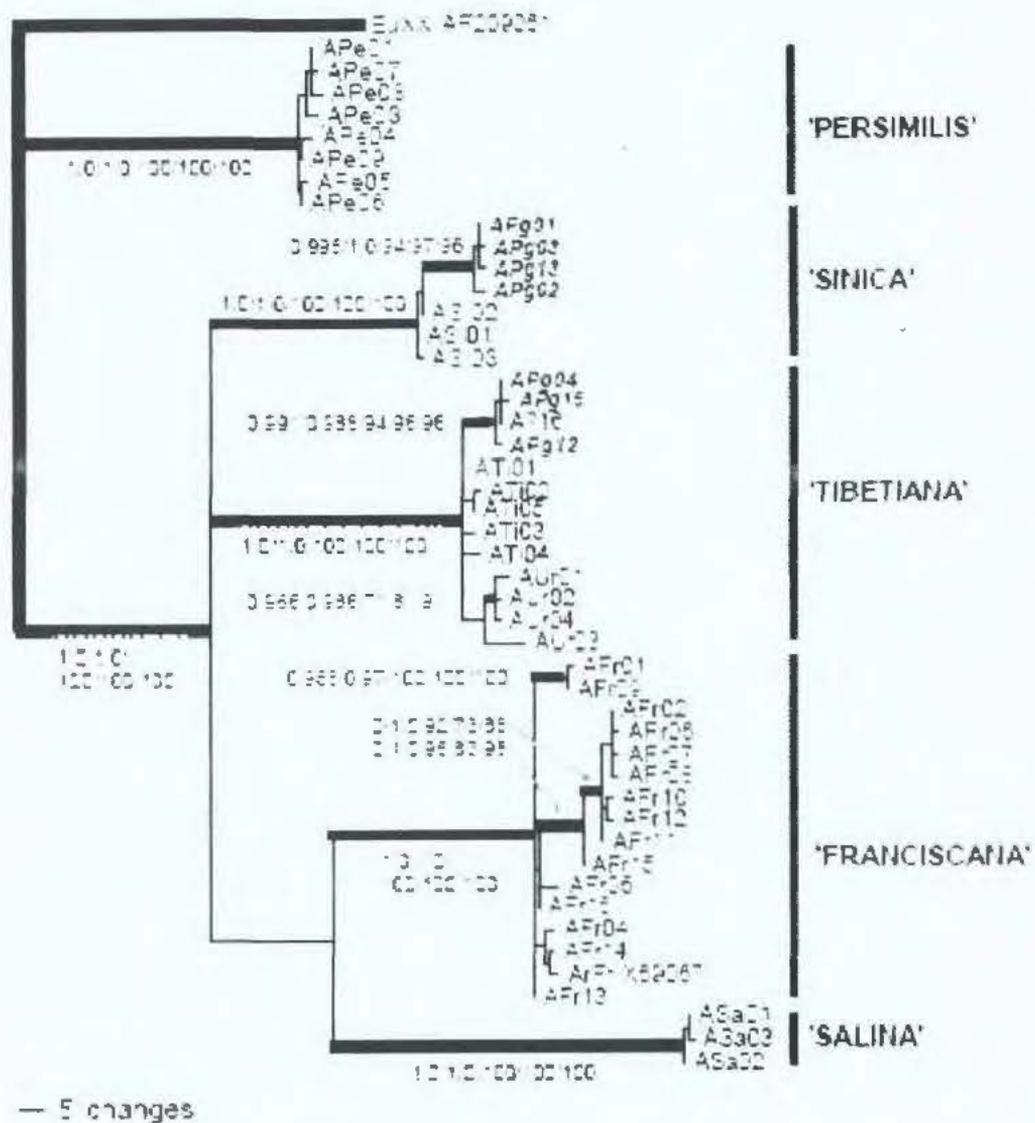


Figura 19. Relación filogenética de especies de *Artemia* basado en el fragmento COI de 588bp.

Resultados temporada 3 (2005-2006)

Los análisis morfológicos, cariológicos, electroforéticos y moleculares realizados sobre muestras de individuos adultos enviados durante el mes de enero de 2006, no muestran variaciones respecto de los resultados obtenidos para iguales pruebas realizadas durante las dos temporadas anteriores.

5. Obtención de quistes para inoculación

Sobre la base de información obtenida en la caracterización de la cepa local se solicitó al Artemia Reference Center (U. de Gante, Bélgica) el envío de 500 g de quistes para realizar la inoculación en los estanques de cultivo. Los quistes recibidos corresponden a la especie *Artemia franciscana*, cepa San Francisco Bay lote 1574 (SFB 1574).

6. Gira tecnológica a salinas de Grossos (Brasil)

- a) Lo que primero sorprendió es el nivel de éxito alcanzado por el dueño de la empresa BioArtemia, un ex recolector de biomasa en las salinas del lugar. Como el mismo explicó su calidad de vida mejoró sorprendentemente, lo cual sirvió además para motivar a otros, que por mucho tiempo fueron reticentes al cambio, a buscar un futuro similar. En este momento hay una empresa competidora de BioArtemia en el pueblo.
- b) El nombre de la empresa (BioArtemia) refleja uno de los componentes del éxito, la combinación entre la academia (Dr. Marcos Camara), que aportó el "know-how" y el caso particular de un lugareño inquieto por mejorar su condición. Hoy su señora es la Secretaria de la empresa y su hija estudia en una Universidad de la zona (Mossoró) para posteriormente contribuir al desarrollo de la empresa.
- c) La principal diferencia entre el proyecto en ejecución en Pichilemu y la empresa BioArtemia radica en que el eje productivo de esta última gira sobre la biomasa de *Artemia*. Para ello, hasta muy reciente el grueso de la materia prima (*Artemia*) provenía de la pesquería en las salinas de la zona⁴. Sin embargo, desde hace

⁴ Cabe señalar que las salinas ubicadas en la región cuentan con una población naturalizada de *Artemia*. Aquí es factible realizar pesquerías de arrastre gracias a la profundidad de los estanques

aproximadamente un año se inició una nueva fase productiva, en la que se construyó una nueva salina para combinar la producción de sal con la producción de *Artemia*. Experiencias previas los llevaron a comprobar que esta era la manera de lograr biomasa en un tiempo menor, al ser posible abastecer los estanques en que es cultivada *Artemia* con agua a elevadas salinidades (alrededor 100 ppm). De esta forma las condiciones ideales para el florecimiento de *Artemia* se logran en un tiempo menor. Se celebró la experiencia de Pichilemu por haber empezado en la fase en la que están ellos actualmente luego de varios ciclos previos de experimentación. Además de los estanques propios de las salinas, este módulo cuenta con cinco estanques de 0,7 há de superficie y 0,5 m de profundidad útil, de los cuales, dos eran utilizados para la mantención de *Artemia* (densidad inicial 60 larvas/litro) y los tres restantes sólo para la producción de microalgas. Este módulo de producción intensiva funciona sobre la base de producción mensual. Esto se traduce en una cosecha al mes y la consiguiente reinoculación. Bajo tales condiciones, la producción actual de BioArtemia alcanza las 10 toneladas mensuales de biomasa, de ellas, sólo 0,424 toneladas son producidas de manera intensiva (estanques de 0,7 há). Además, en esta unidad de producción se cosechan 15 kg de quistes por mes, parte de los cuales son destinados a la reinoculación. Cabe señalar que por el hecho de no ser éstos el objetivo productivo, no son sometidos a un procesamiento adecuado (secado sin exposición al sol). Debido a las condiciones (artesanal) en que los quistes son procesados no constituyen un producto de primera calidad y por tanto su valor es más que bajo (USD \$50 por Kg) que el que se espera obtener en Pichilemu (indicado en el proyecto).

La biomasa es envasada en bolsas de 1 Kg y posteriormente almacenada en cámaras de frío (-20° C) hasta el momento de la venta (USD \$1 por Kg). El principal poder comprador para la biomasa y quistes de *Artemia* lo constituye la industria camaronera nacional (que produce 100.000 ton/año), aunque también existe demanda de los laboratorios de investigación. El producto final (bolsas de 1 Kg) es empacado en cajas de poliestireno de 40 y 50 Kg. La calidad de la biomasa es evaluada constantemente a

(aproximadamente 1 m) y su gran extensión (200 a 500 ha cada uno). 300 kg de biomasa/ha/mes (0,06 Kg de biomasa/m³).

través de un análisis bioquímico proximal, aunque eventualmente se realizan análisis microbiológicos, según los requerimientos del comprador.

- d) La visita fue un aliciente importante al comprobar que lo que se estaba haciendo en Cáhuil estaba en la línea correcta e, incluso, adelantado en algunos aspectos como se mencionó en el punto 3. Igualmente permitió verificar que hay ciertas condiciones inigualables en Brasil: la extensión del período favorable de clima lo que deriva en que la actividad sea prácticamente continua durante el año. Igualmente, la ya mencionada extensión y profundidad de las salinas y la relevancia de la industria camaronera lo que genera un gran poder comprador de la *Artemia* local la cual resulta más costo-efectiva que el producto extranjero.

7. Cultivo de microalgas en laboratorio

El cultivo de *Dunaliella salina* desarrollado en el laboratorio de Barrancas a partir del inóculo provisto por el Laboratorio de Genética & Acuicultura, no culminó en un "bloom" luego de ser llevado a los estanques de las salinas durante la primera temporada del proyecto. El cultivo iniciado con agua proveniente de las salinas permitió aislar exitosamente la cepa local de *Dunaliella* sp., que al ser reinoculada en los estanques destinados al cultivo de *Artemia* proliferó satisfactoriamente. Así, el florecimiento algal pudo mantenerse desde la tercera semana de enero hasta fines del mes de abril de 2005.

8. Fertilización de estanques

La fertilización efectuada durante el primer año en los estanques sancochadores no condujo a proliferación algal independientemente del fertilizante usado. Durante la segunda temporada la fertilización efectuada directamente en los estanques para el cultivo de *Artemia* si culminó en un florecimiento algal, que comenzó a evidenciarse promediando el mes de enero, aproximadamente. En adelante, el florecimiento algal se mantuvo hasta fin de la temporada (mes de abril) fertilizando quincenalmente los estanques. Para la tercera temporada la fertilización con urea y superfosfato triple si bien permitió el florecimiento de las microalgas, este no fue de la misma calidad que el obtenido durante la temporada anterior con el producto enhance algae, observándose una gran proliferación de algas bentónicas, *lama*, en todos los estanques de cultivo.

9. Seguimiento del desarrollo algal

El desarrollo del cultivo de microalgas en las salinas no pudo ser controlado de manera muy estricta. Si bien el agua de los estanques estaba intensamente coloreada, el tamaño extremadamente pequeño de las células hizo imposible su recuento, con la sola excepción del efectuado durante la primera semana de febrero de 2005 en el estanque CT1, ocasión en que se registró una densidad de 560.000 cél/ml.

Las microalgas sembradas en placas con agar en medio Conwy proliferaron exitosamente (Figura 20a). Sin embargo, al transferir las microalgas a matraces de 250 ml (Figura 20b) con las salinidades experimentales (35 y 100 ppt) sólo proliferaron aquellas mantenidas a concentraciones de 100 ppt. El cultivo de microalgas mantenidas a 35 ppt precipitó a la semana de su siembra en matraces de 250 ml.



Figura 20. Aislamiento y cultivo de microalgas a partir de una muestra de agua de la localidad de La Villa. a) Algas sembradas en placas de agar; b). Algas sembradas en matraces a salinidades de 100 ppt.

En el medio de cultivo líquido proliferaron dos tipos de microalgas: la clorófito *Dunaliella salina* (Figura 21) y una alga que podría pertenecer al grupo de las cianófitas del orden *Chroococcus* (Figura 22) o bien a una forma enquistada de *Dunaliella*.

Las microalgas cianofíceas del género *Chroococcus* crecen como células esféricas solitarias o en grupos de 2 a 4. Su contenido celular es granuloso y de color variable, desde verde amarillento a verde azulado o verde violáceo. Cada célula está rodeada por una vaina espesa, incolora o pigmentada. La presencia de esta cianófito debe ser confirmada mediante exámenes más exhaustivos.

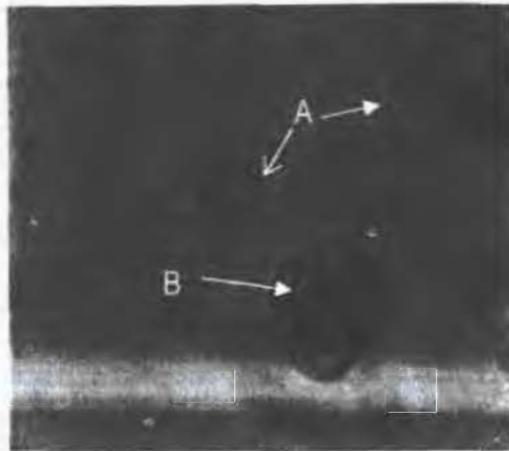


Figura 21. Microalga *Dunaliella salina*. A. Flagelos. B. Cloroplasto

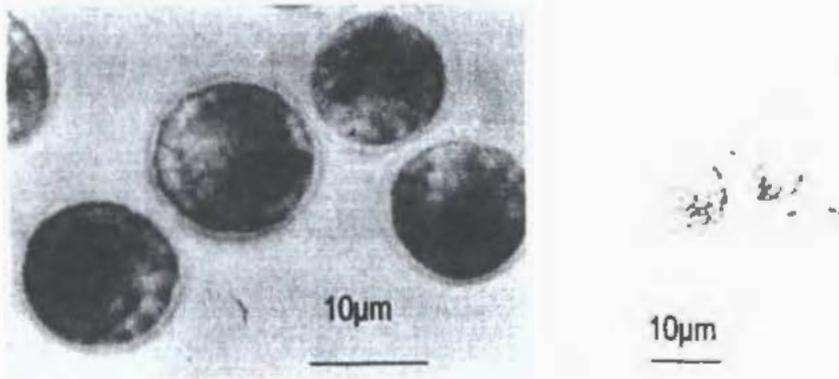


Figura 22. Microalga tentativamente del género Chroococcus

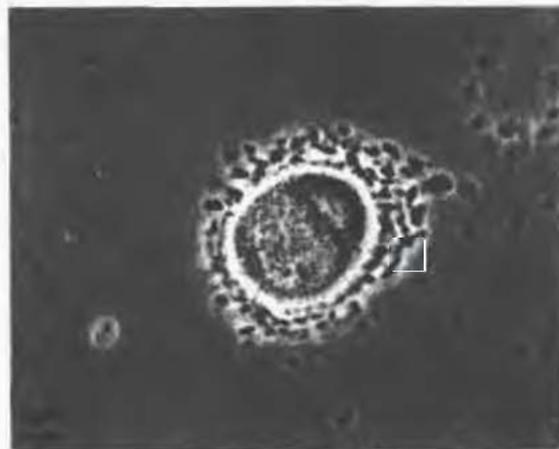


Figura 23. Aplanóspora de *Dunaliella salina* (*Dunaliella* enquistada) rodeada de halobacterias.

En general el crecimiento del cultivo algal fue de desarrollo lento, donde *D. salina* alcanzó densidades de 5.000 cel/ml luego de 2 semanas de cultivo, mientras que la otra microalga presente en mayor abundancia es *Chroococcus* creció logrando densidades de 100.000 cel/ml (Figura 24).

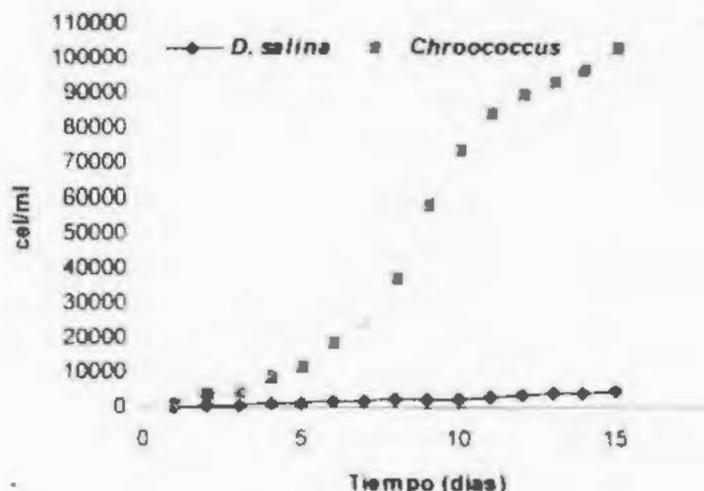


Figura 24. Curva de crecimiento de las algas *D. salina* y *Chroococcus* bajo condiciones controladas a salinidades de 100 ppt.

10. Decapsulación y eclosión de quistes

Este procedimiento mostró niveles aceptables de eficiencia obteniéndose un valor promedio de 68% de eclosión en un tiempo de 43 horas. Sin embargo, se debe señalar que la eficiencia de eclosión fue disminuyendo paulatinamente conforme avanzaba la temporada. La Tabla 14 da cuenta de los resultados obtenidos en cada evento de decapsulación-eclosión.

Tabla 14. Registro de la temperatura, salinidad, tiempo incubación (horas) y eficiencia eclosión (%) de *Artemia* durante la decapsulación-eclosión realizadas para la inoculación en la salina.

Fecha	Temperatura (°C)	Salinidad (‰)	Incubación (h)	Eclosión (%)
6/12/2004	20	36	48	78
17/01/2005	24	36	30	89
17/01/2005	24	36	30	78
4/02/2005	20	36	47	81
24/02/2005	19,5	36	48	60
24/02/2005	19,5	36	48	67
1/03/2005	19	36	45	60
1/03/2005	19	36	45	65
30/03/2005	17	36	45	41
30/03/2005	17	36	45	61
Promedio ± Stdev	20 ± 2,4	36 ± 0,0	43 ± 7,0	68 ± 13,8

11. Evaluación de quistes

Los resultados obtenidos de las pruebas realizadas por el Artemia Reference Center señalan como características positivas desde el punto de vista del uso en acuicultura, el pequeño diámetro de los quistes; 234,3 μm ($\pm 8,9$) y 229,78 μm ($\pm 10,5$), durante la primera y segunda temporada respectivamente y el alto contenido de ácidos grasos polinsaturados de los nauplios (Tabla 15). Al respecto, cabe destacar que el contenido de los ácidos grasos polinsaturados EPA y DHA aumentaron de 11,0 mg/g a 24,2 mg/g entre la primera y segunda temporada. El porcentaje de humedad presentado por los quistes de la segunda temporada se encuentra dentro del rango considerado como adecuado ($x > 2x < 10$).

Tabla 15. Contenido de ácidos eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA) en nauplios de *Artemia* recién eclosionados.

Quistes producidos durante la temporada 2003 - 2004					
20:5n-3		22:6n-3		Sum (n-3) > o = 20:3(n-3)	
Área %	Mg/g	Área %	Mg/g	Área %	Mg/g
10,9	10,0	0,1	0,1	11,9	11,0

Quistes producidos durante la temporada 2004 - 2005					
20:5n-3		22:6n-3		Sum (n-3) > o = 20:3(n-3)	
Área %	Mg/g	Área %	Mg/g	Área %	Mg/g
16,8	23,35	0,1	0,1	17,4	24,2

El aspecto negativo estaría dado por los bajos porcentajes de eclosión mostrados por los quistes de ambas temporadas productivas (Tabla 16), y que a juicio del ARC tendría su origen en algún paso de la cosecha, proceso y/o almacenamiento, lo que podría establecerse con certeza analizando una muestra de quistes frescos (cosechados sin procesar).

Tabla 16. Porcentajes de eclosión de muestras de quistes de las dos temporadas productivas, analizados en el ARC (Bélgica).

Quistes producidos durante la temporada 2003 - 2004		
Muestra	Tiempo (hr)	% de eclosión (28° C)
Original	24	Sin eclosión
Tratamiento con peróxido	24	12,20
	48	15,04

Quistes producidos durante la temporada 2004 - 2005		
Muestra	Tiempo (hr)	% de eclosión (28° C)
Original	24	22,12
Tratamiento con peróxido	24	24,24
	48	25,25

Por otra parte, los resultados obtenidos con los análisis realizados en el Laboratorio de Genética & Acuicultura (ULA, Osorno) muestran valores distintos a los encontrados por el ARC. Durante las primeras 24h de incubación de los quistes no se registró eclosión, sin embargo una vez transcurridas 35h y hasta las 72h se produjo la eclosión masiva de larvas nauplii, con valores superiores al 90% (Tabla 17). Estos valores porcentuales se consideran ideales para las empresas comercializadoras de quistes y aunque se registró una escasa eficiencia de eclosión (número de quistes por gramo), esta podría ser mejorada optimizando los métodos de cosecha y almacenaje.

Tabla 17. Características cualitativas de los quistes de *Artemia* de PIC

Cono	Porcentaje de Eclosión				Eficiencia de eclosión
	<i>24 h</i>	<i>36h</i>	<i>48h</i>	<i>72h</i>	
1	0	16.87	79.19	93.21	140.000 (\pm 90.213)
2	0	12.90	97.11	97.74	181.176 (\pm 92.579)
3	0	19.95	85.40	90.14	115.294 (\pm 57.122)

12. Transporte e inoculación de nauplios

En general, todos los eventos de inoculación ejecutados fueron considerados como exitosos, con la sola excepción de la primera inoculación (8 de enero) en el estanque CT1 donde la sobrevivencia fue prácticamente cero. Sin embargo, la obtención de malos recuentos al primer muestreo no implica necesariamente el resultado directo de un mal procedimiento de transporte y/o inoculación, sino que podrían ser atribuidos a otros factores relacionados con las condiciones del estanque.

Los efectos poblacionales y productivos derivados de las distintas densidades de inoculación son analizados más adelante en este informe.

13. Monitoreo de la Población de *Artemia*

Los muestreos de la población realizados durante la temporada 1 (2003-2004, sistema de cultivo monociclo), 2 y 3 (2004-2005, 2005-2006, sistema de cultivo multiciclo) no mostraron diferencias en cuanto a la proporción sexual macho:hembra, manteniéndose dentro del rango considerado como normal (1:1) de acuerdo a los señalado por Zúñiga et al. (1994).

En cuanto al porcentaje promedio de hembras ovíparas presentes en las unidades productivas, este fue claramente superior durante la temporada 2003-2004, alcanzando un 20,25% (Tabla 18) del total de hembras adultas⁵, mientras que durante la temporada 2004-2005 estas alcanzaron sólo al 5,87%⁶ (Tablas 19 y 20), variable que registró un alza en la última temporada con un 14,87% (Tabla 21).

Tabla 18. Valores promedio del porcentaje de machos, hembras, hembras con quistes y hembras con larvas para cada estanque por mes con respecto a la población de adultos para la temporada 2004-2005.

Mes	Estanque	Machos (%)	Hembras (%)	H c/quistes (%)	H c/larvas (%)
Febrero	CT1	50,0	50,0	0,0	0,0
Marzo		56,0	44,0	27,9	6,1
Abril		67,6	32,4	47,9	26,3
Promedio				25,27	
Febrero	CT2	64,7	35,3	0,0	0,0
Marzo		50,5	49,5	52,8	4,6
Abril		50,2	49,8	45,4	9,0
Promedio				32,73	
Febrero	CT3	37,5	62,5	0,0	0,0
Marzo		38,5	61,5	49,2	0,3
Abril		54,6	45,4	22,5	42,5
Promedio				23,9	
Febrero	PT1	100,0	0,0	0,0	0,0
Marzo		38,4	61,6	24,0	0,7
Abril		49,2	50,8	30,8	25,6
Promedio				18,27	
Febrero	PT2	100,0	0,0	0,0	0,0
Marzo		45,8	34,2	20,0	0,0
Abril		56,7	18,3	0,0	37,5
Promedio				6,67	
Febrero	PT3	100,0	0,0	0,0	0,0
Marzo		35,6	64,4	53,3	6,7
Abril		54,6	45,4	22,5	42,5
Promedio				25,27	
Febrero	CL1-1'	68,8	31,3	0,0	0,0
Marzo		35,2	41,3	14,1	0,0
Abril		58,0	42,0	14,5	7,7
Promedio				9,53	

⁵ Sobre la base de los datos de la Tabla 12, del Informe Técnico N° 1.

⁶ Sobre la base de los datos de la Tabla 5, del Informe Técnico N° 3.

Febrero	CL2-2'	44,4	55,6	20,0	0,0
Marzo		46,7	50,3	17,1	1,4
Abril		49,0	51,0	26,8	1,3
Promedio				21,3	

Tabla 19. Condición reproductiva de las hembras (%) en el estanque CT1 y CT2 durante el periodo 2004-2005; hembras (H), hembras con quistes (H c/Q) y hembras con larvas (H c/L), con respecto al total de la población.

Ciclo	Semana	CT1			CT2		
		H	H c/Q	H c/L	H	H c/Q	H c/L
Primer ciclo	6	0,0	12,5	0,0	12,8	10,6	0,0
	7	0,0	1,0	0,0	3,0	11,1	0,7
	8				0,0	1,1	0,0
Segundo ciclo	10	3,8	13,5	9,6	0,0	8,8	0,0
	12	24,5	0,0	0,0	4,5	13,6	0
	14	26,5	20,6	2,9	1,7	6,6	1,4
	15	11,0	12,0	0,0	1,4	15,9	2,9
	17	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tercer ciclo	18	8,7	1,9	1,9	10,4	2,2	2,2
	19	8,3	1,7	1,7	0,5	3,7	2,3
	20	1,7	10,3	1,7	6,1	4,0	0,0
Promedio ±Stdev		9,2 ± 10,1	7,2 ± 7,7	1,8 ± 3,1	3,4 ± 4,4	7,4 ± 5,5	1,0 ± 1,2

Tabla 20. Condición reproductiva de las hembras (%) en el estanque CT3 y PT1 durante el periodo 2004-2005; hembras (H), hembras con quistes (H c/Q) y hembras con larvas (H c/L), con respecto al total de la población.

Ciclo	Semana	CT3			PT1		
		H	H c/Q	H c/L	H	H c/Q	H c/L
Segundo ciclo	9	3,9	0,0	0,0	2,6	2,6	0
	10	3,0	4,0	0,0	5,9	0,2	0,2
	12	0,8	1,6	0,0	5,5	8,6	1,2
	15	1,9	2,1	0,8			
	16	12,6	3,8	2,1			
Tercer ciclo	17	28,6	6,7	0,0			
	18	41,3	9,3	2,7			
	19	14,8	14,8	5,8			
	20	13,0	27,8	0,0			
Promedio ±Stdev		13,4 ± 14,7	5,3 ± 4,9	1,4 ± 2,1	4,5 ± 1,5	3,8 ± 4,3	0,5 ± 0,6

Tabla 21. Valores promedio del porcentaje de machos, hembras, hembras con quistes y hembras con larvas para cada estanque por mes con respecto a la población de adultos para la temporada 2005-2006.

Mes	Estanque	Machos (%)	Hembras (%)	H c/quistes (%)	H c/larvas (%)
Diciembre	CT1				
Enero		42,2	19,7	36,2	2,0
Febrero		66,1	1,8	23,2	8,9
Marzo		55,0	0,0	0,0	45,0
Abril		38,3	8,1	8,3	45,3
Mayo		50,0	0,0	16,7	33,3
Junio		44,4	11,1	0,0	44,4
Promedio				14,1	
Diciembre	CT2				
Enero		47,3	20,1	30,3	2,3
Febrero		60,7	17,9	19,6	1,8
Marzo		68,4	5,3	10,5	15,8
Abril		76,4	11,8	3,2	8,6
Mayo		50,0	0,0	37,5	12,5
Junio		41,2	29,4	0,0	29,4
Promedio				16,9	
Diciembre	CT3	38,5	46,2	7,7	7,7
Enero		49,6	20,1	30,2	0,0
Febrero		43,8	16,3	23,2	16,6
Marzo		48,8	14,2	15,9	21,2
Abril		57,7	18,5	15,5	8,3
Mayo					
Junio		53,3	0,0	0,0	46,7
Promedio				15,4	
Diciembre	PT1				
Enero					
Febrero		49,5	5,8	28,9	15,8
Marzo		51,7	36,7	6,8	4,8
Abril		61,5	10,0	16,8	11,8
Mayo					
Junio		50,0	20,0	0,0	30,0
Promedio				13,1	

Tabla 22. Condición reproductiva de las hembras (%) en el estanque CT1 y CT2 durante el periodo 2005-2006 para el total de la población; hembras (H), hembras con quistes (H c/Q) y hembras con larvas (H c/L).

Ciclo	CT1			CT2		
	H	H c/Q	H c/L	H	H c/Q	H c/L
1ºciclo	4,3	5,7	1,4	1,2	2,4	0,0
	19,4	15,7	0,9	9,4	8,4	0,0
	12,8	18,6	0,6	5,0	19,9	0,6
2ºciclo	4,8	36,5	0,0	16,0	11,7	4,3
	1,8	22,8	8,8	3,7	13,4	1,2
	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0
	0,0	0,0	11,0	0,3	0,5	0,8
3º ciclo	6,3	0,0	12,5	0,0	0,0	0,0
	0,0	3,2	12,9	6,3	1,6	4,8
	1,0	2,9	10,8	3,6	1,0	2,6
4ºciclo	0,0	4,2	8,3	0,0	8,8	2,9
	1,3	0,0	5,3	5,8	0,0	5,8
Promedio±DS	4,3 ± 6,1	9,1 ± 11,7	6,0 ± 5,2	4,3 ± 4,7	5,6 ± 6,7	1,9 ± 2,1

Tabla 23. Condición reproductiva de las hembras (%) en el estanque CT3 y PT1 durante el periodo 2005-2006 para el total de la población; hembras (H), hembras con quistes (H c/Q) y hembras con larvas (H c/L).

Ciclo	CT3			PT1		
	H	H c/Q	H c/L	H	H c/Q	H c/L
1ºciclo	27,3	4,5	4,5			
	0,0	1,3	0,0			
	5,8	1,5	0,0			
2ºciclo				0,0	0,0	0,0
				0,0	20,8	12,5
	1,8	2,5	0,0	3,2	11,1	1,6
	0,6	0,6	1,2	1,3	1,3	5,0
	0,5	0,9	0,9	3,3	9,3	0,0
	2,2	5,0	5,8	6,8	13,6	9,7
3º ciclo	0,3	0,8	1,6	2,9	0,0	0,0
	1,8	0,9	0,9	2,9	0,0	0,0
	12,1	9,9	1,1	13,8	2,8	9,2
	6,3	6,3	3,2	1,5	10,4	4,5
	2,9	1,4	5,7	1,6	6,5	3,2
4ºciclo	0,0	0,0	3,0	1,2	0,0	1,7
Promedio±DS	4,7±7,3	2,8±2,8	2,1±2,0	3,2±3,6	6,3±6,5	4,0±4,2

Las densidades promedio por sistema, para el periodo comprendido entre los meses de febrero a abril de la temporada 2003-2004 fueron de 146 ind/l (\pm 134) para los estanques modificados transversalmente (CT), 276 ind/l (\pm 502) para el sistema con modificación perimetral (PT), y finalmente de 343 ind/l (\pm 224) para aquellos estanques modificados

longitudinalmente (Figura 25). Las registradas durante el primer ciclo de la temporada 2004-2005 fueron de 150,5 ind/l en el estanque CT1 (Figura 21) y 812,7 ind/l en el estanque CT2 (Figura 26). En el segundo ciclo las densidades promedio expresadas como ind/l fueron de 304,3 en CT1; 225,5 en CT2; 707,6 en CT3 y 1171,3 en PT1 (Figura 26). Finalmente, para la temporada 2005-2006 las densidades promedio registradas para el ciclo 1 fueron de 40, 66 y 115 ind/l en los estanques CT1, CT2 y CT3, respectivamente (Figura 27). Durante el segundo ciclo las densidades promedio en los estanques CT1, CT2, CT3 y PT1 alcanzaron los 26, 52, 250 y 31 ind/l, respectivamente (Figura 27). El tercer ciclo se registraron las densidades registradas fueron de 60, 123, 241 y 126 ind/l en los estanques CT1, CT2, CT3 y PT1, respectivamente (Figura 22). Por último antes de la inundación se alcanzaron a registrar datos de un cuarto ciclo y que se detallan como sigue 66, 58, 342 y 600 ind/l en los estanques CT1, CT2, CT3 y PT1, respectivamente (Figura 27).

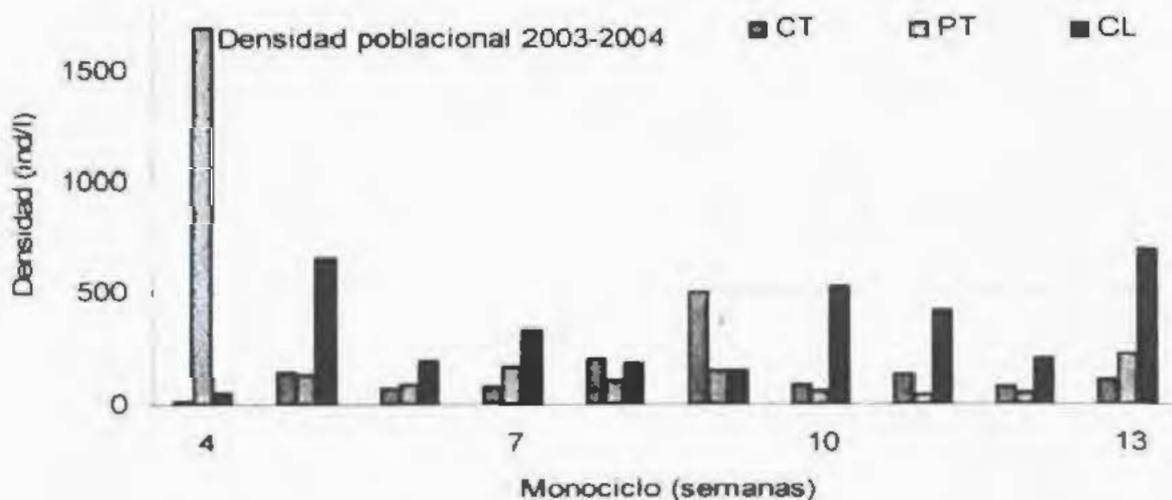


Figura 25. Densidad poblacional de *Artemia* en las unidades productivas con distintas modificaciones, durante la temporada 2003-2004.

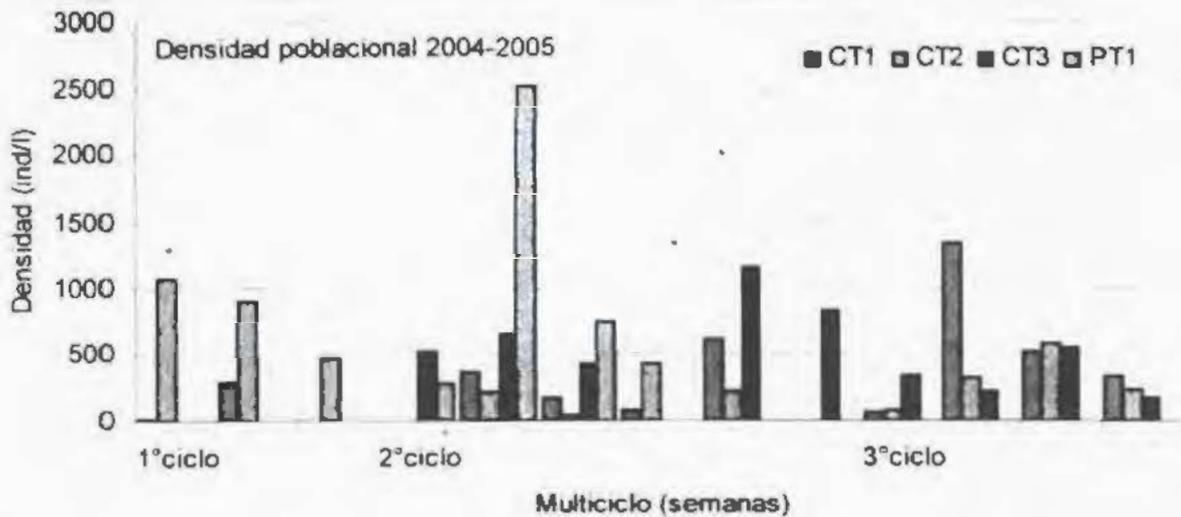


Figura 26. Muestra la densidad poblacional de *Artemia* en los estanques CT1, CT2, CT3 y PT1 durante la temporada 2004-2005.

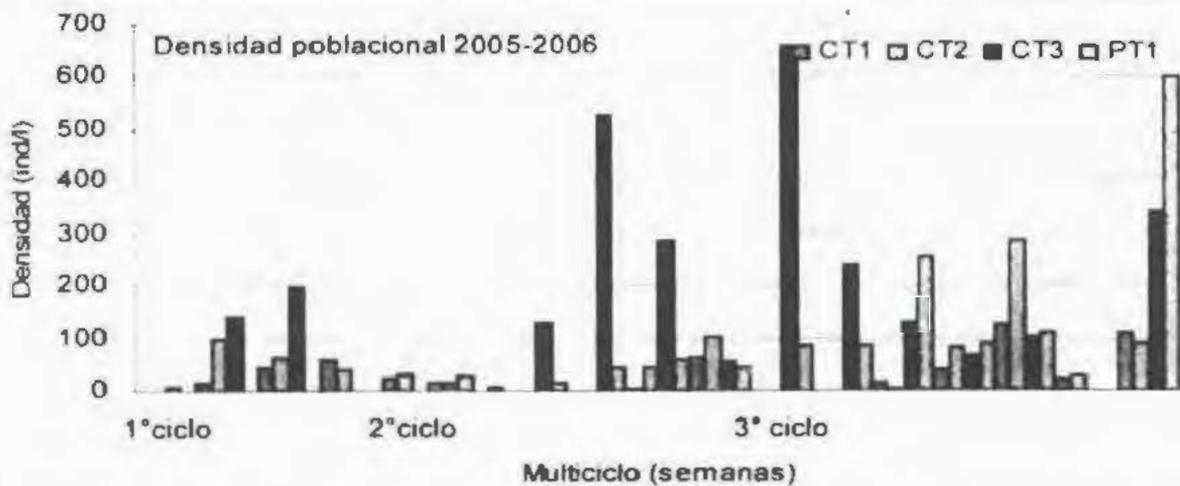


Figura 27. Muestra la densidad poblacional de *Artemia* en los estanques CT1, CT2, CT3 y PT1 durante la temporada 2005-2006.

14. Construcción de tamices

Los tamices contruidos con bateas circulares plásticas y malla de 100 resultaron eficaces para la retención de quistes durante el proceso de limpieza, aunque para el manejo de volúmenes mayores deberá aumentarse el tamaño de éstos. Igualmente deberá considerarse el uso de malla de 180 a 200 μm para que los tamices no se tapen con tanta facilidad debido a la presencia de microalgas. Los embudos confeccionados con

pañó (batista) resultaron eficaces y más prácticos para las labores de recolección de quistes en terreno que aquellos construidos con bateas plásticas.

Para los fines de recolección de biomasa, la malla agrícola baby citrus demostró ser eficaz, reteniendo inclusive los nauplios de *Artemia*. El reemplazo de las mangas de batista por malla baby citrus durante las faenas de cosecha permitiría la obtención de biomasa más limpia y con ello disminuirá el tiempo requerido para su limpieza.

15. Monitoreo de ensayo (Osorno)

Temporadas 1 y 2 (2003-2004; 2004-2005)

En la Tabla 24 se presentan los valores promedios del total de descendientes de cada cepa a las distintas salinidades experimentales. La cepa de la Bahía de San Francisco (USA) inoculada en la salina de La Villa alcanzo mayor número de descendientes cuando fue cultivada a la salinidad experimental de 100‰ mientras que los menores valores se observaron a la salinidad máxima (150‰) afectando en forma significativamente negativa el número quistes producidos (Tabla 24). En términos generales esta cepa produjo un mayor numero de descendientes, 175, 2 (\pm 135,9) y 190,4 (\pm 53,06) cuando fue cultivada a 35 y 50 ‰ respectivamente (Tabla 24). La mayor proporción de descendientes fue a través de reproducción ovípara observándose escasa producción de nauplios en todas las salinidades experimentales utilizadas. La cepa nativa de La Villa produjo mayor número de descendientes en todas las salinidades experimentales estudiadas respecto de la cepa de San Francisco, con los más altos registros, 229 (\pm 121,29) descendientes, a la salinidad 50‰ y los menores 100,5 (\pm 121,29) a 35 ‰ respectivamente (Tabla 24). Además, en esta cepa se registró una mayor proporción de nauplios en todas las salinidades experimentales comparadas con la cepa norteamericana, especialmente cuando su cultivo se llevo a cabo 125‰ (Tabla 24). El análisis estadístico realizado confirma un efecto significativo a salinidades de 50 y 75 ‰ en la producción de quistes ($P < 0.05$). Aunque se registro un efecto significativo en la producción de quistes cuando los ejemplares fueron cultivados a salinidad menor, éste fue negativo ($P < 0,05$) y redujo el número de descendientes producidos en forma ovípara (Tabla 25).

Tabla 24. Descendencia de *Artemia* de las cepas San Francisco USA y La Villa (Chile) a distintas salinidades experimentales.

Cepa	Numero de Pares	Salinidad (‰)	Total de Quistes (sd)	Total Nauplios (sd)	Descendencia Total (sd)
San Francisco, USA	10	35	173,7 (133,18)	1,5 (4,74)	175,2 (135,95)
	10	50	165,8 (35,91)	24,6 (51,98)	190,4 (53,06)
	10	75	114,9 (82,69)	1,1 (3,47)	116,0 (82,38)
	10	100	160,1 (103,04)	34,1 (52,71)	194,2 (110,46)
	10	125	154,2 (107,87)	4,8 (15,17)	159,0 (114,00)
	10	150	71,7 (70,05)	7,4 (23,40)	79,1 (67,00)
La Villa, Chile	9	35	78,6 (67,97)	21,8 (25,95)	100,5 (81,89)
	10	50	197,5 (124,06)	32,0 (25,17)	229,5 (121,29)
	10	75	142,5 (89,99)	69,6 (83,04)	212,2 (123,14)
	10	100	60,1 (24,73)	67,1 (48,19)	127,2 (57,80)
	10	125	76,3 (79,90)	105,4 (97,00)	181,7 (115,91)
	10	150	52,4 (57,28)	94,7 (66,12)	147,2 (76,58)

Tabla 25. Análisis de Varianza del efecto de la salinidad en la generación de descendientes enquistados en la cepa de *Artemia* de la Bahía de San Francisco (USA) y de La Villa (Chile). * Significativo ($P < 0,05$).

Cepa	Salinidad	Pendiente B	Error estándar	T	P	Intervalo de Confianza	
						Menor	Mayor
San Francisco, USA	35	0,094	0,187	0,501	0,619	-0,281	0,468
	50	0,112	0,187	0,597	0,553	-,0263	0,486
	75	0,242	0,187	1,292	0,202	-0,133	0,616
	100	-0,149	0,187	-0,797	0,429	-0,524	0,226
	125	0,235	0,187	1,256	0,215	-0,140	0,610
	150	-	-	-	-	0,000*	-
La Villa, Chile	35	-0,788	0,212	3,722	0,000*	0,363	1,212
	50	0,561	0,206	2,719	0,009*	0,147	0,974
	75	0,472	0,206	2,289	0,026*	0,058	0,886
	100	0,292	0,206	1,415	0,163	-0,122	0,706
	125	0,197	0,206	,953	0,345	-0,217	0,610
	150	-	-	-	-	0,000*	-

La Figura 28 presenta los valores promedios del total de descendientes de las cepas SFB y PIC. En general la población de PIC produjo un mayor número de descendientes que la de SFB en todas las salinidades experimentales. La población PIC alcanzó mayor número de descendientes (538 ± 50.47) cuando se mantuvo a la salinidad experimental

de 75‰ mientras que los menores valores (279 ± 38.23) se observaron a la salinidad máxima (150‰) afectando en forma significativamente negativa el número quistes producidos (Tabla 26 y 27). La mayor proporción de descendientes fue a través de reproducción ovípara (excepto a la salinidad 50 y 75‰) con escasa producción de nauplios en todas las salinidades experimentales utilizadas. El test *a posteriori* Tukey confirma en la población PIC el efecto significativo positivo y negativo ($P < 0.05$) de la salinidad de 75‰ y 150‰ respectivamente, en el número total de descendientes.

Tabla 26. Análisis de varianza del efecto de las salinidades experimentales en el número total de descendientes para las poblaciones PIC y SFB.

	<i>Efecto (GL)</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Localidad	1	243.985626	1.79725E-29
Salinidad	5	28.8162708	1.80294E-18
Entre	5	37.7042542	3.27674E-22

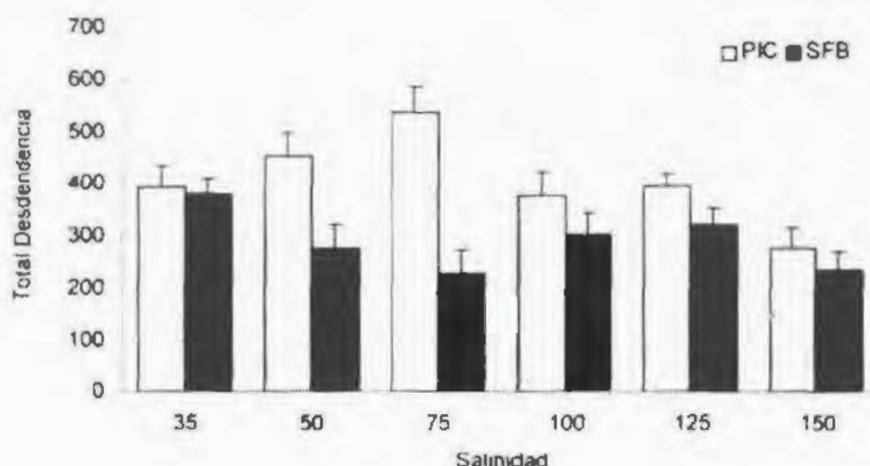


Figura 28. Descendencia de *Artemia* de las cepas PIC y SFB a distintas salinidades experimentales.

Tabla 27. Test *a posteriori* Tukey del análisis de varianza del efecto de las salinidades experimentales en el número total de descendientes en las poblaciones de PIC y SFB.

		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
1*	a		0.0347	0.0001	0.9991	1.0000	0.0001	0.9999	0.0001	0.0001	0.0003	0.0101	0.0001
1	{1}												
1	b	0.0347		0.0007	0.0018	0.0561	0.0001	0.0032	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
1	{2}												
1	c	0.0001	0.0007		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
1	{3}												
1	d	0.9991	0.0018	0.0001		0.9956	0.0001	1.0000	0.0001	0.0001	0.0058	0.1340	0.0001
1	{4}												
1	e	1.0000	0.0561	0.0001	0.9956		0.0001	0.9991	0.0001	0.0001	0.0002	0.0058	0.0001
1	{5}												
1	f	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001		0.0001	1.0000	0.2213	0.9493	0.3410	0.4118
1	{6}												
2*	a	0.9999	0.0032	0.0001	1.0000	0.9991	0.0001		0.0001	0.0001	0.0032	0.0882	0.0001
2	{7}												
2	b	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	1.0000	0.0001		0.2213	0.9493	0.3410	0.4118
2	{8}												
2	c	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.2213	0.0001	0.2213		0.0032	0.0002	1.0000
2	{9}												
2	d	0.0003	0.0001	0.0001	0.0058	0.0002	0.9493	0.0032	0.9493	0.0032		0.9956	0.0101
2	{10}												
2	e	0.0101	0.0001	0.0001	0.1340	0.0058	0.3410	0.0882	0.3410	0.0002	0.9956		0.0003
2	{11}												
2	f	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.4118	0.0001	0.4118	1.0000	0.0101	0.0003	
2	{12}												

16. Recolección de quistes

Durante la temporada 2003-2004 se recolectaron 60 g de quistes (peso seco), de ellos el 69,6% (41,8 g) se colectaron desde el estanque PT1 (modificado perimetralmente), mientras que en los otros dos de la serie (PT2 y PT3) no se observaron quistes (Figuras 33 y 34). La colecta máxima (13 g) se produjo con una densidad poblacional de 90 ind/l, de los cuales 28,6 correspondían a hembras ovíparas (Figura 32). En los estanques modificados transversalmente se colectaron 14,3 g (23,8%). La colecta máxima en la unidad productiva CT1 fue de 4,6 g con una densidad poblacional de 140 ind/l, de los cuales 21,3 eran hembras ovíparas (Figura 29). En CT2 la colecta máxima alcanzó los 4,3 g con una densidad de 191 ind/l y de ellos 38,1 fueron hembras ovíparas (Figura 30). Mientras que CT3 no se observó producción de quistes a pesar de haberse detectado

hembras ovíparas (Figura 31). En los estanques modificados longitudinalmente CL1-1' y CL2-2' se colectaron 1,1 g de quistes con la presencia de hembras ovíparas de 120,2 y 54 ind/l respectivamente, mientras que las densidades poblacionales de 1080 y 120,2 ind/l en CL1-1' y CL2-2' respectivamente (Figuras 30 y 31).

La totalidad de las modificaciones realizadas en los estanques constituían un volumen de 39,79 m³ disponibles para el cultivo de *Artemia*. Así, la producción en g de quistes por m³ de agua destinada al cultivo durante la temporada fue de 2,56.

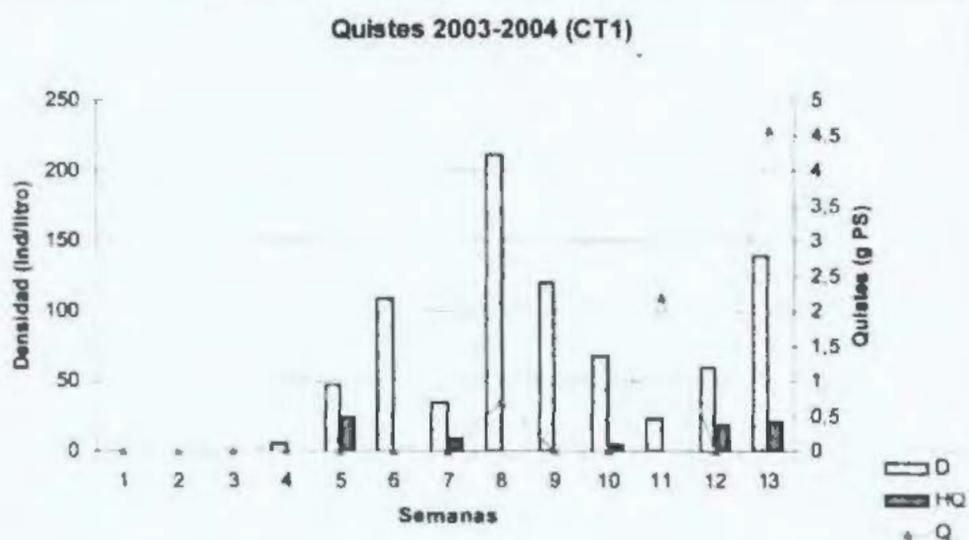


Figura 29. Muestra la producción de quistes en el estanque CT1, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población.

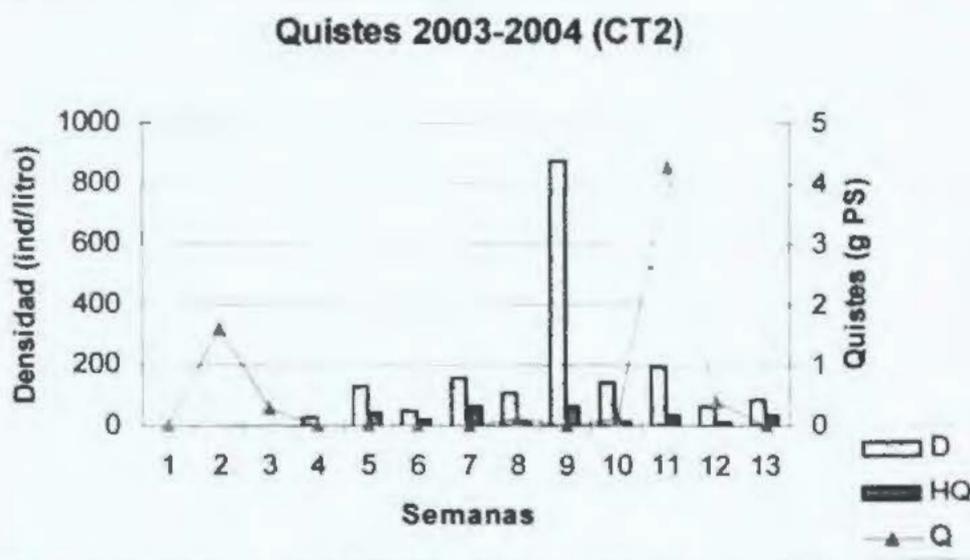


Figura 30. Muestra la producción de quistes en el estanque CT2, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población.

Quistes 2003-2004 (CT3)

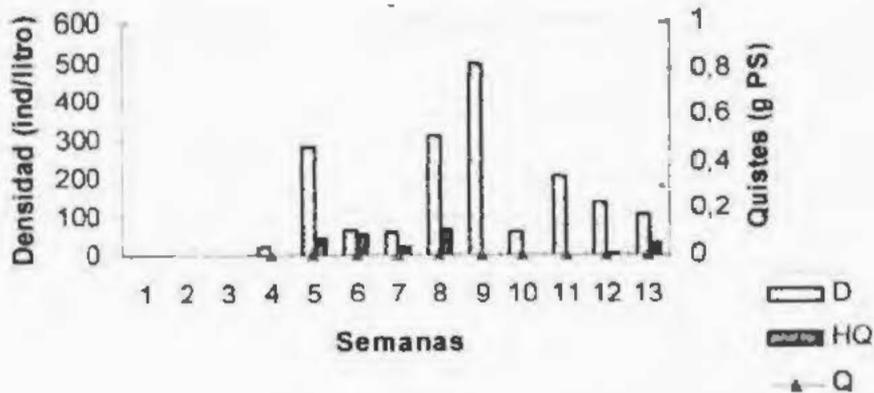


Figura 31. Muestra la producción de quistes en el estanque CT3, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población.

Quistes 2003-2004 (PT1)

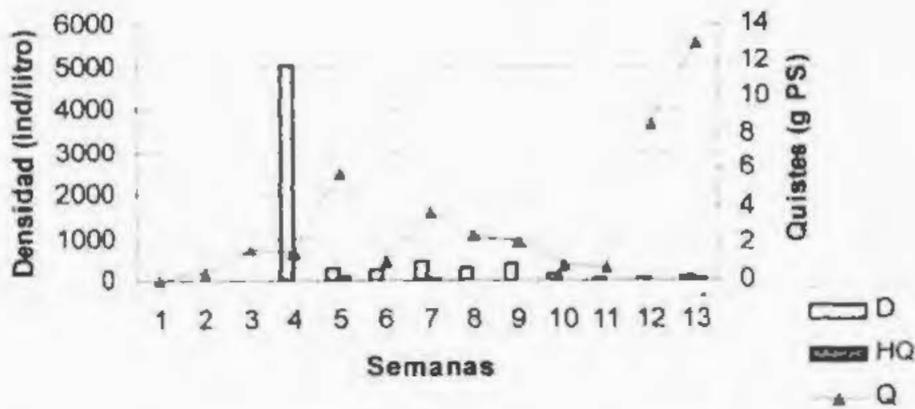


Figura 32. Muestra la producción de quistes en el estanque PT1, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población.

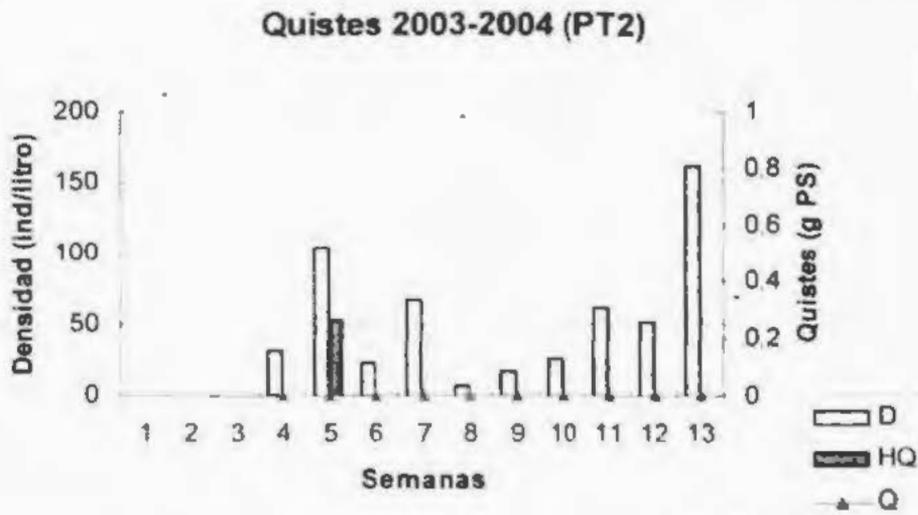


Figura 33. Muestra la producción de quistes en el estanque PT2, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población.

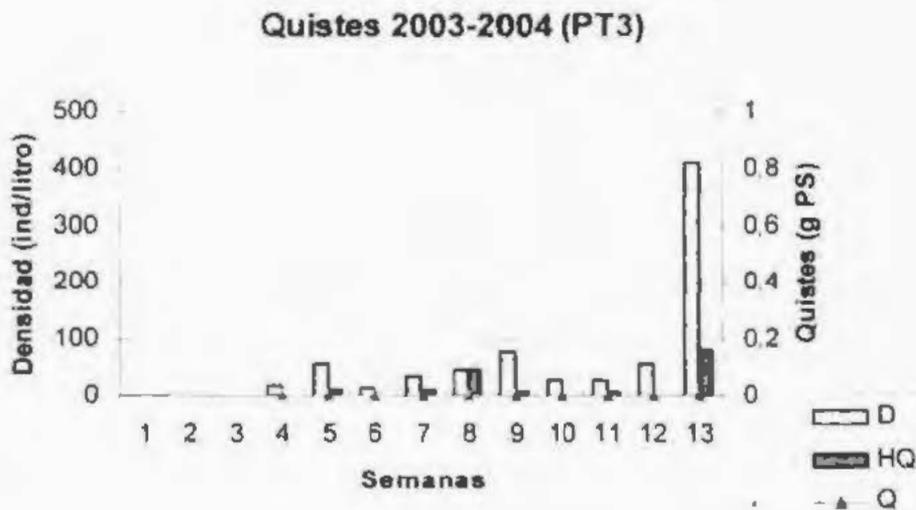


Figura 34. Muestra la producción de quistes en el estanque PT3, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población.

Quistes 2003-2004 (CL1-1')

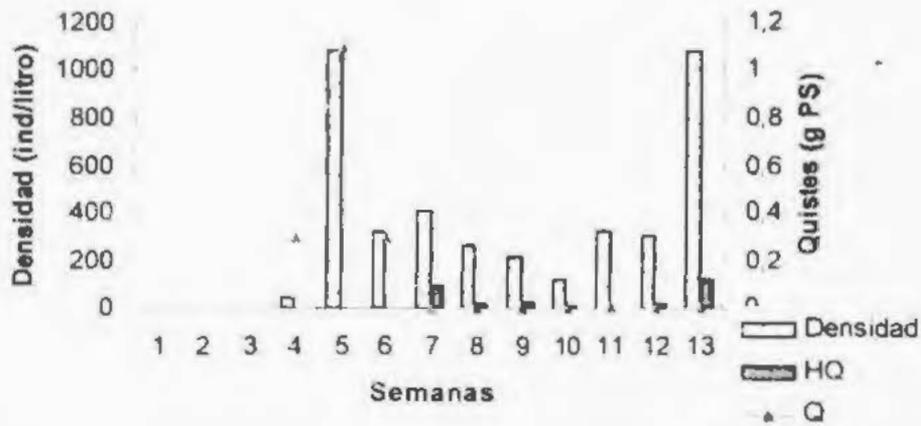


Figura 35. Muestra la producción de quistes en el estanque CL1-1', contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población.

Quistes 2003-2004 (CL2-2')

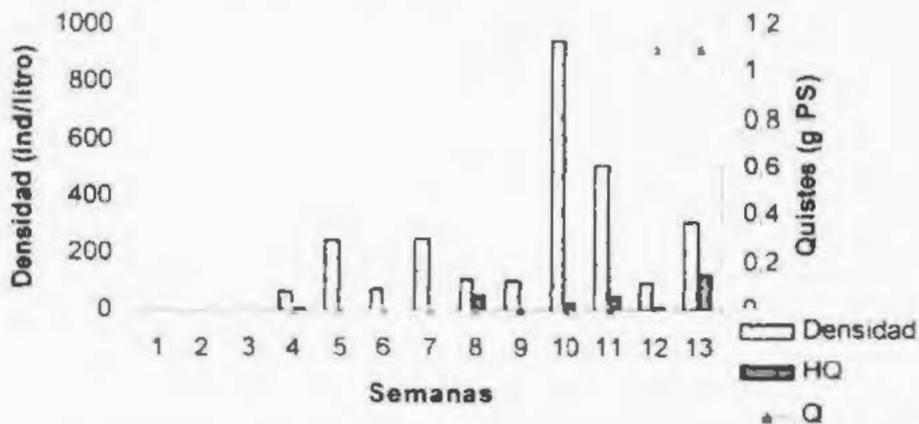


Figura 36. Muestra la producción de quistes en el estanque CL1-1', contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población.

La producción de quistes durante la temporada 2004-2005 alcanzó a 4.200 g (peso húmedo), en un volumen útil de cultivo de 217,8 m³, lo que se traduce en 19,28 g de quistes por m³ durante la temporada o 2,63 g de quistes/m³/mes. El estanque más

productivo fue CT3, en que se cosecharon 1869,5 g de quistes (peso húmedo). La colecta máxima en esta unidad fue de 345,9 g de quistes con una densidad poblacional aproximada de 500 ind/l y 26 hembras ovíparas por litro de agua (Figura 39). La mayor colecta realizada en CT1 fue de 220,6 g con una presencia de 34 hembras ovíparas por litro de agua y una densidad poblacional 325 ind/l (Figura 37). Mientras que en CT2 la colecta máxima fue de 119,1 g de quistes con una densidad poblacional de 238 ind/l y 10 hembras ovíparas/l (Figura 38). La Figura 40 muestra la producción de quistes en la unidad PT1, que aunque sólo funcionó tres semanas se lograron colectar 74,98 g de quistes. En esta unidad productiva se registró la densidad poblacional más alta que alcanzó los 2515 ind/l.

Cabe señalar que el estanque CT2 aunque tuvo el porcentaje más alto de hembras con quistes (7,4%) produjo sólo el 17,21% de los quistes, mientras que los estanques CT3 y CT1 con porcentajes promedio de hembras ovíparas durante la temporada de 7,0% y 5,3% produjeron el 19,74% y 60,61% respectivamente.

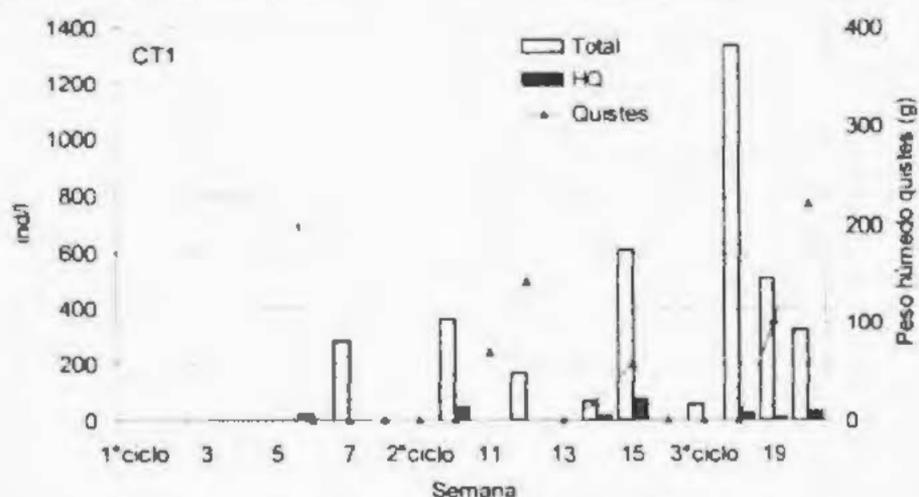


Figura 37. Muestra la producción de quistes en el estanque CT1, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población durante la temporada 2004-2005.

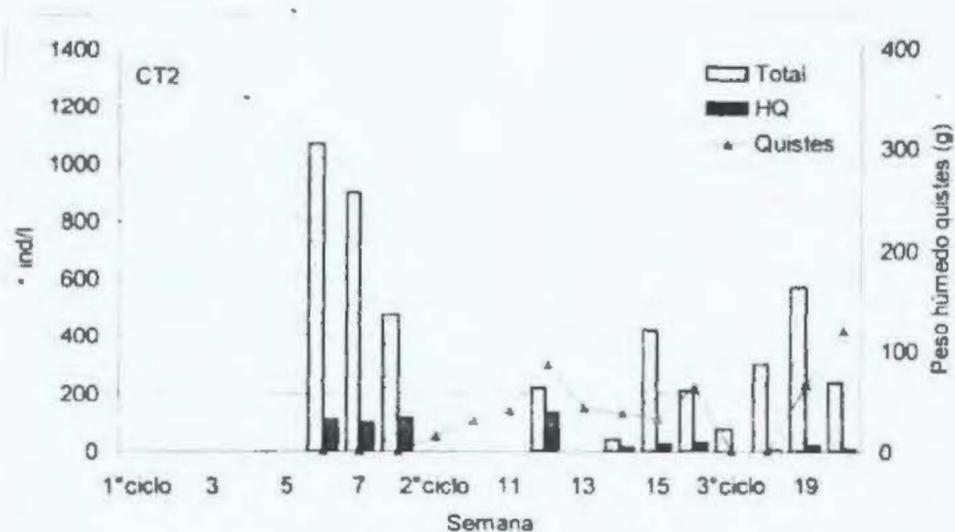


Figura 38. Muestra la producción de quistes en el estanque CT2, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población durante la temporada 2004-2005.

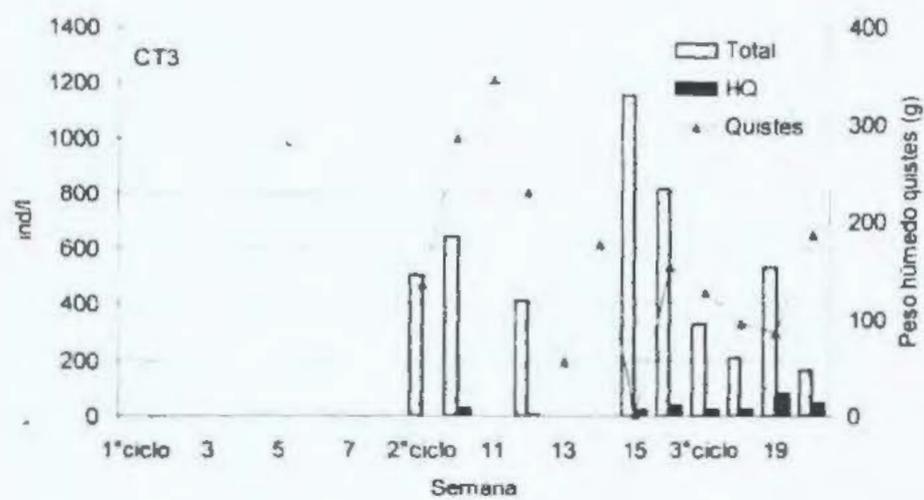


Figura 39. Muestra la producción de quistes en el estanque CT3, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población durante la temporada 2004-2005.

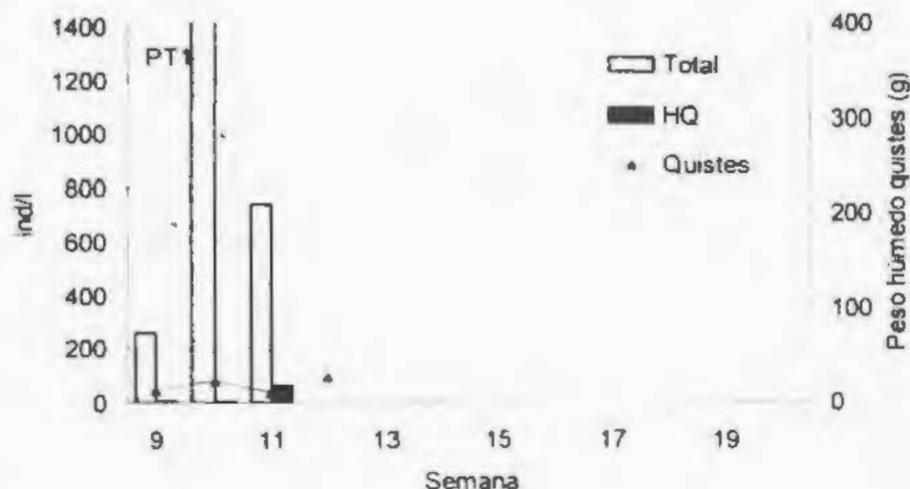


Figura 40. Muestra la producción de quistes en el estanque PT1, contrastada con la densidad poblacional y el porcentaje de hembras ovíparas en la población durante la temporada 2004-2005.

Para el periodo de tiempo que comprende la extensión del proyecto (temporada 2005-2006), la producción alcanzó los 829,3 g de quistes peso húmedo, producidos en 4 estanques que en conjunto representan 217,8 m³. Así la producción puede ser expresada como 3,81 g de quistes peso húmedo/m³/temporada, lo que al compararse con la meta planteada para 726 m³ de 11,32 g de quistes peso húmedo/m³/temporada, implica una efectividad de 33,64%.

Del total de quistes cosechados un 33,9% (281,13 g) no fueron viables (eclosionados en terreno) y del remanente un 49,8% del peso (270 g) corresponde a pérdida por humedad lo que resulta en 273 g peso seco durante la temporada (Tabla 28).

Tabla 28. Producción de quistes para la temporada 2005-2006. B+M: total quistes cosechados (peso húmedo) periodo 2005-2006; B: producción final en gramos peso seco; PC: % de pérdidas por condición y PH: % pérdidas por humedad.

	B (g PS)	Malos (g PH)	B+M (g PH)	PC (%)	PH (%)
Total	273	270	829,3	33,9	49,8

17. Limpieza de quistes

La colecta de quistes desde los estanques de cultivo de *Artemia* involucra la utilización de tamices de distinta abertura de malla, así, al laboratorio sólo se transportan quistes y no agua. Si bien este método de colecta resulta algo más lento, conlleva la ventaja de haber eliminado gran parte de las impurezas de gran tamaño presentes en los estanques (hojas, ramas e insectos, entre otras), lo que equivale a la eliminación del 100% de estas macro impurezas. Otras impurezas como tierra y microalgas (muy abundantes) fueron eliminadas exitosamente con el proceso de lavado realizado en el laboratorio.

18. Secado de quistes

El secado de quistes en bandejas a temperatura ambiente durante la primera temporada, si bien permitió la pérdida de peso de éstos hasta lograr peso constante en aproximadamente 5 días, no fue posible establecer el porcentaje de humedad residual de los quistes, y por ende si ellos estaban en las condiciones óptimas para su almacenamiento.

La construcción de un deshidratador solar durante la segunda temporada productiva (2004-2005) permitió el secado de los quistes (hasta lograr peso constante) en un tiempo promedio de 12 horas (Figura 41), y a una temperatura que se mantuvo entre 35 y 38° C. Cabe señalar que el proceso de secado no se logró en el transcurso de un día, por lo que los quistes permanecieron durante una noche en el deshidratador para continuar su proceso de secado al día siguiente. Durante la tercera temporada el uso de un termoventilador para el secado de quistes permitió disminuir de 12 a 8 horas el tiempo de secado, lo que implica un mejoramiento en la tasa de secado de 15%.

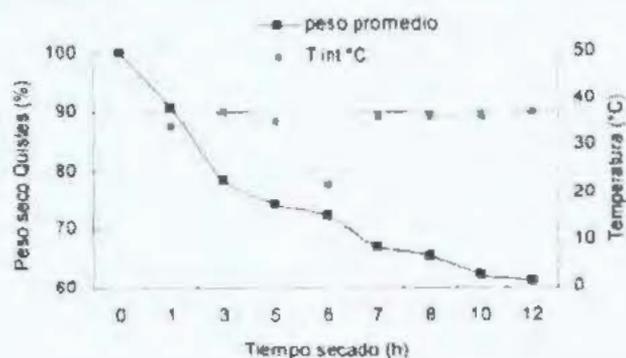


Figura 41. Curva de secado quistes en deshidratador solar temporada 2004-2005.

El rendimiento promedio obtenido con los tres lotes de quistes sometidos a este proceso fue de $54\% \pm 7$ (Tabla 30).

Tabla 29. Rendimiento (%) de los grupos de quistes colectados para el periodo comprendido entre febrero y abril de 2005 en las salinas de la villa.

Partida quistes	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Rendimiento (%)
1	1236,2	749,9	61
2	653,3	311,4	48
3	507,9	268,8	53
Promedio \pm Stdev			54 ± 7

19. Almacenamiento de quistes

Los quistes producidos durante la primera temporada, luego de secados fueron depositados en bolsas y mantenidas en un desecador con silica-gel. Desde aquí se sacaron sólo para preparar las muestras que seían enviadas a Bélgica para ser analizadas. Mientras que los quistes producidos durante a temporada 2004-2005 luego de secados fueron puestos en bolsas metalizadas trilaminares y selladas al vacío. Dadas las características del envase, los quistes no requirieron de ningún almacenamiento especial.

20. Evaluación del tiempo de deshidratado en salmuera sobre el contenido de humedad y porcentaje de eclosión de quistes

El porcentaje y eficiencia de eclosión de los quistes de Artemia almacenados durante 1, 2, 3, 4 y 5 semanas en salmuera están representados en la Figura 42 y Tabla 31. En general una escasa eclosión de quistes se registró luego de 24h de inoculados para todos los periodos de permanencia de éstos en salmuera, mientras que a las 72h se registró los mayores porcentajes de eclosión. Estos porcentajes fluctuaron entre 11,34 y 52,35 % en aquellos quistes que permanecieron al menos 3 semanas en salmuera. De acuerdo a los resultados los mayores registros de eficiencia de eclosión se obtuvieron también luego de 72h post-inoculación para aquellos quistes que permanecieron 4 semanas en salmuera, lo que indicaría que en este caso a partir de 1 gramo de quistes se obtendrían en promedio 188.000 nauplios (Tabla 31).

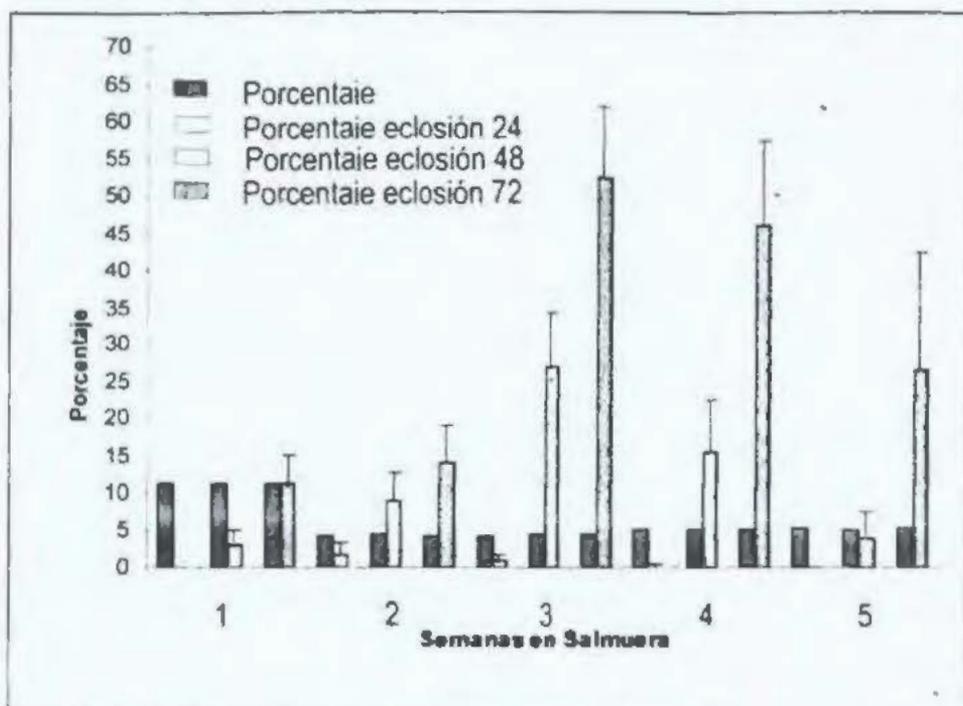


Figura 42. Porcentaje de humedad y eclosión de quistes de *Artemia* almacenados durante 1, 2, 3, 4 y 5 semanas en contenedores con salmuera durante la temporada 2005-2006.

Tabla 30. Porcentaje y eficiencia de eclosión a las 24, 48 y 72 h de quistes de *Artemia* almacenados post-cosecha en contenedores durante 1, 2, 3, 4 y 5 semanas en salmuera durante el periodo 2005-2006.

24h	1	2	3	4	5
Porcentaje eclosión	0	1.64	0.87	0.10	0.00
SD	0	1.54	0.72	0.30	0.00
Eficiencia eclosión	0	1069.87	402.80	133.33	0.00
48 h					
Porcentaje eclosión	3.08	9.01	26.99	15.64	3.94
SD	1.90	3.73	7.54	6.96	3.79
Eficiencia eclosión	7733.33	35866.67	100800.00	42800.00	18266.67
72 h					
Porcentaje eclosión	11.34	14.17	52.35	46.10	26.44

SD	3.76	4.98	9.60	11.06	15.77
Eficiencia eclosión	41333.33	52266.67	136933.33	188000.00	143733.33

El periodo de almacenamiento post-cosecha afectó significativamente el porcentaje de humedad de los quistes ($p < 0,05$) (Tabla 31) aunque este no tuvo un efecto en el porcentaje de eclosión de ellos ($p > 0,5$). El test a posteriori indicó que los quistes deben permanecer al menos 2 semanas en salmuera para alcanzar porcentajes de humedad menores a los requeridos por los controles de calidad (10%). Aunque no existe diferencia en la deshidratación de los quistes entre un periodo de almacenamiento de entre 2 y 3 semanas en salmuera, 4,30 y 4,34 % respectivamente éstos fueron ligeramente menores respecto de aquellos que fueron sometidos a tratamientos más prolongados (4 y 5 semana) (Tabla 32, Figura 42).

Tabla 31. Análisis de varianza del efecto de la permanencia de los quistes en salmuera sobre el porcentaje de humedad de los quistes *Artemia*.

df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
2	1110,59	12,00	146,95	7,55	0,008

Tabla 32. Test a posteriori Tukey del efecto de la permanencia de los quistes de *Artemia* en salmuera durante distintos periodos de tiempo.

Tiempo en semanas				
1	2	3	4	5
a	b	b	c	c

21. Cosecha de biomasa

La cosecha de biomasa durante la primera temporada alcanzó los 6.500 g, sobre la base de un sistema de cultivo monociclo, mientras que en la segunda y tercera fue de 15.000 y 23.800 g con un sistema de cultivo multiciclo.

El objetivo productivo planteado para la extensión fue de 165 g de biomasa peso húmedo/m³/temporada, considerando una temporada con tres ciclos y un volumen de 726 m³ (10 estanques). Calculando la producción obtenida en los 4 utilizados (de los 10

considerados), el objetivo fue logrado en un 66% (109,3 g de biomasa peso húmedo/m³/temporada). Sin embargo, la meta fue planteada considerando una temporada de 3 ciclos y puesto que tal situación se dio sólo en 1 estanque (CT3) se calculó la eficiencia para cada estanque, siendo necesario transformar la meta a kg de biomasa húmeda/ciclo/estanque. Así, tal transformación da como resultado 2,99 kg/ciclo/estanque como meta productiva, que al ser comparada con la producción real, en términos porcentuales muestra que el objetivo fue logrado en un 51,33, 51,33, 81,23 y 142,52% en los estanques CT1, CT2, PT1 y CT3, respectivamente, y que al ser promediados dan una eficiencia de 81,6%.

En las tres temporadas productivas se empleó el mismo método de cosecha ya que demostró ser eficaz, aunque podría mejorarse la eficiencia por medio del uso de una bomba de mayor caudal. Además, podría introducirse cambios respecto de los materiales utilizados para la construcción de mangas. Idealmente podrían ser fabricadas con malla baby citrus, ya que su tramado aunque capaz de retener inclusive los metanauplios de *Artemia*, permite el paso de tierra y arena, lo que junto con hacer más rápido el proceso de cosecha (al no obstruirse tan fácilmente como la batista), facilitaría el posterior lavado de la biomasa.

22. Procesamiento de biomasa

El proceso de limpieza de la biomasa cosechada durante la primera temporada se pudo realizar de manera eficaz, eliminando casi la totalidad de las impurezas. Aunque el tiempo requerido fue de 2 horas aproximadamente, un tiempo excesivo teniendo en cuenta la pequeña cantidad de biomasa manejada. La conclusión fue que los materiales empleados para la limpieza no eran los óptimos. Así, durante la segunda temporada se probó con éxito la malla baby citrus, el que se vio reflejado en una notable reducción (75%) del tiempo necesario para la faena de limpieza, y en la obtención de una biomasa más limpia.

23. Pruebas de secado de biomasa

El secado de biomasa utilizando calor se llevó a cabo en el deshidratador solar construido durante la temporada 2004-2005. En el primer ensayo, el peso constante de la biomasa se alcanzó luego de 96 horas en el deshidratador (12 días), con un tiempo

efectivo de secado⁷ correspondiente a 6 días. El rendimiento promedio fue de 13,1%. De manera que a partir de 2.025 g de biomasa húmeda se obtuvo 260 g de biomasa seca para ser envasada. Mientras que para el segundo ensayo, el peso constante se logró transcurridas 128 horas (16 días) de permanencia en el deshidratador de los que sólo 6 fueron de secado efectivo. El rendimiento promedio logrado fue de 18%, es decir que de los 1.198 g de biomasa húmeda se obtuvo 217,5 g.

La biomasa dispuesta en bandejas con malla baby citrus (Figura 43b) presentó la desventaja de requerir más tiempo para el lograr peso constante. Sin embargo, por ser un material más rígido permitió un retiro mucho más fácil de la biomasa desde las bandejas. Por el contrario, el uso de tela (batista) en las bandejas (Figura 43a) tiene dos inconvenientes; el primero dice relación con la dificultad para despegar la biomasa seca desde la tela, y el segundo es consecuencia del primero, es decir, producto del manejo para despegar la biomasa esta se muele demasiado, lo que podía significar un problema con miras a su comercialización.

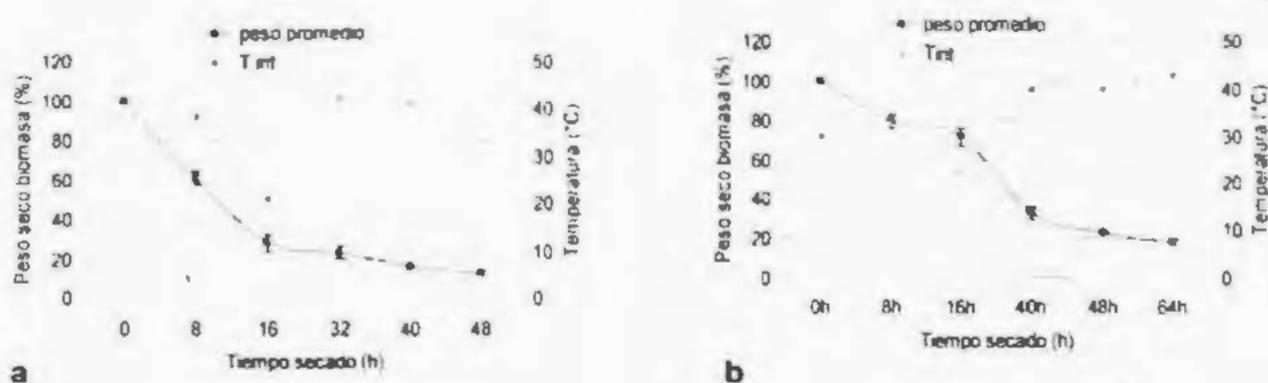


Figura 43. Curva de secado de biomasa en el deshidratador solar temporada 2004-2005. a) Paño de tela batista; b) Malla baby citrus.

Por otra parte, el secado de biomasa a través de liofilización realizado en el laboratorio de Genética & acuicultura (ULA, Osorno), requirió de 28 horas. La mayor pérdida de humedad se registró durante las primeras horas, mientras que luego de 24 h de liofilización este proceso se volvió cada vez más lento hasta alcanzar un peso constante (Tabla 34). El peso inicial de las botellas con biomasa durante la primera temporada fue

⁷ Se consideró como tiempo efectivo de secado sólo los días soleados.

de 87,0 g mientras que el final alcanzó un 23,0 g lo que significa un rendimiento (peso húmedo/peso seco) del 26,43%. La visión gráfica de la experiencia se representa a través de la curva de secado que se muestra en la Figura 44.

Una vez finalizado el proceso de liofilización, las muestras fueron puestas en bolsas plásticas y enviadas a Pichilemu para ser envasadas.

Tabla 33. Biomasa de *Artemia*. Registro del proceso de liofilización temporada 2004-2005.

Tiempo (h)	Peso (g) Botella 1	Peso (g) Botella 2	Peso (g) Botella 3	Peso (g) Botella 4	Peso (g) Promedio/hora
0	87,0	87,0	87,0	87,0	87,00
1	82,5	81,9	81,2	81,5	81,78
2	77,6	76,8	76,2	77,0	76,90
3	73,8	72,6	72,0	73,0	72,85
4	70,3	68,9	68,3	69,7	69,30
5	66,8	65,0	64,4	65,9	65,53
6	61,8	59,7	59,1	60,8	60,35
7	58,8	56,3	55,8	57,6	57,13
8	56,1	53,2	52,8	54,8	54,23
24	30,0	25,9	25,9	28,4	27,55
25	28,4	24,6	24,5	27,0	26,13
26	27,3	23,4	23,3	25,8	24,95
27	25,4	21,8	21,8	24,2	23,30
28	25,2	21,5	21,5	24,0	23,00

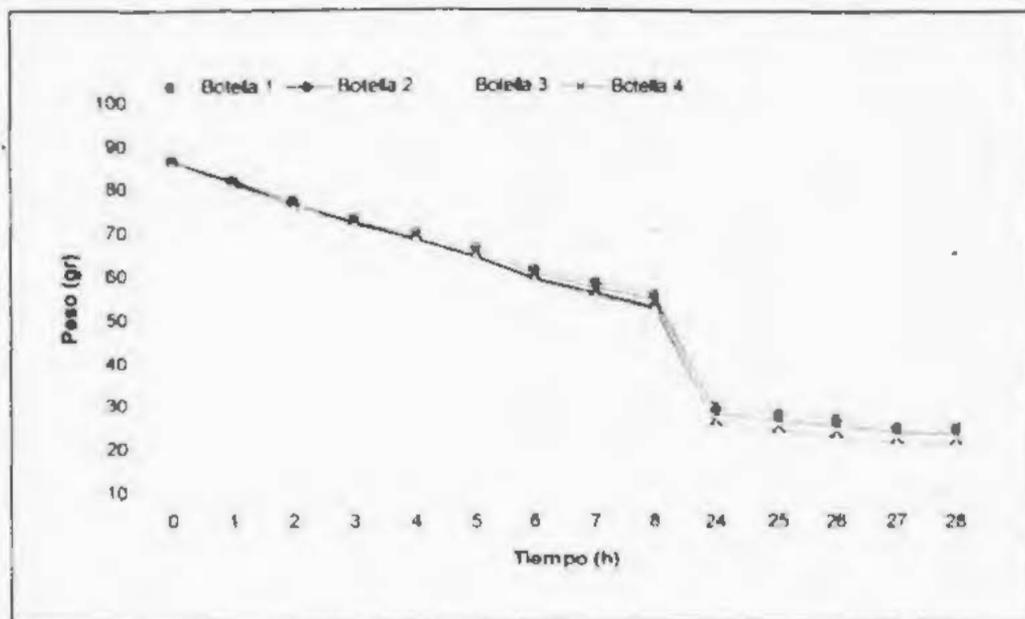


Figura 44. Curva de secado, mediante el proceso de liofilización, de biomasa congelada de *Artemia* provenientes de la localidad de La Villa, Pichilemu (2004-2005).

De acuerdo al informe emitido por el *Artemia Reference Center* los porcentajes de humedad en las muestras de biomasa secada por calor y liofilizada fueron de 13 y 7%, respectivamente. Lo que dejaría en evidencia que la biomasa secada por calor requiere de un mayor tiempo de secado para lograr porcentajes de humedad inferiores al 10%.

24. Pruebas de empaque para quistes y biomasa

Los ensayos realizados con los materiales disponibles para envasar quistes y biomasa (bolsas metalizadas trilaminares y PVC de 15 μ m) permitieron establecer la mejor combinación de tiempo de vacío, y tanto tiempo como temperatura de sellado. Así, el sellado más eficaz utilizando bolsas metalizadas fue 25 y 2,5 seg de vacío y sellado, respectivamente, mientras que la temperatura media fue la óptima. Mientras que para el envasado con lámina de PVC la combinación óptima fue 20 y 2,5 seg de vacío y sellado respectivamente, en tanto que la temperatura utilizada fue baja.

Transcurridos diez meses desde que la biomasa fue envasada, se puede decir que las bolsas metalizadas resultan eficaces en la mantención del vacío y por ende de las

características de la biomasa al momento de ser envasada. Distinto es el caso de las bolsas de PVC, las que luego de tres meses en promedio, comenzaron a perder el vacío.

25. Cosecha de sal

Durante la temporada 2003-2004, luego de aproximadamente 4 años sin actividad en el sitio El Pílon (salina 1), se lograron cosechar en total 30.000 kg de sal (500 sacos). Mientras que durante la segunda temporada productiva del proyecto (2004-2005), se realizaron 3 cosechas de sal, la primera de las cuales involucró 3 cristalizadores, mientras que en las dos restantes se hicieron sobre 5 piezas cristalizadoras, lográndose al final de la temporada una producción de 900 sacos, equivalentes a 45.000 kg de sal. Mientras que la cosecha para la temporada 2005-2006 alcanzó los 600 sacos, equivalentes a 30.000 kg de sal.

26. Contacto con eventuales compradores

Como resultado concreto del envío de muestras a los eventuales usuarios de *Artemia*, se destaca el contacto con la Asociación de Acuaristas de Chile (ACDA). Las exitosas pruebas de alimentación realizadas con las muestras enviadas fue motivo de la realización de una charla informativa el día 3 de septiembre de 2005, cuyo tema principal fue dar a conocer las características nutricionales y ventajas del uso de *Artemia* en "acuarofilia". Además, se enviaron muestras a las tiendas de acuario Aquazoo, Aquaplant y Monmar Aquarium, y a la empresa camaronera C.I. Cartagena de Acuicultura S.A. (Zeus Investments Inc. Sucursal Colombia Cartagena Shrimp Co.).

Las opiniones expresadas por quienes usaron las muestras enviadas indican que la biomasa de *Artemia* tendría usos específicos según su procesamiento. Así, la biomasa secada por calor por hundirse rápidamente no está disponible para aquellas especies que se alimentan en la superficie, pero resulta ideal para otras que tienen hábitos bentónicos de alimentación. Mientras que con la biomasa liofilizada la situación es totalmente opuesta, vale decir que sus características de flotabilidad la hacen ideal para la alimentación de peces que se alimentan tanto en la superficie como en la columna de agua. Finalmente, otro dato importante es que al comparar la aceptación de la biomasa de la biomasa de *Artemia* versus los alimentos formulados, esta es mucho mayor. No

obstante, algunas opiniones sugieren la necesidad de contar con una certificación respecto de la calidad microbiológica para la biomasa congelada.

27. Prueba de cultivo de Artemia durante el invierno

Transcurrido aproximadamente un mes desde la inoculación de Artemia se observaron individuos adultos, aunque en muy pequeño número. Cabe destacar que durante este tiempo la temperatura del agua descendió hasta 9° C. Las intensas lluvias registradas durante el invierno permitieron la formación de una halo/termoclina a 0,25 m de profundidad, lo que permitió contar con una temperatura de 14 y 10 °C en promedio bajo y sobre la termoclina, respectivamente. Lo mismo ocurrió con las salinidades, cuyos valores promedio fluctuaron en torno a los 40 y 20 ppt sobre y bajo la haloclina, respectivamente.

La reproducción fue predominantemente ovovivípara sólo durante el mes de julio y a partir de agosto se hizo evidente la predominancia de hembras ovíparas, dando comienzo a la producción de quistes que alcanzó su máximo promediando el mes de septiembre.

Para el periodo correspondiente a la extensión del proyecto, la salinidad y la temperatura promedio fueron de 45 ppt y 14 °C bajo la termo/haloclina, respectivamente. Mientras que sobre ésta las variables de salinidad y temperatura promedio fueron de 18 ppt y 12 °C, respectivamente.

En cuanto a las cosechas de biomasa, se realizaron 3 durante el periodo invernal alcanzando en total 1.250 g (600, 450 y 200 g) sobre la base de peso húmedo, lo que es equivalente a 23,15 g de biomasa peso húmedo/m³/ciclo. Al comparar este resultado con la meta fijada de 86 g de biomasa peso húmedo/m³/ ciclo se obtiene una eficiencia de 26,9%.

Cabe señalar que la meta fue fijada para el cultivo que se desarrollaría en los estanques de las salinas, lo que no se realizó puesto que el pretil que se levanto para proteger las instalaciones cedió antes de poder realizar una cosecha.

28. *Movimiento de tierra*

El pretil levantado alrededor de la salina fue capaz de contener la crecida sólo durante los primeros 3 días de precipitaciones continuas durante el mes de junio. Luego de los cuales el pretil fue rebasado en un sector donde el nivel quedo aproximadamente 0,5 m por debajo de lo establecido, y si bien existía el acuerdo con la empresa que realizó las faenas para reparar esta situación, el arreglo no alcanzó a concretarse antes de las lluvias impidiendo el ingreso de la maquinaria (Fig. 45a y b)

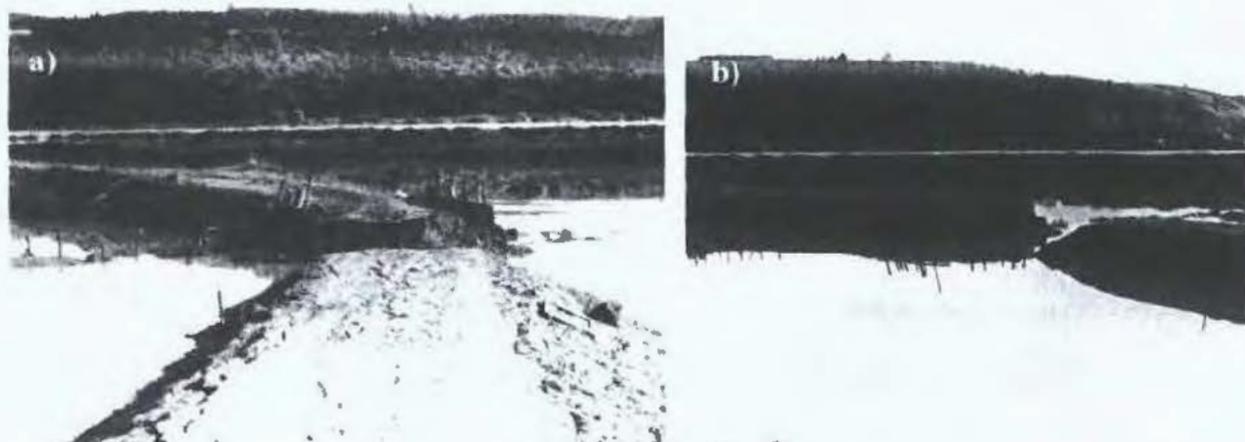


Figura 45. a) y b) pretil de la salina socavado por la crecida del estero Nilahue durante la temporada 2005-2006.

29. *Validación de modelo predictivo de producción de quistes*

La aplicación del modelo predictivo propuesto por Baert et al. (2002) durante los meses de enero y febrero demostró escaso poder de predicción, ya que el ajuste de la curva fluctuó sólo entre un 2 y 17%.

5. Fichas Técnicas y Análisis Económico:

5.1 Ficha técnica de la Especie

Sistemática

Phyllum	Artropoda
Clase	Crustacea
Subclase	Branquiopoda
Orden	Anostraca
Familia	Artemiidae
Genero	Artemia (Leach, 1819)
Especie	Artemia franciscana
Variedad	San Francisco Bay

Distribución

Artemia franciscana es originaria de América, siendo posible encontrarla tanto en el norte, centro y sur del continente. En Chile, prospecciones realizadas hasta principios de 1994 han permitido confirmar la presencia de *Artemia franciscana* en las salinas marinas de Cahuil (VI Región); pozas litorales de Palo Colorado y La Pampilla (Los Vilos y Coquimbo, IV Región); lagunas de los salares de Atacama y Llamara (II Región); pozas litorales de Playa Yape (Iquique, I Región) y lagunas del salar de Surire (Arica, I Región).

Biología

Tamaño adulto	10 a 15 mm
Tamaño nauplio	397,3 a 420 µm
Tamaño quiste	
Sexos	Dioica
Reproducción	Ovovivípara / Vivípara
Fecundidad	229,5 descendientes/hembra cada 3 a 4 días (50‰)
Salinidad de cultivo	15 a 200 ‰

5.2 Ficha técnica del Producto

1. Quistes con cápsula

Diámetro	202,8 a 229,8 µm
Tamaño Instar I	397,3 a 420 µm
% de eclosión	
Eficiencia de eclosión	188.000 nauplios / g de quistes
Salinidad de eclosión	35‰
% de humedad	6%
Contenido DHA	0,1 mg/g
Contenido EPA	23,35 mg/g
Suma A.G. (n-3)	24,2 mg/g

Aplicaciones

Es la forma más comúnmente comercializada, dada las características de calidad representada por la alta concentración de ácidos grasos n-3; pequeño tamaño y altos porcentajes de eclosión este producto es altamente recomendado para la alimentación de estados larvales de organismos marinos.

2. Quistes decapsulados

Diámetro	
Tamaño Instar I	397,3 a 420 µm
% de eclosión	
Eficiencia de eclosión	188.000 nauplios / g de quistes
Salinidad de eclosión	35‰
% de humedad	4 a 5 %
Contenido DHA	0,1 mg/g
Contenido EPA	23,35 mg/g
Suma A.G. (n-3)	24,2 mg/g

Aplicaciones

Es el mismo quiste antes descrito, con la salvedad que a éste se le ha eliminado la cápsula. El quiste se comercializa deshidratado (con un porcentaje de humedad de entre 4 y 5%) por lo tanto debe hidratarse antes de iniciarse el procedimiento de eclosión. El uso de este producto además de simplificar las labores asociadas a la alimentación de las larvas en cultivo, permiten reducir las pérdidas dado que los embriones que no eclosionan también constituyen un excelente alimento ya que contiene hasta un 40% más de energía que los nauplio recién eclosionados y alto contenido de carotenos. Es altamente recomendado para su uso en acuarofilia y en operaciones de acuicultura en que se quiera evitar el proceso de decapsulación.

5.3 Ficha técnica del Producto

1. *Biomasa deshidratada por frío (liofilizada)*

Contenido de humedad	7,5% ± 0,29
Contenido de proteínas	43,39% ± 2,49 (%/g ww)
Contenido de cenizas	29,58 ± 0,29 (%/g ww)
Lípidos Totales	8,69 ± 0,39 (%/g dw)
Contenido DHA	0,2 mg/g
Contenido EPA	8,4 mg/g
Suma A.G. (n-3)	8,7 mg/g

2. *Biomasa deshidratada por calor*

Contenido de humedad	11,23% ± 0,29
Contenido de proteínas	41,90% ± 1,45 (%/g ww)
Contenido de cenizas	29,40 ± 0,21 (%/g ww)
Lípidos Totales	9,04 ± 0,25 (%/g dw)
Contenido DHA	0,1 mg/g
Contenido EPA	9,9 mg/g
Suma A.G. (n-3)	10,3 mg/g

3. *Biomasa Congelada*

Contenido de humedad	
Contenido de proteínas	40,1% / g ww
Contenido de cenizas	33,1 % / g ww
Lípidos Totales	9,04 % / g ww
Contenido Fibra	3,00% / g ww
Contenido Calcio	553,1 µg/g ww

5.4 Protocolo para Decapsulación de Quistes

Establecido para 54 g de quistes

1. Hidratar los quistes en 500 ml de agua dulce durante 1 hora con aireación. Verificar bajo la lupa y si la proporción de quistes hidratados es baja mantener otros 15 minutos.
2. Una vez hidratados los quistes agregar 0,019 litros de solución de NaOH (40%).
3. Adicionar 0,29 litros de hipoclorito de sodio (10%). Esperar la reacción que es verificable con el cambio de color del café rojizo de los quistes hacia anaranjado, a partir de este punto se debe testear el avance utilizando una cánula de vidrio. Cuando en la cánula se observe que alrededor de un 85 a 90% de los embriones decanta se puede desactivar el cloro.
4. Para desactivar el cloro se debe agregar a recipiente de decapsulación 0,291 litros de tiosulfato de sodio.
5. Finalmente, los embriones deben ser lavados con abundante agua dulce hasta que no queden trazas de cloro.

5.5 Análisis de perspectivas del rubro

Una vez finalizado el proyecto, como primera medida se creará una nueva empresa con personalidad jurídica cuya principal actividad será la producción de recursos naturales renovables, con especial énfasis en aquellos vinculados a la actividad salinera realizada en la Provincia Cardenal Caro. Junto con ello, se está en proceso de registro de la marca "ECOARTEMIA", el que debiera finalizar entre los meses de abril o mayo de 2007.

En el ámbito estrictamente productivo, se encuentra en evaluación un proyecto de escalamiento productivo en Innova Chile (CORFO), a través del cual se busca incrementar y estabilizar la producción durante el año por la vía de incorporar intensividad al sistema de cultivo. Una vez logrado dicho objetivo se podrán incorporar a la actividad nuevos productores de las localidades de la Villa, Lo Valdivia y/o Vichuquén. Acercamientos preliminares con salineros interesados en sumarse a la producción de Artemia han permitido establecer como eventual estrategia de negocio la maquila, es decir, a los nuevos productores se les entregará asistencia técnica para la puesta en marcha y explotación de sus unidades productivas, junto con ello se les ofrecerán los servicios de cosecha y procesamiento de la materia prima (biomasa y quistes) a cambio de lo cual se les cobrará con un porcentaje de la producción o su equivalente en dinero.

5.6 MODELO DE NEGOCIOS

Mercado Objetivo

El proyecto presenta dos alternativas de mercado objetivo, los cuales pueden ser alcanzados en forma secuencial en la medida que la empresa y el producto vayan teniendo mayor presencia y reconocimiento dentro del mercado, como así también una mayor disponibilidad de capital con el objeto de incrementar su capacidad productiva para no generar desabastecimientos ante grandes cantidades de pedidos.

En términos simples, dentro del mercado local, su mercado objetivo lo constituyen:

- A. El mercado de alimentos para peces ornamentales (acuarofilia)
- B. El mercado acuícola o de productos producidos en cautiverio.

Si bien es cierto que el mercado objetivo y la estrategia comercial inicial estará dirigido al mercado de alimentos para peces ornamentales, se deja establecido que en la medida que se incremente la producción y se logre posicionar la marca ECOARTEMIA como una alternativa seria de alimentación para peces y crustáceos, se realizarán los esfuerzos tendientes a expandirse hacia el mercado acuicultor.

A. Mercado de alimentos para peces para Acuarofilia

Si nos centramos dentro del primer mercado, se tiene que según antecedentes estadísticos obtenidos desde ASEXMA, durante el año 2.006, las importaciones de

productos para alimentación para peces entre los meses de enero y octubre de 2.006 alcanzaron un monto de MM US\$ 5,4.

De acuerdo a datos de la misma fuente se ha establecido que del total de las importaciones, aproximadamente el 96,13% tiene como principal destino la industria salmonera nacional, mientras que un 3,8% corresponde a productos de alimentación para acuarofilia (hojuelas, pellets y/o quistes y suplementos) equivalentes a US\$ 207.070 anuales.

Así, dado el volumen de las importaciones (aproximadamente 19.000 Kg) y considerando que el esquema asociativo de producción planteado, generará una capacidad de producción superior, es razonable suponer que en un plazo de 3 años será posible acceder al 30% del mercado, con productos bajo el siguiente mix:

- Biomasa Congelada
- Quistes

B. Mercado Acuícola

Dentro del área de los cultivos, aproximadamente son 30 las especies que se están cultivando en diversos centros de cultivo dentro de Chile y que requieren de Artemia en sus estadios tempranos de vida. Sin embargo, no se registran antecedentes respecto del nivel de desarrollo en que se encuentran tales emprendimientos lo que hace difícil proyectar los plazos en que estos puedan alcanzar niveles pilotos y/o comerciales para constituir un verdadero mercado. No obstante, sobre la base de antecedentes científicos se ha logrado establecer un acuerdo con representantes de la industria salmonera para probar la biomasa viva de Artemia en la alimentación de alevines de salmónidos durante la etapa de primera alimentación. Así, la obtención de resultados similares a los citados por Kim et. al. (1996) permitiría la apertura de un mercado enorme en plazos que van de cortos a medianos.

Si bien, de acuerdo a los antecedentes expuestos existe un mercado potencial en el área acuícola, los esfuerzos de comercialización se centrarán al mercado de la acuarofilia. Tal decisión obedece a que manteniendo los actuales niveles de intensividad de cultivo, las producciones alcanzadas permitirán sólo abastecer a éste mercado, lo que podría cambiar con la incorporación de nuevos actores al quehacer productivo.

Organización del Mercado Acuarofilia

Con respecto al nivel de organización del mercado de acuarofilia, éste se caracteriza por no tener una estructura organizada, lo que a la luz del negocio que se pretende emprender es favorable, puesto que a mayor organización de los compradores, pueden desarrollar mayor capacidad de negociación en materia de reducción de precios y de mayor calidad del producto, lo que puede llegar a generar una disminución en los márgenes de utilidad para la empresa.

5.7 Competencia

Mercado Acuarista

La actual lista de competidores que existe en Chile para el producto que se pretende desarrollar son las importaciones directas realizadas principalmente por 4 empresas que son las que distribuyen sus productos entre las tiendas de acuarofilia existentes en el país.

Dado el reducido tamaño del mercado nacional no se vislumbra la aparición de potenciales competidores extranjeros que producto de la globalización y de los tratados de libre competencia empiecen a ofrecer sus productos directamente en el mercado chileno.

Tampoco se prevé que exista interés por parte de los mismos usuarios del producto por realizar importaciones en forma directa, ya que los volúmenes de producción son lo suficientemente atractivos como para generar alguna economía de escala desarrollando ellos mismos esta actividad.

Otra posibilidad de futura competencia, la componen posibles empresas nacionales o extranjeras que actualmente producen o proveen de productos a las empresas dedicadas a los cultivos, siendo para ellos una barrera de entrada solamente el know-how para producir un producto de alto valor alimenticio a costos de producción más bajos. Sin embargo, el tamaño del mercado hace que éste sea poco atractivo para sus intereses comerciales, por el momento.

El atractivo del mercado o el segmento depende de que tan fáciles de franquear son las barreras para los nuevos participantes que puedan llegar con nuevos recursos y capacidades para apoderarse de una porción del mercado.

Una de las principales barreras de entrada al mercado objetivo es la diferenciación del producto.

En cuanto a los Quistes de Artemia, éstos presentan características que ningún otro alimento para peces y crustáceos en estado larval posee. Estas son la facilidad de almacenamiento y la movilidad de los nauplio que emergen de ellos una vez que son eclosionados.

Respecto de la Biomasa Congelada de Artemia esta tiene como principal característica que puede ser comercializada como un alimento natural con alto contenido proteico, y con atractivos niveles de pigmentos y ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's). Además, como ya se ha mencionado, tanto las barreras de ingreso como sus dificultades de transporte y manejo hacen que este producto sea de difícil acceso para los competidores.

Otra barrera es el acceso a la materia prima, aunque en este caso, es el acceso a un lugar que ofrece las condiciones adecuadas para el cultivo como son los estanques hipersalinos en donde se produce sal por evaporación como es el caso de las salinas de las localidades de Barrancas, La Villa y Lo Valdivia en la Provincia de Cardenal Caro, VI Región.

También existe un efecto importante de la experiencia, ya que mientras más se produzca del bien, hay mejoras en la calidad y eficiencia. Este efecto se relaciona con el acceso a tecnología y a las técnicas de producción, que por ahora no se encuentran difundidas por tratarse de una actividad reciente en el país.

Por lo tanto, desde el punto de vista de amenaza de nuevos competidores, este segmento de mercado es atractivo ya que existen suficientes barreras de entrada que dificultan el ingreso a nuevos participantes.

Productos Sustitutos

Para los productos que se pretende penetrar el mercado, a saber, biomasa congelada de *Artemia* y quistes decapsulados, no existen en Chile sustitutos directos. Diferente es la situación para la biomasa deshidratada y los quistes sin decapsular, ya que estos productos son importados directamente por las empresas señaladas anteriormente como competencia. Finalmente, se encuentra una amplia gama de alimentos formulados para peces, que corresponden al grueso de las importaciones cuyo principal componente es la harina de pescado y que son comercializados en forma de hojuelas o pellets.

Cabe indicar que gran parte de los alimentos formulados podrían no ser considerados como competencia puesto que tal como manifiesta Sales & Janssens (2003), existe abrumadora evidencia que demuestra las ventajas del uso de una dieta sobre la base de alimento formulado y *Artemia*. Tales ventajas se reflejarían en aspectos como fecundidad, sobrevivencia larval y post larval, mayor y más rápido crecimiento, y mejores tasas de conversión de alimento. Además, se puede mencionar el hecho de que especies carnívoras como el pez ángel (*Pterofilum scalare*) y el barbo rubí (*Puntius nigrofasciatus*), entre otras presentan predilección por alimentos naturales como *Artemia*.

Una de las grandes desventajas de la biomasa deshidratada que se importa es que dependiendo de la marca puede o no traer información nutricional, de manera que para quienes desean ofrecerles a los peces una dieta balanceada (*Artemia*/alimento formulado) se encuentran con el problema de falta de información y de certificación apropiada cuando esta existe.

En cuanto a los quistes de *Artemia*, la carencia de información y de certificación es aún mayor, vale decir que los envases de quistes carecen por ejemplo, de información nutricional, diámetro promedio, tamaño promedio del nauplio. Ello implica que quien usa de este producto no sabe si efectivamente lo que está comprando sirve para la especie que se pretende alimentar, a modo de ejemplo, si los quistes corresponden a *Artemia persimilis*, estos serán de mayor diámetro y la larva recién eclosionada también será de mayor tamaño que los correspondientes a *A. franciscana*, lo que redundará en que los nauplios estarán disponibles como presa sólo para la porción de larvas de pez de mayor tamaño generando importantes mortalidades por inanición. Otro aspecto importante del uso de quistes con cápsula es el proceso de decapsulación que por el hecho de realizarse con hipoclorito de sodio (cloro casero) genera temores entre los acuaristas quienes en su

mayoría sólo eclosiona los quistes y deja las cáscaras flotando sin saber que estas al ser ingeridas por las larvas provoca mortalidad por asfixia.

Cabe señalar que como estrategia para penetrar el mercado con facilidad, se pondrá énfasis en la producción y venta de biomasa congelada y quistes decapsulados. Ello, teniendo en consideración aspectos no sólo de calidad sino que se trata de dos productos que no se comercializan en Chile debido a al alto costo que implica su importación utilizando medios de transporte refrigerados y su difícil manipulación luego del desembarque. Junto con ello, todos los productos comercializados por ECOARTEMIA contarán con certificación de calidad poniéndolos en una situación de ventaja respecto de los productos actualmente comercializados.

5.8 Estrategia de Comercialización

Producto

El plan de negocios de esta propuesta se basa en la producción inicial de quistes con y sin decapsular, poniendo énfasis en este último dado que es un producto altamente diferenciado y con mayor valor agregado. Este producto además de contar con la ventaja de que los usuarios de quistes evitarán el proceso de decapsulación y con ello las mortalidades por intoxicación con cloro, obtendrán un 100% de rendimiento dado que aquellos embriones no eclosionados también se encuentran disponibles como alimento.

Un aspecto importante a destacar del producto, será su grado de desarrollo pues se pretende alcanzar una eclosión superior al 80%, con una humedad menor al 8%, lo que sumado a una alta concentración de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's) lo convierten en una excelente alternativa. Respecto a esto último, cabe destacar que las concentraciones de estos ácidos grasos en la cepa de Pichilemu alcanzan los 14 mg/100 mg, mientras que de acuerdo a Tamura et al. (1998) en quistes de la misma especie en la Bahía de San Francisco (cepa original, USA) tal concentración sólo alcanza 5,7 mg/100 mg. Otro aspecto destacable de los quistes producidos es su pequeño diámetro (229 μm) que dan origen a un nauplio de aproximadamente 350 μm que está en un rango de 80 a 100 μm por debajo del valor promedio encontrado por Tamura et al. (op.cit)

Por otra parte, la biomasa será vendida mayoritariamente congelada y sólo una pequeña fracción deshidratada por calor. El acento será puesto en el producto congelado debido a que el rendimiento es de 100% y se trata de un "alimento natural", concepto altamente valorado por los acuaristas. Se destacará además el bajo impacto como contaminante del acuario, ello debido a que durante el congelamiento el exoesqueleto se mantiene intacto y al momento de ser puesto en el acuario la masa congelada se disgrega sin liberar los fluidos corporales dejando a los individuos intactos para ser comidos.

No obstante el rendimiento de sólo 10% de la biomasa deshidratada, este es un producto de gran demanda cuando el deshidratado es realizado por frío (liofilizado). Si bien por ahora no se cuenta con la tecnología para su producción, se espera que en un plazo máximo de 5 años se cuente con ella.

Precio:

La estrategia de precio considera un precio de entrada que estará por debajo del actual producto competidor. Es decir, el kilo de cada una de las líneas de producto, son los siguientes:

Tabla 34. Tabla de productos obtenidos con el cultivo de Artemia y sus precios

Producto	Precio Referencia Mercado en tiendas acuaristas (en US\$)	Precio Propuesto por Marco Labarca (en US\$)
Biomasa Deshidratada	228	182
Biomasa Congelada	38	30
Quistes	250	200

En promedio se pretende lanzar un producto directamente al intermediario (tienda acuarista) por un precio que esté a lo menos un 20% del valor de cada producto sustituto o alternativo.

Estos precios deberían mantenerse a menos que se presenten variaciones en el IPC o en algún elemento o condición específica.

Si bien es cierto que la introducción de mayor tecnología en los procesos productivos (principalmente equipos) debiera tener repercusión en el precio, la empresa hará un esfuerzo por mantenerlos, al menos hasta contar con un mercado cautivo, y apuntando más bien a una mayor eficiencia productiva.

Distribución:

Inicialmente se considera abastecer al mercado nacional utilizando como plaza los negocios de acuarista, los que se concentran principalmente en la Región Metropolitana.

La distribución se realizará desde Pichilemu tanto a las tiendas especializadas existentes en el país como a los productores de peces ornamentales. Los costos de envío o despacho quedarán establecidos considerando un mínimo de pedido (cantidad) traspasándoles los costos a los compradores.

No se estima que esta forma operación pueda afectar negativamente las operaciones de venta, puesto que dos de los principales distribuidores como son Provensur Ltda. y Distribuidora Marben operan desde Valparaíso y Villa Alemana (V Región), respectivamente.

En caso que la empresa considera que los volúmenes de compra sean estables en el tiempo, se considera la posibilidad de adquirir un vehículo, tipo camión $\frac{3}{4}$ para realizar una distribución directa en una fecha fija en el mes.

Estrategia de promoción y publicidad

La promoción de los productos se hará por medio de marketing directo en las tiendas distribuidoras de productos para el mercado de acuaristas.

Se pretende producir una partida inicial sin costo para el usuario (muestras), destacando las bondades técnicas del producto, su precio de mercado, como así también sus principales ventajas respecto a los productos existentes en el mercado en cuanto a variables como sobrevivencia, mortalidad y pigmentación.

No se descarta utilizar la línea de Innova Chile: "Apoyo a Negocios Tecnológicos", con el objeto de realizar un lanzamiento de este producto.

Se desarrollará material publicitario (dípticos) y se desarrollará una página Web interactiva que sirva como medio de información para los consumidores del producto como también para compras "on line".

Dentro de este multimedia se dispondrá además de información del tipo artículos científicos que avalen los productos que se están poniendo a disposición al mercado. Con igual fin, se utilizarán los sitios web con la Asociación de Acuarismo de Chile (ACDA), con quienes existe ya firmado un convenio de cooperación, y de la empresa Aquaplant Ltda.

Finalmente, se coordinará una visita del programa Tierra Adentro (que ya nos reportó) para acceder a un medio más masivo de difusión, lo que contribuirá a posicionar la marca ECOARTEMIA (en tramitación).

Tabla 35. Flujo de caja desagregado por ítem

ANÁLISIS ECONÓMICO DEL PROYECTO

I) Ítem recursos humanos					Año 0	Año 1	Año 2	Año 3
Profesional	Unidad	Cantidad	Valor unidad	IVA	Total	Total	Total	Total
Técnico	jornada mensual	12	500000			6.000.000	6.000.000	6.000.000
Obrero especializado(salinerero)	jornada mensual	5	150000			750.000	750.000	750.000
Total recursos humanos						6.750.000	6.750.000	6.750.000

II) Ítem equipamiento

Equipamiento	Unidad	Cantidad	Valor unidad	IVA	Total	Total	Total	Total
Motobomba 3"	Unidad	5	74782	71043	444.953			
Congelador 80l (-25°C)	Unidad	1	163025	30975	194.000			
Selladora al vacío	Unidad	1	648739	123260	771.999			
Balanza (1550 ± 0,05g precisión)	Unidad	1	299600	56924	356.524			
Secador	Unidad	1	1512605	287395	1.800.000			
Estanque circular fondo conico (60l)	Unidad	1	25.000	4750	29.750			
Soplador 1/8 HP	Unidad	1	511.875	97256	609.131			
Centrifuga	Unidad	1	50.420	9580	60.000			
Total equipamiento				681183,06	4.266.367	0	0	0

III) Ítem materiales e insumos

Materiales e Insumos	Unidad	Cantidad	Valor	IVA	Total	Total	Total
Electricidad laboratorio	Mes	12	50.000	114.000	714.000	714.000	714.000
Madera (tabla tapa)	Carga	112	2.353	50.072	313.608		
Poliétileno transparente (E profundizados)	kg	56	1590	16.918	105957,5		
Poliétileno (manga 4m ancho x 0,15mm UV) pretiles	kg	390	1590	117.819	737919		
Quistes inóculo	kg	1	87000	16.530	103530	103530	103530
Urea	saco	4	12605	9.580	59999,8	59999,8	59999,8
Superfosfato	saco	3	12605	7.185	44999,85	44999,85	44999,85
Aerómetro	Unidad	4	10.700	8.132	50.932		
Probeta 1000ml	Unidad	2	4.200	1.596	9.996		
Probeta 250ml	Unidad	2	2.250	855	5.355		
Termómetro	Unidad	2	4.250	1.615	10.115		
Manguera alta presión 3"	Metro	50	5.920	56.240	352.240		
Botas de goma	Par	2	6.259	2.378	14.899		
Balde 55l	Unidad	4	8.340	6.336	39.699		
Total materiales e insumos					2.663.247	922.530	922.530

Tabla 36. Continuación flujo de caja desgregado por ítem

iv) Ram servicios de terceros

	Unidad	Cantidad			Total	Total	Total	Total	Total	Total
Servicios de terceros										
Levantamiento perapeos	Estanques	9	39556	67640.8	356.004					
Profundización	Estanques	4	45000		180.000					
Desbarrido salina	Callea	10	30000		300.000	300.000	300.000	300.000	300.000	300.000
Mantencción bombas	unidad	5	33613	31932	168.065	199.997	199.997	199.997	199.997	199.997
Movimiento de tierra	horas	125	12000	285000	1.500.000					
Total servicios a terceros					2.804.069	499.997	499.997	499.997	499.997	499.997

TOTAL					6.776.426	9.813.244	8.172.827	8.172.827	8.486.138	8.723.436	8.172.527
--------------	--	--	--	--	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------

v) Ram gastos generales

		Cantidad	Costo Unitario	IVA	Total	Total	Total	Total	Total	Total
Gastos generales										
Comercialización					100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
Etiquetas	unidad	10000	84	159600	999.600	999.600	999.600	999.600	999.600	999.600
Envases 50 gramos biomasa congelada (bolsa estise)	unidad	2500	107	50825	318.325	318.325	318.325	318.325	318.325	318.325
Envases Quistes (10 g)	unidad	300	27	1539	9.639	9.639	9.639	9.639	9.639	9.639
Correspondencia					50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000
Total gastos generales					0	1.477.864	1.477.864	1,477.864	1,477.864	1,477.864

Cuadro resumen ingresos

Producto	Unidad	Cantidad	Valor unidad	IVA	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6
					Total	Total	Total	Total	Total	Total	
Quistes	Envases 10g	959	2100	381045	2.386.545	2.386.545	2.386.545	2.386.545	2.386.545	2.386.545	2.386.545
Biomasa congelada	Envases 50g	4893	1800	1673406	10.480.806	10.480.806	10.480.806	10.480.806	10.480.806	10.480.806	10.480.806
Sal	Secos	600	2500		1.500.000	1.500.000	1.500.000	1.500.000	1.500.000	1.500.000	1.500.000
Total					14.367.351						

	Rendimiento (cm3 año)	m3	Producción anual (t)
Quistes	13.15	726.00	9.547
Biomasa	337	726.00	244.862

Tabla 37. Flujo de caja que incluye T.I.R. y V.A.N.

Flujo de Caja, TIR y VAN

	0	1	2	3	4	5	6
INGRESOS							
Quistes		2.386.545	2.386.545	2.386.545	2.386.545	2.386.545	2.386.545
Biomasa Congelada		10.480.806	10.480.806	10.480.806	10.480.806	10.480.806	10.480.806
Sal		1.500.000	1.500.000	1.500.000	1.500.000	1.500.000	1.500.000
Total de Ingresos		14.367.351	14.367.351	14.367.351	14.367.351	14.367.351	14.367.351
EGRESOS							
Costos Variables							
Quistes inóculo		87.000	87.000	87.000	87.000	87.000	87.000
Urea		50.420	50.420	50.420	50.420	50.420	50.420
Superfosfato		37.815	37.815	37.815	37.815	37.815	37.815
Envasado quistes		106.005	106.005	106.005	106.005	106.005	106.005
Envasado Biomasa Congelada		934.563	934.563	934.563	934.563	934.563	934.563
Costos Fijos							
Remuneraciones		6.750.000	6.750.000	6.750.000	6.750.000	6.750.000	6.750.000
Electricidad laboratorio		600.000	600.000	600.000	600.000	600.000	600.000
Madera (tabla tapa)		263.536			263.536		
Poliétileno transparente (E profundizados)		89.040				89.040	
UV) parapetos		620.100					
Desbarrado salina		300.000	300.000	300.000	300.000	300.000	300.000
Mantenimiento motobomba		168.065	168.065	168.065	168.065	168.065	168.065
Gastos de Adm. Y Venta							
Comercialización		100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
Correspondencia		50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000
Total Egresos		10.156.544	9.183.868	9.183.868	9.447.404	9.272.908	9.183.868
Amortizaciones		107.201	107.201	107.201	107.201	107.201	
Depreciaciones		1.193.153	925.848	925.848	382.303	382.303	
Utilidad antes de impuestos		2.910.453	4.150.434	4.150.434	4.430.443	4.604.939	5.183.483
Impuesto		494.777	705.574	705.574	753.175	782.840	881.192
Utilidad después de impuesto		2.415.676	3.444.861	3.444.861	3.677.268	3.822.100	4.302.291
Amortizaciones		107.201	107.201	107.201	107.201	107.201	
Depreciaciones		1.193.153	925.848	925.848	382.303	382.303	
Inversión Activo Fijo		-3.510.326					
Inversión Activo Intangible		-2.504.069					
Inversión Capital de Trabajo		-3.309.565					3.309.565
IVA Inversión		-698.051	898.051				
Reinversiones						-444.953	-15.127
Flujo Caja Neto		-10.022.011	4.414.081	4.477.909	4.477.909	4.166.772	7.596.729
VAN (12%)		\$ 8.363.411					
TIR		39%					

La evaluación económica mostrada más arriba se ha realizado teniendo como supuesto que el modelo planteado con antelación opera. Es decir, que el flujo de caja no considera inversiones para la implementación de instalaciones que permitan desarrollar las faenas de post cosecha como deshidratado, secado y empaçado de quistes y biomasa. Ello debido a la existencia de un poder comprador que cuenta con las instalaciones para desarrollar estas tareas.

6. Impactos y Logros del Proyecto:

Impactos Productivos, Económicos y Comerciales

6.1 Impactos científico- tecnológicos

El proyecto es uno de los pocos ejemplos, sino el único, de acuicultura extractiva desarrollados en el país, en donde a partir de un organismo como el microcrustáceo *Artemia* se obtienen- con una alta tasa de conversión- proteínas y otros productos de interés comercial (quistes y biomasa) a partir de microalgas y detritus. Los aspectos científicos que es necesario destacar del proyecto son, en primer lugar, la utilización de diferentes herramientas bio-ecológicas para lograr una sincronización eficiente del ciclo reproductivo de *Artemia* a las condiciones ambientales locales de las salinas. Ello requirió la identificación y monitoreo de los nutrientes disponibles (microalgas principalmente) y de la temperatura y salinidad a lo largo del ciclo de producción. Igualmente, la identificación de la cepa de *Artemia* disponible en el lugar por métodos morfológicos y genéticos para utilizar una equivalente en términos de adaptación a las condiciones locales (tolerancia a los ciclos diarios y estacional de temperatura y salinidad, alta tasa reproductiva), pero que a la vez sea atractiva para el mercado, considerando la calidad de los productos producidos. Por una parte, quistes de diámetro pequeño, viabilidad y tasa de eclosión adecuada, y por otra parte la cantidad y la calidad (contenido proteico y de ácidos grasos) de la biomasa producida. Muy importante fue el esfuerzo desarrollado durante todo el ciclo productivo por monitorear la composición de la población en términos de cantidad de juveniles, hembras ovígeras y composición de sexos. Igualmente, la evolución del pool genético, un objetivo no considerado, que será importante en el futuro para eventualmente asociar la presencia de un marcador específico con la evolución de los productos deseados

6.2 Impactos Tecnológicos

La traducción de la ciencia descrita anteriormente a la producción de 3.084 gramos de quistes y 23.800 g de biomasa de *Artemia* (14,2 y 109 g/m³ de quistes y biomasa respectivamente) de calidad aceptable, es decir atractiva de acuerdo a los requerimientos del mercado, es el aspecto más destacable del proyecto y que en definitiva significó

cumplir parcialmente con los objetivos productivos propuestos. Todo lo anterior requirió un esfuerzo muy grande en diferentes aspectos tecnológicos y que se manifiesta en valioso *know how* que es patrimonio del proyecto, desde la ingeniería requerida para optimizar los accesos de agua, proteger a las piletas de inundaciones en ciertos periodos del año hasta aquella necesaria para el diseño de las piletas para mantener una gradiente de salinidad y una oferta alimentaria sincronizada para el normal desarrollo de los diferentes estadios del ciclo vital de *Artemia*. Además, de haber logrado los diseños de una máquina móvil de cosecha, pre-lavado y oxigenación; y de un secador de quistes de lecho fluidizado con telemetría y control automático de flujo y temperatura de aire, cuyos prototipos serán probados durante la temporada 2007. Finalmente, todo lo relacionado con la cosecha, almacenamiento y empaque de los productos (quistes y biomasa), aspecto que determina de manera significativa su valor comercial. Uno de los aspectos innovadores del proyecto en este sentido es el diseño y funcionamiento de un secador de quistes y el diseño de envoltorios de aluminio para el embalaje en condiciones de vacío de los mismos. Igualmente, la oferta de biomasa en diferentes modalidades y con adecuada calidad: viva y congelada, que de lograr superar exitosamente los ensayos que se desarrollarán durante 2007 permitirán no sólo abastecer a la industria salmonera sino que también contribuir a dar un salto significativo en el cultivo de otros recursos hidrobiológicos.

6.3 Impactos sociales y otros

Desde una consultoría inicial realizada para el FIA (programa de consultores calificados) y una gira tecnológica, los participantes en el proyecto cumplieron diferentes etapas de convencimiento a los *stakeholders* (microempresarios, autoridades locales y salineros) para demostrar la viabilidad de una actividad inédita en el país y que era difícil de aceptar, especialmente por los salineros que han producido sal sin mayores variaciones desde épocas pre-hispánicas. Luego del proyecto, no sólo ciertos salineros se han convencido del potencial de realizar una nueva actividad para el deprimido "secano costero" de la VI región (acuicultura extractiva con *Artemia*) en paralelo a la tradicional producción de sal, sino que las autoridades y también otros organismos de financiamiento han visto en este proyecto un modelo que es necesario promover. Por ejemplo, la aprobación de una solicitud para incorporación de tecnólogos a la industria, en el marco del Programa Bicentenario de Ciencia y Tecnología es un avance y reconocimiento en este sentido. Asimismo, la reciente aprobación de un proyecto CORFO para escalar productivamente el proyecto es una demostración más en la confianza por lo realizado y un apoyo al modelo de interacción científico-tecnológico y empresarial desarrollado para una actividad inédita en el país. Esencialmente, el proyecto no hubiera sido posible sin la adopción de criterios económicos sustentados por la adecuada información biológica aportada por el laboratorio de Genética & Acuicultura, que es pionero en los estudios de *Artemia* en el país. La interacción con laboratorios extranjeros (U de Gante) y otras entidades nacionales, como el CECTA (Centro de Ciencia y Tecnología de los Alimentos), UACH, que apoyaron la realización de análisis, son ejemplos de convergencia internacional y nacional con los objetivos del proyecto.

7. Problemas Enfrentados Durante el Proyecto:

7.1 Problemas Técnicos

- 7.1.1 Producción de microalgas. La propuesta del proyecto señalaba la limpieza, preparación y posterior fertilización del corralón (estanque acumulador de agua salobre). Sin embargo, ello no pudo realizarse debido a que el terreno en que éste se sitúa se encontraba demasiado blando a causa de la inundación invernal, impidiendo el acceso de la máquina que realizaría dicho trabajo. Puesto que las microalgas constituyen parte vital del cultivo, como medida de contingencia se fertilizaron tres estanques de la salina 1 (El Pilón) con el producto enhance algae y otros dos con fertilizantes agrícolas (superfosfato triple y urea), luego de lo cual fueron inoculados con el alga *Dunaliella sp.* Con este procedimiento no fue posible obtener florecimiento de algas en ninguno de los estanques fertilizados, independiente del fertilizante utilizado. Puesto que se estimó como causa más probable la fotoinhibición se programó la profundización de estanques para la temporada 2004-2005, de manera que se pudiera contar con estanques cuya profundidad útil fuera de al menos 0,5 m (0,6 a 0,7 m de profundidad total).
- 7.1.2 Control de la salinidad. Se vio dificultado, debido a que el agua de mayor salinidad (más densa) se mantuvo en las zonas más profundas del estanque impidiendo su salida por gravedad. Como medida de emergencia se intentó el trasvase por medio de baldeo manual, labor que no dio los resultados esperados debido a su lentitud. El escaso volumen retirado por esta vía, al ser suplementado por agua de menor salinidad no presentó efectos relevantes sobre la salinidad total del estanque (alrededor de 0,1 ‰). Este problema se solucionó a partir del uso de una motobomba.
- 7.1.3 Baja eficiencia de eclosión de los quistes a inocular. Se atribuyó a la baja temperatura del agua, y debido al apremio de tiempo no hubo manera de aplicar medidas correctivas. Para la temporada siguiente no debiera existir este problema puesto que se contará con los estanques acumuladores, los que al estar expuestos al sol permitirán contar con agua a temperaturas iguales o superiores a los 18° C.
- 7.1.4 Mortalidad. Se observaron mortalidades significativas en aquellos estanques en que *Artemia* pudo colonizar exitosamente. Si bien, inicialmente se pensó que la causa podría estar en el aumento de la salinidad o temperatura, luego se pudo constatar que ésta era coincidente con los incrementos en la densidad poblacional. Este hecho podría ser atribuible a que el alimento disponible en el estanque no era suficiente para sustentar el incremento de la demanda.
- 7.1.5 Recolección de quistes. La principal dificultad enfrentada se relaciona con el viento, puesto que durante el periodo productivo se observaron hasta tres cambios de dirección dentro del día. La consecuencia directa es que los quistes se mantienen dispersos en el estanque, haciendo casi imposible su recolección. Esto se hizo especialmente evidente en los estanques modificados perimetralmente, donde el

viento, independiente de la dirección en que soplara mantenía el agua en circulación constante. Otras dificultades enfrentadas, se relacionan con la escasa profundidad en las esquinas hacia donde los quistes son arrastrados por el viento, así como también la escasa altura de los parapetos y la irregularidad de la cara interna de éstos, producto del constante socavamiento producido por la acción de las ondas de agua. No obstante, en la salina 1 se facilitó la labor debido a que el eje longitudinal se encuentra en dirección N – S, de manera que los vientos predominantes SW y NE reunían los quistes en las esquinas del estanque. Una situación distinta se dio en la salina 2, en donde los vientos predominantes actuaban sobre la totalidad de la cara longitudinal de los estanques, impidiendo su recolección.

Para corregir el problema de circulación de agua en los estanques perimetrales, se optó por derribar el parapeto interior en los estanques modificados perimetralmente, obteniendo con ello los resultados deseados (agrupamiento de los quistes en las esquinas).

- 7.1.6 Desbarre y preparación de las salinas. El constante cierre de la barra del estero Nilahue obligó a realizar trabajos de despeje durante los meses de julio y agosto de 2004. Sin embargo, lluvias posteriores provocaron el anegamiento de las salinas en una época y con una magnitud inusual, lo que inevitablemente generó un retraso en las actividades de limpieza y preparación de las instalaciones programada. Nuevas labores de despeje de la barra se iniciaron sólo hacia fines del mes de octubre y comienzos de noviembre.

El primer problema enfrentado durante esta temporada fue la tardía apertura de la barra del Estero Nilahue, lo que conllevó al retraso en el inicio de las tareas de desbarre, preparación y profundización programadas.

- 7.1.7 Pérdida de agua en estanques. No obstante el retraso, en la salina 2 (El Pilón) pudieron realizarse las tareas previstas de profundización de estanques tanto por medio de excavación como por levantamiento de los pretiles. Estos últimos, situados en las cabeceras de la salina 2 no pudieron utilizarse para los fines previstos (cultivo de microalgas y Artemia) dada su alta tasa de infiltración. Como medida correctiva, el fondo de dichos estanques fue compactado utilizando una placa compactadora, puesto que esta medida tampoco permitió solucionar el problema se recubrió un estanque utilizando mangas de polietileno (abiertas) de 2 m de ancho traslapadas, que tampoco fue capaz de disminuir la pérdida de agua. Sólo durante la temporada 2005-2006 correspondiente al período de extensión fue posible obtener los resultados esperados recubriendo el estanque de prueba con manga de polietileno de 3 m de ancho traslapadas y selladas en la unión con cinta para tuberías 3M.

- 7.1.8 Condición reproductiva de las hembras. Sobre la base de antecedentes bibliográficos, se esperaba que aproximadamente un 30% de las hembras adultas del stock de Artemia se reprodujera por medio de viviparías. Sin embargo, muestreos realizados durante la temporada productiva señalaron que el promedio fluctuó sólo alrededor del 7% traduciéndose en una merma importante sobre la

producción de quistes proyectada. Frente a este problema no hay muchas medidas correctivas que adoptar, puesto que más allá del estrés ambiental para inducir el modo reproductivo por viviparí, se encuentran factores genéticos asociados a cada variedad de *Artemia*.

- 7.1.9 Depredación. Se verificó la depredación de larvas de *Artemia* por parte de un insecto conocido como "mosca de la sal", la que se transformó en un serio problema en algunos de los estanques donde formó grandes colonias. Otros organismos que ejercieron presión depredadora sobre *Artemia* fueron dos especies de aves comunes en las salinas; el perrito (*Himantopus melanurus*) y el pititoy (*Tringa melanoneuca*).
- 7.1.10 Densidad de cultivo. La alta densidad de inoculación contemplada inicialmente no se tradujo necesariamente en una producción más alta, sino que por el contrario produjo altas mortalidades y una conspicua reducción en el tamaño de los individuos cultivados. Como medida correctiva se redujo la densidad de inoculación de 200 a 60 nauplios/litro.
- 7.1.11 Porcentaje de eclosión de quistes recolectados. Los resultados del análisis de calidad de los quistes realizado por el Artemia Referente Center dan cuenta de la existencia de problemas en alguno de los pasos del procesamiento post cosecha, es decir, en el deshidratado y/o secado. La superación del límite de humedad en los quistes (10%) tiene como consecuencia niveles muy pobres de eclosión y por ende sobre la calidad de los quistes. Para corregir el problema se construyó un deshidratador solar para obtener un proceso más rápido y homogéneo.
- 7.1.12 Impurezas en la biomasa. Al momento de cosechar un estanque, la última porción de agua arrastra material (trozos de barro y pequeños palos) hasta la sentina en donde se encuentra la manguera de succión. Ya que tales impurezas alteran la calidad final de la biomasa estas deben ser retenidas antes de juntarse con la biomasa cosechada. Para ello, se implementaron barreras alrededor de la sentina, de manera que las grandes impurezas queden retenidas en el estanque.
- 7.1.13 Esta temporada corresponde al periodo de extensión del proyecto y el principal problema enfrentado fue la destrucción de un tramo del pretil levantado para proteger las salinas de la inundación. En consecuencia, no se lograron las metas productivas planteadas para esta temporada.

7.2 Problemas Administrativos

- 7.2.1 Flujo de caja. Durante todo el periodo de ejecución del proyecto sólo se presentaron problemas; al comienzo de éste y al inicio del periodo de extensión, y si bien son sólo dos eventos, éstos afectaron negativamente el desarrollo normal del proyecto, toda vez que retardaron actividades que se daban en el marco de una actividad de carácter estacional. Estos problemas tienen que ver con la

demora en el depósito de las remesas de dinero, que posterior a la entrega del informe N° 1 fueron recibidas con un desfase de 5 meses. Situación similar se dio con la extensión del proyecto donde dineros dispuestos para el mes de diciembre no fueron recibidos sino hasta el mes de febrero.

7.3 *Problemas de Gestión*

- 7.3.1 Falta de personal. Hacia inicios de la temporada productiva de la sal el proyecto se vio enfrentado a dificultades para encontrar salineros interesados en trabajar, ello debido principalmente a la creencia por parte de éstos era que las modificaciones de los estanques de las salinas redundaría sino en la nula producción de sal en una merma significativa de ella. Finalmente el problema se resolvió entregando el 100% de la producción de sal más un incentivo pecuniario al trabajador salinero. Aún así, durante todo el desarrollo del proyecto la dificultad por encontrar salineros persistió.
- 7.3.2 Contacto con usuarios reales y potenciales. Debido a la falta de medios de comunicación en el sector rural donde se realizaron las actividades, hubo ciertas dificultades para realizar todos los contactos que se habían contemplado inicialmente. Además, el relativo aislamiento en que se encuentra Pichilemu dificultó en algún grado el envío de muestras vivas y congeladas a algunas de las personas e instituciones con que se había tomado contacto.

8. Conclusiones y Recomendaciones:

1. *Aspectos Técnicos.*

Desde una perspectiva técnica el proyecto puede considerarse exitoso, toda vez que éste hizo posible desarrollar el cultivo de *Artemia* para la producción de quistes y biomasa en salinas artesanales de la localidad de La Villa, como una actividad complementaria a la producción de sal, es decir, logrando mantener la misma productividad obtenida previa ejecución del proyecto.

Si bien la meta de productividad de quistes planteada en los objetivos de la propuesta no pudo lograrse, al compararla con aquella lograda en países como Brasil o Vietnam, ésta fue superior en un 34% y 17% respectivamente.

Desde el punto de vista nutricional la biomasa producida posee características que la hacen apropiada para ser usada tanto en acuicultura como en acuarofilia. Sin embargo, a fin de mejorar aspectos relacionados con la limpieza y el olor, se requiere mejorar los procedimientos de cosecha y secado. Para ello sería necesario contar con un equipo que al momento de cosechar permita además realizar un pre-lavado de la biomasa antes de que esta sea llevada al laboratorio, agilizando los procesos posteriores y disminuyendo los costos por concepto de bombeo de agua para el lavado. En cuanto al secado, lo ideal sería hacerlo por frío (liofilizado) lo que además de no alterar las características organolépticas

permite eliminar los riesgos sanitarios, que son relevantes en actividades de acuicultura comercial. Mientras que en términos cuantitativos, la producción de biomasa se incrementó tras cada temporada productiva. Así, la producción de 6.000 g durante la primera temporada se elevó a 15.000 y 23.800 durante la segunda y tercera temporada, respectivamente. Lo que en términos porcentuales representa incrementos de 230,7 y 366,2% con respecto a la primera. El incremento entre la primera y segunda temporada puede ser atribuido tanto al incremento del volumen de agua disponible para el cultivo de 39,79 a 217,8 m³ como al aumento del alimento disponible al haber logrado generar el bloom de microalgas. Mientras que entre la segunda y tercera temporada, puesto que se mantuvo el volumen de cultivo y la disponibilidad de alimento, el incremento de la producción podría ser explicado sólo por una pequeña modificación realizada en el fondo de los estanques de cultivo y que mejoró el drenaje del estanque minimizando con ello la cantidad de artemias remanentes luego de la cosecha.

No obstante el mejoramiento en la producción de biomasa entre la segunda y tercera temporada, el objetivo planteado para esta última de 165 g de peso húmedo/m³/temporada no fue logrado totalmente, alcanzando un 81,6% de eficacia, lo que podría tener su origen en que de los 10 estanques que debieran haberse ocupado durante la temporada sólo se contó con 4 ya que en los 6 restantes no se logró solucionar los problemas de infiltración de agua, esto sumado a que sólo en el estanque CT3 se realizaron los 3 ciclos productivos, mientras que en los restantes (CT1, CT2 y PT1) se lograron efectuar sólo 2.

Por otra parte, la producción de quistes fue mucho menor que aquella planteada en los objetivos tanto del proyecto original como de la extensión, lográndose eficiencias de 0,15, 7,89 y 18,2 % para las temporadas 1, 2 y 3, respectivamente. Lo que podría explicar los resultados obtenidos para las dos primeras temporadas tiene relación con que las estimaciones de producción se hicieron sobre una presencia de hembras ovíparas de 70% en una población de laboratorio, situación que distó mucho de los valores encontrados en terreno y que fluctuaron alrededor del 6%. A ello se suma el que durante la tercera temporada no fue posible contar con la totalidad de estanques proyectados (4 de 10) pudieron realizarse los tres ciclos sólo en el estanque CT3. Finalmente, otro factor que pudo haber contribuido es la baja salinidad en los estanques CT1, CT2 y PT1, donde se alcanzó la salinidad de 100 ppt a comienzos de febrero. El dato que tiende a refrendar esta hipótesis es que a diferencia de las temporadas precedentes, durante la última se registró un 33,9% de quistes inviábiles a causa de que habían eclosionado en los estanques de las salinas a pesar de que la recolección se efectuó a diario.

En términos cualitativos, de acuerdo al Artemia Reference Center y el laboratorio de genética & Acuicultura, los quistes recolectados durante la ejecución de esta iniciativa poseen características apropiadas para ser usados en acuicultura. Si bien, aspectos tales como su pequeño tamaño (dentro del rango super small) y contenido de ácidos grasos polinsaturados (PUFA's) podrían situarlos dentro de la banda de precios más alta para los quistes, su bajo porcentaje de eclosión le restan valor. En opinión del ARC este problema estaría asociado a problemas de procesamiento, lo que implica la realización de ensayos de deshidratado, rompimiento de diapausa, secado y almacenamiento. Si bien en este aspecto se ha avanzado, resolviéndose aquellos temas relacionados con la limpieza, separación de quistes buenos de malos, deshidratado y almacenamiento, resta por

mejorar la tasa de secado y la desactivación de la diapausa. Según Lavens and Sorgeloos (1995) los aspectos críticos del procesamiento de quistes son el porcentaje de humedad que debe ser menor a 10% (con un óptimo de 2 a 5%), la tasa de secado y la desactivación de la diapausa. De acuerdo a estos mismos autores el contenido de humedad se puede disminuir con almacenamiento en salmuera, lo que fue validado durante la tercera temporada logrando reducir desde 13 a 4,34% el contenido de humedad de los quistes y una reducción en la tasa de secado de 12 a 8 horas. Esto último gracias a la introducción de aire caliente con un termoventilador, mientras que la mantención de los quistes durante un periodo de tiempo a bajas temperaturas ha demostrado ser una herramienta efectiva para romper la diapausa, restando sólo afinar detalles en cuanto al tiempo de permanencia en frío.

2. Aspectos Económicos

Como se ha mencionado anteriormente existen en Chile dos posibilidades de comercialización para *Artemia*. El primero de ellos corresponde al de la acuicultura, que de acuerdo a estadísticas de ASEXMA y el Banco Central para los 10 primeros meses de 2006 importó alrededor de 19 toneladas de alimentos para acuarios, equivalentes a US\$ 207.000. El segundo mercado corresponde a la industria salmonera, que si bien hasta ahora no ha utilizado *Artemia* existen acuerdos con importantes empresas del sector para realizar ensayos de alimentación con distintos productos derivados de *Artemia*. El éxito de esta iniciativa podría redundar en una demanda inicial objetiva de al menos 930 Kg de biomasa húmeda/mes, para satisfacer los requerimientos de 1 millón de smolt durante 1 semana.

Sobre la base de los antecedentes expuestos, resulta claro que la transformación de esta iniciativa en una actividad comercial y por ende económicamente rentable, requiere del incremento en los niveles de producción. Sin embargo esto plantea algunos inconvenientes debido a la temporalidad de la producción de sal, que a su vez está condicionada por la magnitud del retraso en el inicio de las actividades debido a la inundación invernal. No obstante, este problema puede enfrentarse por medio de la producción asociativa. En este esquema, pequeños productores de sal obtendrían asistencia técnica para la producción de *Artemia* y el procesamiento de su materia prima (quistes y biomasa) por parte de la empresa ECOARTEMIA, a quien pagarían con un porcentaje de producto o su equivalente en dinero (maquila). Este sistema tiene varias ventajas, entre ellas se destacan: i) los pequeños productores no requieren hacer más inversiones que las requeridas para modificar la salinas y la compra de fertilizantes agrícolas, ya que el grueso de la infraestructura necesaria para el procesamiento de la materia prima y venta del producto final es realizado por la empresa compradora ECOARTEMIA; ii) se establece un poder comprador que asegura ingresos a todos los pequeños productores y por otra permitirá a la empresa contar con producto suficiente para mantener una distribución constante.

Cabe señalar que dentro del territorio correspondiente a las comunas de Pichilemu, Paredones y Vichuquén, existen al menos 400 hectáreas de salinas que eventualmente

podrían utilizarse para la producción de Artemia. Si consideráramos que sólo un 10% de esta superficie pudiera ser útil para su cultivo, se podrían proyectar producciones de alrededor de 300 kg de quistes y 45.000 kg de biomasa por temporada (ambos en peso húmedo), de acuerdo a los resultados obtenidos.

De acuerdo a una evaluación preliminar se estima que cualquier productor en condiciones de disponer de un volumen de 796 m³ en sus salinas podría desarrollar esta actividad de una manera rentable, vale decir con una T.I.R. de 39% y un V.A.N. (12%) de 8.363.411 en un horizonte de 5 años.

3. Gestión.

Esta iniciativa ha desarrollado una gestión exitosa, toda vez que sobre la base de los resultados obtenidos ha podido proyectar los resultados obtenidos para el desarrollo de nuevos emprendimientos que le permitan consolidar una actividad que aún está en ciernes. Así, logró la aprobación de un proyecto a través del Programa de Inserción de Personal Altamente Calificado en Empresas Chilenas (Programa Bicentenario de Ciencia y Tecnología – CONICYT) se encuentra en evaluación por Innova Chile otra propuesta para el cultivo intensivo de Artemia bajo techo. Iniciativa que además de permitir prospectar la generación de nuevos productos y presentaciones de éstos, hará posible escalar en términos productivos mientras se habilita la fórmula de producción asociativa. Respecto de esto último cabe señalar que la I. municipalidad de Vichuquén ha expresado su interés porque se logren los acuerdos necesarios para involucrar a los salineros de su comuna en la producción de Artemia bajo el esquema anteriormente señalado.

Además, se ha logrado registrar la marca "ECOARTEMIA", y se encuentra en fase de tramitación una personalidad jurídica asociada a ella. Todo esto con miras a facilitar el establecimiento de acuerdos comerciales con los mercados demandantes de Artemia, en particular con la industria salmonera, que por su tamaño y dinamismo podría contribuir a la rápida consolidación de este novel cultivo.

III. INFORME DE DIFUSIÓN

1. Organización de Seminarios y Talleres.

De acuerdo a lo propuesto, durante la primera temporada se desarrollaron tres seminarios en las localidades de Barrancas, Lo Valdivia (comuna de Paredones) y Pichilemu, los días 26 de junio, 3 y 9 de julio de 2004, respectivamente. Las dos primeras charlas se dictaron para los salineros quienes fueron convocados por medio de avisos radiales e invitaciones personales. La charla realizada en Pichilemu se pensó como una actividad de carácter institucional, razón por la cual se cursaron invitaciones a las autoridades locales así como también a los representantes de organismos públicos y privados vinculados a la producción y educación.

Para el primer seminario se cursaron 70 invitaciones y la asistencia fue de 38 personas, lo que implica una convocatoria equivalente al 54,3%. El segundo seminario, realizado en la localidad de Lo Valdivia concitó la asistencia de 44 personas, equivalente al 73,3% de las invitaciones cursadas. Finalmente, el tercer seminario, realizado en Pichilemu tuvo la más baja convocatoria, asistiendo sólo el 20,3% de los invitados.

Mientras que para la segunda temporada productiva se realizó un seminario de carácter institucional el día 30 de septiembre de 2005, en la pista municipal de Pichilemu. Cabe señalar que esta actividad originalmente fue pensada para dar el cierre al proyecto. A este evento de difusión asistieron 17 de los 48 invitados, lo que implica una efectividad de 35,4%.

Por último, se efectuó un seminario para profesores y alumnos del taller de ciencias del Liceo Agustín Ross de Pichilemu. Junto con ello se les proporcionó el material biológico necesario para la implementación de un experimento que participaría en la feria estudiantil de ciencias de la VI Región.

2. Reuniones Técnicas o Días de Campo

En el periodo correspondiente a la extensión del proyecto se llevó a cabo una reunión técnica con la Asociación Chilena de Acuaristas (ACDA) el día 3 septiembre de 2005 en la Corporación Cultural de Ñuñoa. El tema de dicha reunión fue "Las Características Nutricionales de *Artemia* y su Uso en Acuarofilia". Esta reunión dio lugar para la realización de un día de campo el 7 de enero de 2006. Sobre la base de la información intercambiada durante la realización de los eventos señalados, el día 3 de abril de 2006 se suscribe un acuerdo de cooperación entre la ACDA y el proponente del proyecto.

3. Publicaciones divulgativas

En el marco del acuerdo de cooperación suscrito con la Asociación Chilena de Acuaristas, se publicó un artículo de divulgación "Cultivo semi intensivo de crustáceo

Artemia para la producción de quistes y biomasa en las salinas de la localidad de La Villa, Pichilemu, VI Región”, en el sitio web de esta institución (www.acda.cl).

Además se divulgó el proyecto y sus alcances a través de dos reportajes realizados el 18 de febrero de 2005 y 9 de febrero de 2006, por los programas Frutos del País y Tierra Adentro respectivamente. Al respecto, resulta pertinente señalar que estos reportajes tuvieron gran impacto y han permitido realizar importantes contactos no sólo para la realización de futuros negocios sino que además para desarrollar actividades de formación e investigación.

ANEXO I

Informe visita a terreno Enero 2004

Proyecto FIA: Diversificación de la actividad salinera mediante el cultivo semi-intensivo del crustáceo Artemia para la producción de quistes en la localidad de La Villa, Pichilemu, VI Región.

**PATRICIA BERISTAIN RUIZ
MASTER EN ACUICULTURA**

Introducción

En la propiedad del Sr. Marco Antonio Labarca Parraguez ubicada en la rivera sur del estero Nilahue se esta ejecutando el proyecto financiado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) titulado "Diversificación de la actividad salinera mediante el cultivo semi-intensivo del crustáceo *Artemia* para la producción de quistes en la localidad de La Villa, Pichilemu, VI Región".

El crustáceo anostraco *Artemia* está adaptado a diferentes hábitats, en distintas partes del mundo y se encuentran restringidos a lagos hipersalinos o estanques hechos para la producción de sal, como en el caso de los alrededores de Cahuil, localizados en la costa ó en aguas epicontinentales. Estos hábitats están caracterizados por poseer una baja diversidad de especies y tienen condiciones físicas y químicas muy variables y extremas en las que *Artemia*, debido a su especial capacidad osmoregulatoria puede tolerar, algo que no pueden hacer otros organismos acuáticos que pudieran depredarlo. La distribución geográfica de este crustáceo se encuentra correlacionada con el tipo de clima, el 97% de los sitios en donde se localiza, han sido catalogados como áreas de extrema aridez. En Chile, *Artemia franciscana*

se distribuye en el norte mientras que *A. persimilis* habita el extremo sur austral, incluyendo biotopos tan variados como el Desierto de Atacama o la Laguna de Los Cisnes en Porvenir.

Este informe es el reporte de las actividades ejecutadas durante la segunda quincena del mes de enero del año en curso. Durante dicho periodo los profesionales a cargo de la ejecución del proyecto en terreno, Sr. Mauricio Martínez (Master Producción, Manejo y Conservación de RR.NN. candidato) y Srta. Mayda Hauva (Master en Acuicultura), así como el proponente, Sr. Marco Labarca, y el coordinador alterno del proyecto, Sr. Dante Comejo, realizaron una visita de carácter técnico a las salinas de la localidad de Grossos, Brasil por lo que la que informa participó parcialmente en la ejecución y puesta en marcha de las actividades detalladas a continuación.

Limpieza y encalado de estanques

Los estanques para producción de sal se inundan durante los meses de invierno debido al incremento del caudal del Estero Nilahue. Por ello, sólo una vez que el flujo del estero se reduce se inicia la actividad salinera con el desbarrado de los estanques. En un año con

precipitaciones normales el flujo del estero se reduce sustancialmente al comenzar la temporada de primavera (Septiembre-Octubre). Sin embargo, el año 2003 fue, de acuerdo a comunicaciones informales con personas que habitan la zona, excepcionalmente lluvioso en la VI Región. Dichas precipitaciones incrementaron el caudal del estero y por ende la superficie anegada por un periodo mayor al normal, por lo que el desbarrado de los estanques sólo se inició al comienzo de la época estival lo que conllevó a un atraso en las actividades productivas de sal y por ende de la ejecución de este proyecto. No obstante el retraso, el desbarrado fue realizado con normalidad, es decir, manualmente por una cuadrilla contratada por el proponente y supervisada por los profesionales en terreno. Debido al largo tiempo en que estas salinas no fueron trabajadas el desbarrado resulto un tanto mas engorroso ya que varias de las calles se encontraban "quemadas" por lo que fue necesario remover parte del fondo de los estanques. Normalmente de las calles "quemadas" se obtiene sal de menor calidad y precio, debido a que el "cuajado" de se hace mas difícil, asi como también la sal cosechada no alcanza el tamaño ni el color deseado.

Parte de los estanques fueron encalados a fin de evitar la proliferación de "lama". Esta alga crece en el fondo del estanque y posteriormente sube a la superficie formando floculos que impiden la adecuada penetración de los rayos del sol. Esta alga no deseada disminuye la tasa de evaporación y hace mas lento el incremento de la salinidad en los estanques "sancochadores". Sin duda el encalado de los estanques disminuyó notoriamente la cantidad de "lama" en ellos, aunque no impidió su crecimiento.

Abastecimiento y distribución de agua en las unidades productivas

El agua del estero Nilahue es conducida regularmente mediante gravedad hacia el estanque acumulador o corralón. El corralón, cuya construcción data de varios años, se encuentra poblado de algas y vegetación. Su superficie y profundidad son de difícil cuantificación aunque se estima que la profundidad promedio es aproximadamente 50cm. Debido a la topografía del terreno, existe una escasa diferencia de cotas entre el corralón y las unidades productivas. Esto implica que el volumen de agua acopiada en el corralón esta siendo subutilizada. Sólo parte del volumen total del corralón es transferido a las unidades productivas y el remanente no puede ser distribuido debido a la diferencia de altura. Desde el corralón el agua es conducida a través de canales hacia las unidades productivas las que cuentan con filtros de entrada para evitar predadores y materia no deseada. La

red de agua desde y hacia las unidades productivas presenta también diferencia de pendiente la que no necesariamente siguen un orden práctico en términos de manejo y distribución del agua.

Modificación de los estanques

De acuerdo a lo propuesto en la metodología del proyecto se utilizarían tres tipos de estanques (3 replicas) para el cultivo de Artemia. Estos sistemas productivos serán evaluados durante la primera temporada y a partir del segundo año se utilizará aquel que resulte óptimo en términos productivos.

De acuerdo a las modificaciones propuestas los estanques fueron profundizados centralmente sobre el eje transversal (salina 1) y longitudinalmente (salina 2) y perimetralmente (salina 1). Las modificaciones de estanques fueron todas realizadas de acuerdo a lo propuesto y se observó en éstos una mayor regularidad del fondo como una mayor consistencia de los parapetos.

A partir de la tercera y cuarta semana del mes de enero se registró la proliferación de Artemia en los estanques modificados. Esto ocurrió previo a la inoculación con la cepa de San Francisco Bay. Lo anterior corrobora la idea propuesta previamente a través del programa de Consultores Calificados del FIA donde se señaló que la profundización de los estanques podría mejorar sustancialmente la abundancia de la población local de Artemia.

Cultivo de Microalgas

Cepa de la microalga *Dunaliella salina* fue inoculada en estanques de acrílico transparentes de 20 l con agua de mar (35 ‰) previamente esterilizada con hipoclorito de sodio y desactivada con tiosulfato. El cultivo fue enriquecido con el medio Enhance Algae®, según el protocolo de los fabricantes. Los estanques fueron mantenidos con aireación constantes (24h) y fotoperiodo de 12h:12h. Luego de 7 días de cultivo los estanques registraron una densidad que fluctuó entre 4 a 6 millones de células por mililitro.

Los estanques fueron trasladados desde el laboratorio a las salinas donde fueron trasferidos a los estanques en tierra. Los estanques para el cultivo de las microalgas en tierra fueron previamente asignados, considerando para ello la profundidad así como su localización a fin de realizar una fácil distribución del alimento hacia las unidades productivas. La siembra se realizó bajo óptimas condiciones climáticas y su distribución se llevó a cabo considerando el viento predominante. Los estanques fueron inmediatamente fertilizados (Enhance Algae®) de acuerdo al volumen útil de éstos.

Se realizó monitoreo diario de los estanques, registro de temperatura y salinidad, así como el recuento algal mediante la toma de muestras de agua (n= 3: volumen 50ml) desde distintos vértices como profundidades de los estanques. Luego de una semana, en la cual no se registro incremento de la población de microalgas, se procedió a una segunda fertilización (Enhance Algae®). Se continuó con el monitoreo de los estanques sin observarse, nuevamente, aumento de la densidad poblacional por lo que se procedió a una tercera fertilización. Esta vez se utilizaron fertilizantes agrícolas, superfosfato triple y urea, los que fueron previamente disueltos y distribuidos uniformemente en los estanques.

Nuevamente, los estanques fueron monitoreados diariamente sin arrojar resultados positivos. La población de microalgas inoculada no proliferó de acuerdo a lo esperado con ninguno de los tratamientos implementados. Sin embargo, la abundancia de Artemia en los estanques siguió incrementándose, por lo que se asumió que, por su condición de filtrador no selectivo, Artemia se estaría alimentando de bacterias y materia orgánica particulada presente en los estanques.

Algunas de las posibles causas por las que el cultivo de microalgas no fue exitosa podrían ser:

Fotoinhibición se define como la inhibición de la fotosíntesis causada por exceso de energía luminosa. Diversos estudios han señalado que tanto la radiación UVB (280-320nm), como la UVA (320-400nm) producen fotoinhibición. Además de inhibir la fotosíntesis, la radiación UV modifica diversos procesos metabólicos, que al largo plazo afectan el crecimiento y la sobrevivencia de las microalgas. Sin embargo, entre las microalgas se ha observado un amplio rango de respuestas adaptativas a la radiación UV, que parecen estar directamente relacionadas con las condiciones normales del ambiente en el que dichas especies crecen lo que concuerda plenamente con la situación producida en las salinas de La Villa.

Volumen del inóculo: el volumen de microalgas inoculado podría haber sido escaso considerando el volumen de los estanques en tierra.

Salinidad y temperatura de los estanques en tierra: la cepa de *Dunaliella* inoculada es cultivada normalmente bajo condiciones de laboratorio. Por lo que el incremento de la salinidad y la temperatura de los estanques en tierra comparado a las condiciones estándares de cultivo podría explicar la ausencia del bloom microalgal.

Hatchery "Barrancas"

El proponente habilitó un hatchery en el sector de "Barrancas", ubicado aproximadamente a 4 km de las salinas, el que cuenta con agua potable y luz eléctrica. Este laboratorio está subdividido en los siguientes sectores:

Laboratorio seco: está habilitado con una balanza, lupa y microscopio. En este sector del hatchery se realizan las actividades de recuento de microalgas, observación de los estados larvales de las *Artemia*.

Laboratorio húmedo: en el laboratorio húmedo se encuentran los estanques cilindro cónicos transparentes donde se lleva a cabo la eclosión de quistes, para ello están habilitados con iluminación directa, requerimiento para los primeros estadios de desarrollo de este crustáceo.

Sector de secado: está equipado con un ventilador y secadores con repisas para la incorporación de los tamices de tul. El ventilador permite mantener una adecuada humedad ambiental favoreciendo la rápida evaporación del agua de los quistes cosechados. De esta manera se alcanza el porcentaje de humedad requerido para su futura comercialización.

Conclusiones y sugerencias

Las obras y actividades propuestas de acuerdo al programa de actividades del proyecto fueron cumplidas totalmente. El proponente ejecutó las obras comprometidas, así como también realizó la compra de insumos y equipos requeridos a la fecha.

Los profesionales a cargo de las actividades en terreno llevan el control diario del estado de los estanques de cultivo de *Artemia* así como también el de las microalgas. Su profesionalismo se destaca en términos de búsqueda de soluciones y alternativas ante situaciones adversas o no esperadas como fue el cultivo de microalgas. Este problema podría ser parcialmente resuelto si se iniciara, a partir de la próxima temporada, el aislamiento de *Dunaliella* salina originaria de las mismas salinas. Sin embargo, ello requiere de un mayor esfuerzo, materiales y desarrollo de técnica de laboratorio que por el momento no podrían ser implementadas en el Hatchery de Barrancas.

El corralón y los canales de distribución de agua requieren de una mantención. Es decir, la eliminación de algas y plantas que lo habitan. Con respecto a los problemas de diferencia de altura para el adecuado traspaso de agua desde este a los canales de distribución y finalmente a las unidades productivas, la situación es más compleja ya que requiere de movimiento de tierra lo que no ha sido contemplado en el proyecto.

Introducción

Actualmente, los nauplios de *Artemia* constituyen no solo el mejor, sino que en muchos casos el único tipo de alimento vivo válido para los primeros estados larvarios de la mayoría de las especies de peces y crustáceos cultivados. Ello debido a la facilidad de almacenar quistes por prolongado tiempo sin que pierdan su calidad y de acapsularlos y obtener nauplios de acuerdo a los requerimientos del acuicultor.

En la mayoría de las poblaciones de *Artemia* los quistes producidos flotan en la superficie lo que implica ciclos repetidos de hidratación/deshidratación (a causa de la lluvia o de una humedad elevada) alterando la calidad estos. Ello debido a la pérdida (parcial) de su reserva energética y ocasionando así una disminución en la capacidad de eclosión o en el contenido calórico.

Esta experiencia tiene por objetivo evaluar la calidad de la cepa de *Artemia* de la Bahía de San Francisco inoculada en La Villa, utilizando los estándares internacionales.

Material y Métodos

Quistes de *Artemia* de la Bahía de San Francisco fueron gentilmente donados por Artemia Referente Center, University of Ghent, Belgium. Se incubó 1 gramo de quistes en botellas (1 litro) cilindro cónicas de transparentes (n=3) con agua de mar artificial (35‰), pH 8.0-8.5, a 25°C con aireación desde el fondo e iluminación constante (1000 lux).

Se evaluó la calidad de la cepa de acuerdo a parámetro internacionales según la metodología propuesta por Lavens y Sorgeloos (1996) utilizando para ello las siguientes ecuaciones:

$$a) \text{ Porcentaje de eclosión} = \frac{(N * 100)}{N + U + E}$$

donde: N = número de nauplios

U = número de umbrellas

E = número de embriones

b) Eficiencia de eclosión =
$$\frac{(N \cdot 4 \cdot 800)}{1,6}$$

c) Tasa de eclosión: se tomaron submuestras (n=6) y se calculo la eficiencia de eclosión desde las 12h de inoculación. Se continuo con el registro hasta que el la eficiencia de eclosión se mantiene constante durante 3 horas. El valor promedio por hora se expresó como porcentaje de la máxima eficiencia de eclosión.

Resultados y discusión

La cepa de *Artemia franciscana* de la Bahía de San Francisco (USA) fue monitoreada 48h post-inoculación. En la Tabla 1 se presentan los resultados de los porcentajes de eclosión obtenidos a la 24h y 48h. Luego de 24h de incubación, 35.5 (± 14.27) nauplios eclosionaron a partir de 100 quistes. sin embargo este valor incremento a 93.46 (± 3.66) luego de 48h de incubación. Este criterio no incluye las impurezas (quistes rotos, sal, arena, etc) sino solo se refiere a la capacidad de eclosionar. Los resultados sugieren que los quistes eclosionados no estaban en estado de diapausa ya que la mayoría de ellos eclosionó exitosamente. Del mismo modo el contenido de energía presente en los quistes es adecuado lo que refleja que fueron procesados y almacenados adecuadamente.

Tabla 1: Porcentaje de eclosión de quistes de *Artemia* de la Bahía de San Francisco (USA) 24h y 48h post-inoculación

	Porcentaje de Eclosión 24 h post-inoculación	Porcentaje de Eclosión 48 h post-inoculación
Cono 1	25.63	89.32
Cono 2	29.05	94.78
Cono 3	51.89	96.27
Promedio	35.52	93.46
SD	14.27	3.66

La eficiencia de eclosión representa el número de nauplios producidas a partir de un gramo que quistes. Estos valores pueden ser variables, siendo los más bajos 100.000 nauplios/gr de quistes o alcanzar los valores Premium del Gran Lagos Salado cuya producción es de 320.000 nauplios/gr. de quiste. La eficiencia de eclosión es un importante criterio en términos económicos, así el precio de venta en directa relación con los valores que esta registre. En esta experiencia se determino que la eficiencia de eclosión de la cepa inoculada fue de 280666,7 ($\pm 43061,97$) luego de 48 h de incubación (Tabla 2).

Tabla 2: Eficiencia de eclosión de quistes de *Artemia* de la Bahía de San Francisco (USA) 24h y 48h post-inoculación

	Eficiencia de Eclosión 24 h post-inoculación	Porcentaje de Eclosión 48 h post-inoculación
Cono 1	48800	236333.33
Cono 2	50400	322333.33
Cono 3	117600	283333.33
Promedio	72266.67	280666.7
SD	39267.9683	43061.97

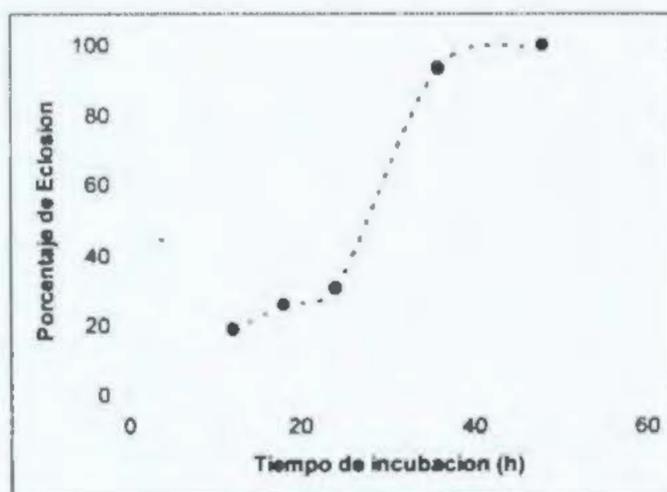
La tasa de eclosión se refiere al tiempo transcurrido desde que comienza la incubación (hidratación de los quistes) hasta la liberación del nauplio (eclosión). Se consideran los distintos intervalos de tiempo: a) T0 Tiempo de incubación hasta que aparecen los primeros nauplios nadadores; b) T10 Tiempo de incubación hasta que aparece el 10% del total de los nauplios eclosionables; c) T90 Tiempo de incubación hasta que aparece el 90% del total de los nauplios eclosionables; d) T90 - T10; este valor da una idea de la sincronía de la eclosión. En esta experiencia los valores alcanzados a los diferentes intervalos de tiempo fueron registrados cada 12 horas (Tabla 3 y Figura 1) Cuando la sincronía de eclosión es bajo ($T_{100}-T_0 > 10$ h), la primera nauplio eclosionada a consumido gran parte de la energía disponible cuando la ultima nauplio eclosiona. En este caso la cepa inoculada sobrepasa los estándares de sincronía de eclosión alcanzando este un valor de 20h.

Tabla 3: Tasa de máxima eficiencia de eclosión de quistes de *Artemia* de la Bahía de San Francisco (USA).

Tiempo de incubación	Eficiencia de eclosión	Porcentaje de la maxima eficiencia de eclosion
12	53000	18,88
18	72266,66	25,75
24	85027,77	30,29
36	262416,66	93,50
48	280066,6	100,00

Figura 1: Tasa de eclosión de la de quistes de Artemia de la Bahía de San Francisco (USA)

T0	5 h
T10	16h
T50	30h
T90	36h
TS	20h



Conclusiones

La cepa de *Artemia franciscana* de la Bahía de San Francisco inoculada en las salinas de La Villa cumple con los requerimientos internacionales en términos de porcentaje y eficiencia de eclosión. Estas características son especies específicas y no necesariamente son iguales entre partidas de quistes variando la calidad de la eclosión entre partidas de la misma especie y localidad. Los resultados obtenidos reflejan que las etapas de cosecha, procesamiento y almacenaje fueron adecuadas, no siendo necesario utilizar ningún método para desactivar la diapausa de los quistes previa su eclosión. Lamentablemente la sincronía de eclosión sobrepasa los estándares deseados, lo cual significa que no podemos asegurar un máximo número de Instar I disponibles en periodo corto de tiempo. Desde el punto de vista práctico esto implica que las larvas deberán ser colectadas desde los estanques de eclosión y o cultivo reiteradamente a fin de evitar la sobre posición de distintos estadios larvales.

Introducción

La producción máxima de quistes y biomasa de *Artemia* están influenciadas por la dinámica local de la población, es decir, por la tasa de reclutamiento de la población. El rol de los quistes en una salina es el de inóculo ya que luego del invierno, durante el cual están anegadas y no hay producción de sal, darán origen a una nueva generación. En estanques manejados extensivamente, ligados a la productividad natural, sin un manejo específico en la entrada de agua, se estabilizarán a densidades generalmente mucho más bajas.

La literatura señala que *Artemia* al ser expuesta a salinidades altas, o bien a ambientes eutroficados (con amplias fluctuaciones de O_2 entre el día y la noche) podrían provocar un stress suplementario a la población favoreciendo la inducción de oviparidad. Esto puede suceder naturalmente, cuando la salina está en funcionamiento, especialmente en los últimos estanques de producción; o puede ser promovido (e incluso realizado a bajas salinidades) incrementando las tasas de fertilización. La oviparidad solo se inducirá cuando la densidad de población sea suficientemente alta como para que no tengan lugar nuevos reclutamientos. Las salinidades más bajas y regulares sumadas la disponibilidad de alimento favorecen la producción de biomasa en los estanques.

El objetivo de esta experiencia es evaluar el efecto de la salinidad en la inducción a la oviparidad en cepas de *Artemia* de la Bahía de San Francisco (USA) y La Villa (Chile).

Material y Métodos

Quistes de *Artemia franciscana* de la Bahía de San Francisco (USA) fueron eclosionados de acuerdo la metodología descrita por Lavens y Sorgeloos (1996), mientras que nauplios de *Artemia* de La Villa (Chile) fueron colectados desde los estanques de mantención de cepas de *Artemia* disponibles en el Laboratorio de Genética & Acuicultura, Universidad de Los Lagos. Una vez que los ejemplares alcanzaron el estado de juvenil pares (macho y hembra) de cada cepa ($n=10$) fueron cultivados a salinidades experimentales 35, 50, 75, 100, 125 y 150 ‰ en tubos Falcon (50ml). El agua de los tubos fue cambiada diariamente y por medio de capilares se colectaron las nauplios producidas, las que se transfirieron a

botellas con agua a la salinidad experimental. Los quistes, en tanto, fueron colectados por medio de tamices (100 μ m) y mantenidos en salmuera (350‰).

Los datos fueron registrados a fin de obtener el número promedio de descendencia para cada cepa y cada salinidad, evaluando así el efecto de ésta sobre la inducción de oviparidad (quistes). Los datos fueron analizados utilizando un Análisis de Varianza (Andeva) utilizando el programa SPSS 11.0

Resultados y discusión

En la Tabla 1 se presentan los valores promedios del total de descendientes de cada cepa a las distintas salinidades experimentales. La cepa de la Bahía de San Francisco (USA) inoculada en la salina de La Villa alcanzó mayor número de descendientes cuando fue cultivada a la salinidad experimental de 100‰ mientras que los menores valores se observaron a la salinidad máxima (150‰) afectando en forma significativamente negativa el número quistes producidos (Tabla 2). En términos generales esta cepa produjo un mayor número de descendientes, 175, 2 ($\pm 135,9$) y 190,4 ($\pm 53,06$) cuando fue cultivada a 35 y 50 ‰ respectivamente (Tabla 1). La mayor proporción de descendientes fue a través de reproducción ovípara observándose escasa producción de nauplios en todas las salinidades experimentales utilizadas. La cepa nativa de La Villa produjo mayor número de descendientes en todas las salinidades experimentales estudiadas respecto de la cepa de San Francisco, con los más altos registros, 229 ($\pm 121,29$) descendientes, a la salinidad 50‰ y los menores 100, 5 ($\pm 121,29$) a 35 ‰ respectivamente (Tabla 1). Además, en esta cepa se registró una mayor proporción de nauplios en todas las salinidades experimentales comparadas con la cepa norteamericana, especialmente cuando su cultivo se llevó a cabo 125‰ (Tabla 1). El análisis estadístico realizado confirma un efecto significativo a salinidades de 50 y 75 ‰ en la producción de quistes ($P < 0.05$). Aunque se registró un efecto significativo en la producción de quistes cuando los ejemplares fueron cultivados a salinidad menor, éste fue negativo ($P < 0.05$) y redujo el número de descendientes producidos en forma ovípara (Tabla 2).

Tabla 1: Descendencia de *Artemia* de las cepas San Francisco USA y La Villa a distintas salinidades experimentales

Cepa	Numero de Pares	Salinidad (‰)	Total de Quistes (sd)	Total Nauplios (sd)	Descendencia Total (sd)
San Francisco, USA	10	35	173,7 (133,18)	1,5 (4,74)	175,2 (135,95)
	10	50	165,8 (35,91)	24,6 (51,98)	190,4 (53,06)
	10	75	114,9 (82,69)	1,1 (3,47)	116,0 (82,38)
	10	100	160,1 (103,04)	34,1 (52,71)	194,2 (110,46)
	10	125	154,2 (107,87)	4,8 (15,17)	159,0 (114,00)
	10	150	71,7 (70,05)	7,4 (23,40)	79,1 (67,00)
La Villa, Chile	9	35	78,6 (67,97)	21,8 (25,95)	100,5 (81,89)
	10	50	197,5 (124,06)	32,0 (25,17)	229,5 (121,29)
	10	75	142,5 (89,99)	69,6 (83,04)	212,2 (123,14)
	10	100	60,1 (24,73)	67,1 (48,19)	127,2 (57,80)
	10	125	76,3 (79,90)	105,4 (97,00)	181,7 (115,91)
	10	150	52,4 (57,28)	94,7 (66,12)	147,2 (76,58)

Tabla 2: Análisis de Varianza del efecto de la salinidad en la generación de descendientes enquistados en la cepa de *Artemia* de la Bahía de San Francisco (USA) y de La Villa (Chile).

Cepa	Salinidad	Pendiente B	Error estandar	T	P	Intervalo de Confianza	
						Menor	Mayor
San Francisco, USA	35	0,094	0,187	0,501	0,619	-0,281	0,468
	50	0,112	0,187	0,597	0,553	-0,263	0,486
	75	0,242	0,187	1,292	0,202	-0,133	0,616
	100	-0,149	0,187	-0,797	0,429	-0,524	0,226
	125	0,235	0,187	1,256	0,215	-0,140	0,610
	150	-	-	-	-	0,000*	-
La Villa, Chile	35	-0,788	0,212	3,722	0,000*	0,363	1,212
	50	0,561	0,206	2,719	0,009*	0,147	0,974
	75	0,472	0,206	2,289	0,026*	0,058	0,886
	100	0,292	0,206	1,415	0,163	-0,122	0,706
	125	0,197	0,206	,953	0,345	-0,217	0,610
	150	-	-	-	-	0,000*	-

* Significativo ($P < 0.05$)

Conclusiones

La salinidad de cultivo tuvo efecto positivo en la producción de quistes en la cepa originaria de La Villa. Sin embargo la salinidad no afectó estadísticamente la estrategia reproductiva de la cepa inoculada, San Francisco excepto cuando esta alcanzó 150‰ por lo que se sugiere que las deberían ser mantenidas en terreno a salinidades menores que esta. Lo interesante de la cepa inoculada fue que la mayoría de las hembras se reprodujo oviparamente, que es lo que persigue este proyecto a fin de poder comercializar los quistes. Estos resultados obtenidos de animales en condiciones controladas pueden variar ya que en condiciones naturales la situación de stress y de fertilización podrían sin duda mejorar los resultados esperados.

QUALITY ANALYSIS OF ARTEMIA CYSTS

Sample specification : Pichilemu ARC code 1624
provided by Prof. G. Gajardo
Date : Harvested February-April 2004
arrived May 2004

HATCHING CHARACTERISTICS

Sample	Time (hr)	hatching percentage (28°C)
Original	24	No hatching
Peroxide treatment	24	12.20
	48	15.04

BIOMETRICAL CHARACTERISTICS

diameter of cysts (in micrometer, mean and standard deviation)

234.3 μ m 8.9

CONTENT OF SELECTED FATTY ACIDS IN INSTAR I NAUPLII

(hatched under standard conditions; 28°C) expressed in area percent of total fatty acid and in mg fatty acid per g dry weight nauplii

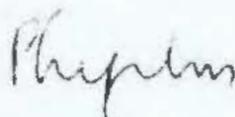
20:5n-3		22:6n-3		Sum (n-3) > or = 20:3(n-3)	
Area %	Mg/g	Area %	mg/g	Area %	mg/g
10.9	10.0	0.1	0.1	11.9	11.0

GENERAL COMMENTS

Low hatching, which most probably can be improved by adequate processing and diapause induction.

Conclusion: product showing interesting perspectives for aquaculture applications.

Analyses certified by Prof. Dr. P. Sorgeloos for the ARC



Gent, July 28, 2004

Introducción

La liofilización es una forma de desecado en frío que sirve para conservar sin daño los más diversos materiales biológicos. En el proceso, primero se congela el material, y luego el hielo se elimina por sublimación. La eliminación del agua, sólo queda un 2% de ella luego del proceso de liofilización, proporciona una excelente protección frente a las principales causas de alteración de los alimentos. Los microorganismos no pueden desarrollarse en un medio sin agua. Además, en estas condiciones tampoco es posible la actividad enzimática, y la mayor parte de las reacciones químicas se hacen mucho más lentas de lo normal.

Material y Métodos

Biomasa de *Artemia* cosechada desde la localidad de La Villa fue congelada y trasladada, en un bidón de Nitrógeno líquido (5l), para su liofilización al Laboratorio de Genética & Acuicultura, Universidad de Los Lagos (Osorno).

Trozos de 87 gr de biomasa congelada fueron transferidos a 4 botellas de boro cilicato (300ml) y liofilizados en el Sublimator VaCo5 (Zirbus) durante 27 horas. Se registró el peso inicial así como intermedios y final de las muestras a fin de determinar su curva de secado.

Resultados

Las muestras de *Artemia* congelada requirieron de 28 horas de liofilización. La mayor pérdida de humedad se registró durante las primeras horas, mientras que luego de 24 h de liofilización este proceso se volvió cada vez más lento hasta alcanzar peso contante. para alcanzar peso constante (Tabla 1). El peso inicial de las botellas fue de 87,0 gr mientras que el final alcanzó un 23,0 gr lo que significa un rendimiento (peso húmedo/peso seco) del 26,43%. La visión gráfica de la experiencia se representa a través de la curva de secado se muestra en la Figura 1.

Tabla 1: Biomasa de Artemia: Registro del proceso de liofilización

Tiempo (h)	Peso Botella 1(gr)	Botella 2(gr)	Botella 3(gr)	Botella 4(gr)	Peso Promedio/hora
0	87,0	87,0	87,0	87,0	87,00
1	82,5	81,9	81,2	81,5	81,78
2	77,6	76,8	76,2	77,0	76,90
3	73,8	72,6	72,0	73,0	72,85
4	70,3	68,9	68,3	69,7	69,30
5	66,8	65,0	64,4	65,9	65,53
6	61,8	59,7	59,1	60,8	60,35
7	58,8	56,3	55,8	57,6	57,13
8	56,1	53,2	52,8	54,8	54,23
24	30,0	25,9	25,9	28,4	27,55
25	28,4	24,6	24,5	27,0	26,13
26	27,3	23,4	23,3	25,8	24,95
27	25,4	21,8	21,8	24,2	23,30
28	25,2	21,5	21,5	24,0	23,00

Las muestras una vez finalizado fueron envasadas, selladas y enviadas a la localidad de Pichilemu. Se observó la presencia de algunas hojas y larvas de insectos en las muestras.

Discusión y Conclusiones

El proceso de liofilización de biomasa de *Artemia* resulta bastante sencillo, aunque los volúmenes a procesar son reducidos. De acuerdo a los materiales disponibles, es decir botellas de boro silicato, el laboratorio podría procesar aproximadamente 1500 ml de *Artemia* congelada cada 27 h, equivalente a 400 gr de *Artemia* liofilizada. La ventaja de este tipo de proceso es que se mantiene intacta la calidad de las muestras, los costos de envasado son reducidos y el peso final del producto es bajo. Sin embargo el proceso es lento y en este caso toma más de un día.

QUALITY ANALYSIS OF ARTEMIA CYSTS

Sample specification: Pichilemu ARC code 1655
provided by Prof. G. Gajardo
Date: arrived May 2005

1. CYSTS

HATCHING CHARACTERISTICS

Sample	Time (hr)	hatching percentage (28°C)
Original	24	22.12% (0.84)
Periodic treatment	24	24.24% (0.50)
	48	25.25% (1.25)

WATERCONTENT

Dried in oven at 60°C - 24 hrs. (% H₂O, mean and standard deviation)

6.00% 0.08

BIOMETRICAL CHARACTERISTICS

diameter of cysts (in micrometer, mean and standard deviation)

229.78 µm 10.50

CONTENT OF SELECTED FATTY ACIDS IN DECAPSULATED CYSTS

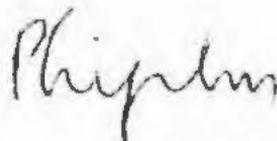
20:5n-3 and 22:6n-3 expressed as mean percent of total fatty acid and in mg fatty acid per g dry weight nauplii.

20:5n-3		22:6n-3		Sum (n.3) and (n.3)	
Area %	Mg/g	Area %	mg/g	Area %	mg/g
16.8	23.35	0.1	0.1	17.4	24.2.0

COMMENTS:

Positive characteristics are the small diameter and the high HUFA contents of the sample, which show that this material clearly is promising for aquaculture applications. The low hatching value, even after periodic treatment, however, is problematic, and suggests that problems have arisen as a consequence of the harvesting/drying/storage process. This could be verified by the analysis of fresh material.

Approved and signed by Prof. P. Sorgeloos



QUALITY ANALYSIS OF ARTEMIA CYSTS

Sample specification : Pichilemu ARC code 1655
provided by Prof. G. Gajardo

Date : arrived May 2005

2. DRY ARTEMIA BIOMASS

WATERCONTENT

Dried in oven at 60°C – 24 hrs. (% H₂O, mean and standard deviation)

11.23% 0.15

PROTEIN CONTENT

Expressed in percent proteins per g wet weight (mean and standard deviation)

41.90% 1.45

ASH CONTENT

Expressed in percent ash per g wet weight (mean and standard deviation)

29.40% 0.21

TOTAL LIPIDS

Expressed in percent lipids per g wet weight (mean and standard deviation)

9.04% 0.25

CONTENT OF SELECTED FATTY ACIDS

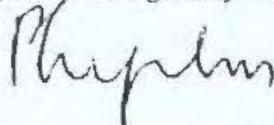
(hatched under standard conditions; 28°C) expressed in area percent of total fatty acid and in mg fatty acid per g dry weight nauplii.

20:5n-3		22:6n-3		Sum (n-3) > or = 20:3(n-3)	
Area %	Mg/g	Area %	mg/g	Area %	mg/g
14.2	9.9	0.2	0.1	14.8	10.3

COMMENTS

Normal composition for biomass; product suitable for aquaculture applications

Approved and signed by Prof. P. Sorgeloos,



Objetivos

1. Evaluar el efecto del tiempo de permanencia de los quistes en salmuera sobre el porcentaje de humedad de los quistes
2. Evaluar el efecto del porcentaje de humedad de los quistes y la calidad de ellos en términos de porcentaje de eclosión

Material y Métodos:

Quistes de *Artemia* que fueron cosechados en la Salina de la La Villa y almacenados separadamente en contenedores con salmuera durante 1, 2, 3, 4 y 5 semanas. Los quistes fueron eclosionados en el Laboratorio de Genética & Acuicultura de la Universidad de Los Lagos separadamente en triplicado para cada una de los periodos de almacenamiento evaluando la calidad de ellos sobre la base del porcentaje de eclosión (%E) y eficiencia de eclosión (EE). Transcurridas 24 horas desde el inicio del proceso de eclosión, se tomó una alícuota (1ml) de agua desde el estanque cilindro-cónico (n=5) y se depositó en una cápsula Petri. Posteriormente se agregaron unas gotas de lugol para luego poder observar y contabilizar bajo la lupa estereoscópica. El recuento consideró tanto los embriones y los estados "umbrella" como los nauplios de *Artemia*. El procedimiento se realizó de igual forma a las las 48 y 72 h post- inoculación de los quistes.

A continuación se presentan las ecuaciones con que se calculó tanto el porcentaje de eclosión (a)

$$(a) \quad \%E = \frac{N \times 100}{N + E}$$

como la eficiencia de eclosión (b)

donde: % E= Porcentaje de eclosión

N= número de nauplios contabilizados

E= número de embriones y "umbrellas" contabilizados

$$(b) \quad EE = \frac{N \times V}{M \times C}$$

donde: EE= Eficiencia de eclosión (N° de nauplios/g de quistes)

N= número de nauplios contabilizados

V= volumen del agua de mar utilizada (ml)

M= volumen de agua de la muestra (ml)

C= cantidad de quistes utilizados (g)

Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de 1 y 2 vías con el fin de evaluar los tiempos de permanencia de los quistes en salmuera sobre el porcentaje de humedad de los quistes y el porcentaje de eclosión de ellos. Se realizó posteriormente un análisis *a posteriori* Tukey con el fin de determinar cual y de que manera estas variables afectarían la calidad final de los quistes cosechados.

Resultados

El porcentaje y eficiencia de eclosión de los quistes de *Artemia* almacenados durante 1, 2, 3, 4 y 5 semanas en salmuera están representados en la Figura 1 y Tabla 1. En general una escasa eclosión de quistes se registró luego de 24h de inoculados para todos los periodos de permanencia de éstos en salmuera, mientras que a las 72h se registró los mayores porcentajes de eclosión. Estos porcentajes fluctuaron entre 11.34 y 52.35 % en aquellos quistes que permanecieron al menos 3 semanas en salmuera. De acuerdo a los resultados los mayores registros de eficiencia de eclosión se obtuvieron también luego de 72h post-inoculación para aquellos quistes que permanecieron 4

semanas en salmuera, lo que indicaría que en este caso a partir de 1 gramo de quistes se obtendrían en promedio 188.000 nauplios (Tabla 1).

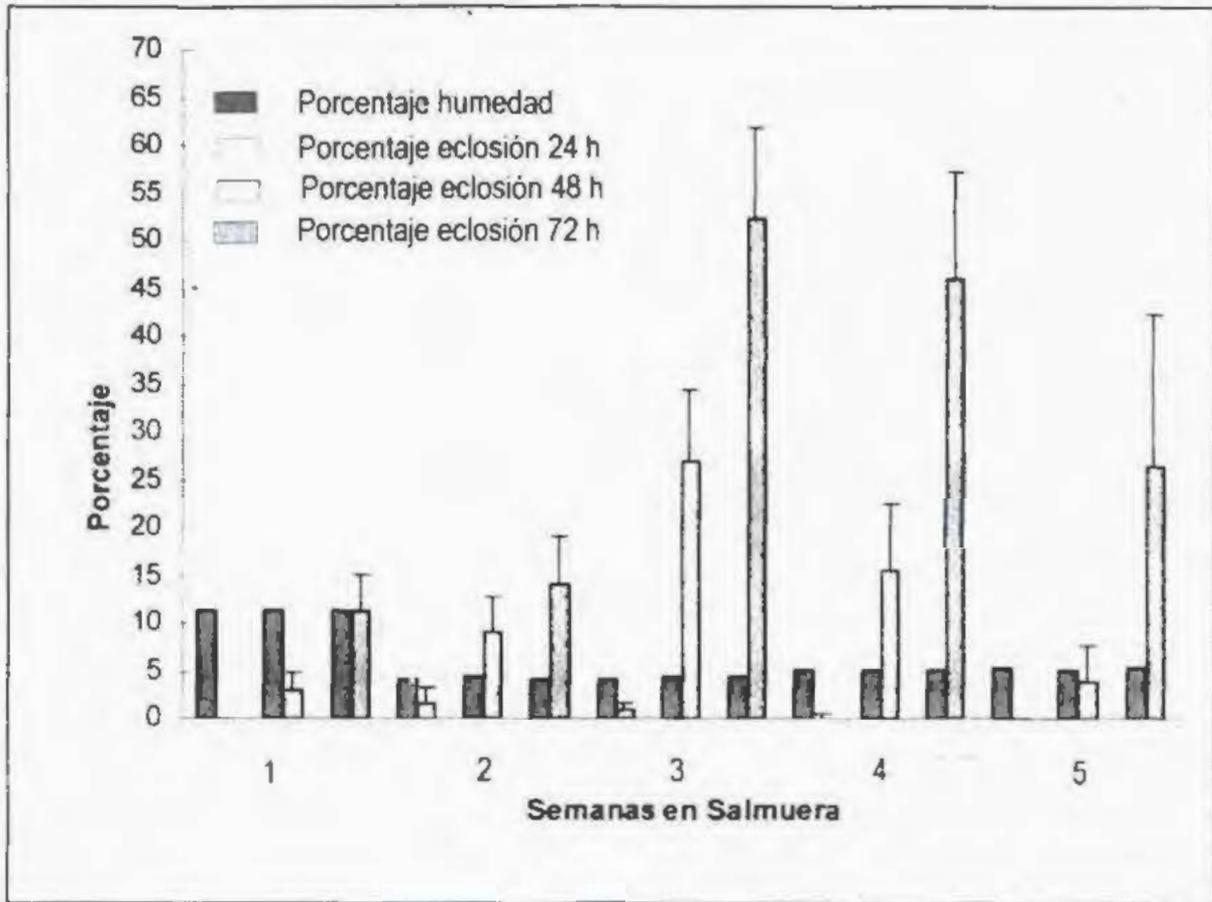


Figura 1: Porcentaje de humedad y eclosión de quistes de Artemia almacenadas durante 1, 2, 3, 4 y 5 semanas en contenedores con salmuera

Tabla 1: Porcentaje y eficiencia de eclosión a las 24, 48 y 72 h de quistes de *Artemia* almacenados post-cosecha en contenedores durante 1, 2, 3, 4 y 5 semanas en salmuera.

24h	1	2	3	4	5
Porcentaje eclosión	0	1.64	0.87	0.10	0.00
<i>SD</i>	0	1.54	0.72	0.30	0.00
Eficiencia eclosión	0	1069.87	402.80	133.33	0.00
48 h					
Porcentaje eclosión	3.08	9.01	26.99	15.64	3.94
<i>SD</i>	1.90	3.73	7.54	6.96	3.79
Eficiencia eclosión	7733.33	35866.67	100800.00	42800.00	18266.67
72 h					
Porcentaje eclosión	11.34	14.17	52.35	46.10	26.44
<i>SD</i>	3.76	4.98	9.60	11.06	15.77
Eficiencia eclosión	41333.33	52266.67	136933.33	188000.00	143733.33

El periodo de almacenamiento post-cosecha afectó significativamente el porcentaje de humedad de los quistes ($p < 0,05$) (Tabla 2) aunque este no tuvo un efecto en el porcentaje de eclosión de ellos ($p > 0,5$). El test a posteriori indicó que los quistes deben permanecer al menos 2 semanas en salmuera para alcanzar porcentajes de humedad menores a los requeridos por los controles de calidad (10%). Aunque no existe diferencia en la deshidratación de los quistes entre un periodo de almacenamiento de entre 2 y 3 semanas en salmuera, 4,30 y 4,34 % respectivamente éstos fueron ligeramente menores respecto de aquellos que fueron sometidos a tratamientos más prolongados (4 y 5 semana) (Tabla 3, Figura 1).

Tabla 2: Análisis de varianza del efecto de la permanencia de los quistes en salmuera sobre el porcentaje de humedad de los quistes Artemia.

df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
2	1110,59	12,00	146,95	7,55	0,008

Tabla 3: Test *a posteriori* test a Tukey del efecto de la permanencia de los quistes de Artemia en salmuera durante distintos periodos de tiempo.

Tiempo en semanas				
1	2	3	4	5
a	b	b	c	c

Discusión y Conclusiones

Los quistes cosechados en la salina de La Villa eficiencias de eclosión mayores a los estándares ya que superan largamente los 100.000 quistes por gramo de quistes de Artemia que se comercializan normalmente aunque un tanto alejados de alcanzar los niveles Premium como los cosechados en el Gran Lago Salado cuya eficiencia de eclosión llega hasta los 270.000 nauplio por gramo (Lavens y Sorgeloos, 1996). Por otra parte los porcentajes de humedad alcanzados por los tratamientos fueron eficientes, es decir, los niveles de agua fueron menores la 10%, excepto en aquellos cuyo periodo de almacenamiento en salmuera fue de sólo 1 semana. De esta manera se aconseja mantener los quistes entre 2 y 3 semanas en salmuera post-cosecha lo que significa que ellos permanecerán un periodo relativamente corto de tiempo previo a su envasado y comercialización. Del mismo modo, aunque los porcentajes de eclosión de las muestras fueron relativamente bajos comparados a los estándares de calidad se mantiene la tendencia de que a menores porcentajes de humedad los porcentajes de eclosión de las larvas son mayores.

MATERIAL Y METODOS

Ejemplares de *Artemia* de dos localidades de Chile fueron utilizados para aislar DNA. En la Tabla 1 se presentan las especies, localidades y coordenadas geográficas de los ejemplares de *Artemia* utilizados. Los individuos fueron lavados con abundante agua destilada para eliminar restos de agua salada y secados en papel filtro. Posteriormente fueron homogenizados individualmente en un tubo eppendorf utilizando una baqueta de vidrio estéril en 20µl solución de Chelex-100 (Biorad, Bélgica) al 5%. Se aisló también DNA a partir de quistes de *Artemia* de ambas localidades los que fueron hidratados durante 2h en agua doble destilada estéril previo a la homogenización. Las muestras fueron incubados a 60°C durante 30 min con intermitentes vorteos cada 10 min, seguidos por incubación a 100°C durante 8 min. Luego de centrifugar (14.000rpm x 5 min) el DNA sobrenadante fue colectado y utilizado directamente para los análisis de RFLP.

Tabla 1: Lista de especies, localidades y coordenadas de ejemplares de *Artemia* utilizados

<i>Especie</i>	<i>País</i>	<i>Localidad</i>	<i>Coordenadas</i>
<i>A. franciscana</i>	Chile	Cáhuil	34° 30' S; 72° 01' W
<i>A. persimilis</i>	Chile	Laguna Amarga	50°29'S; 73° 45'W

La reacción en cadena de la polimeraza (PCR) fue realizada en un termociclador marca Thermo modelo Px2. Las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 25µl que contenían entre 50 y 100 ng de DNA, buffer PCR 10x (Invitrogen), 0.1mM de dNTP's, 2mm de Cloruro de Magnesio, 1U de taq (Invitrogen) y 0.5 µM de los primers HSP26fw 5'GGA-GAA-GAA-TGA-TGA-GAA-G-3' y HSP26r 5' TCT-CTT-TGG-ACG-TGT-CCA-TAT-TC-3'. Los primers han sido previamente utilizados para amplificar parte del exon del gen HSP26 de 217bp (Qiu et al 2006). Las condiciones del ciclo térmico fueron: 1 ciclo a 94°C por 2 min, 35 ciclos de 1min 15s a 94°C, 1 min 30s a 53°C, 30 seg a 72°C y una extensión final a 72° durante 4 min. Los productos PCR fueron visualizados por electroforesis de geles de agarosa (1%) teñidos con SybrGreen (Invitrogen). Los productos PCR exitosamente amplificados fueron digeridos con 4 enzimas de restricción de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes (Fermentas) (Tabla 2) en un volumen de final de 25 µl utilizando 10 µl de productos amplificados, 5UI de enzima por reacción, buffer 10X y agua doble destilada. Los

productos fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa (2%) en 0.5X bufer TBE. Los geles fueron teñidos con Sybr Green (Invitrogen), los fragmentos generados visualizados mediante un transiluminador y fotografiados para su posterior análisis.

Tabla 2: Nómima de enzimas de restricción y sus secuencias de reconocimiento.

Enzima	Secuencia de reconocimiento
Alu I	5'-A G [^] C T-3' 3'-T C [^] G A-5'
Eco47 I	T 5'-G [^] G A C C-3' 3'-C C [^] T G [^] G-5' A
Dpn I	CH ₃ 5'-G A [^] T C-3' 3'-C T [^] A G-5' CH ₃
Tas I	5'- [^] A A T T-3' 3'-T T A A [^] -5'

RESULTADOS

DNA de *Artemia franciscana* y *A. persimilis* fue exitosamente aislado tanto de ejemplares adultos como de quistes con la resina Chelex. Los partidores Hsp26 amplificaron el fragmento del gen de la proteína chaperona (Figura 2) generando un fragmento de 217 bp (Fig. 1).

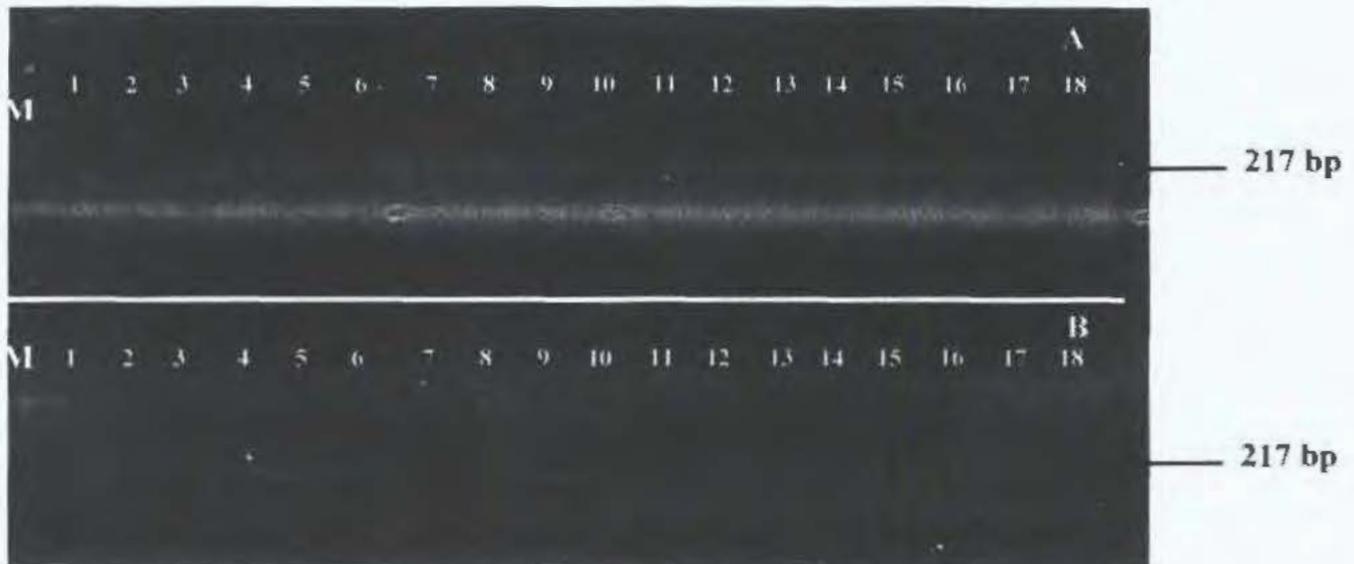


Figura 1: Análisis electroforético de productos PCR del exon que codifica para la chaperona Hsp26 en gel de agarosa al 1%. M= marcador de peso molecular 100bp. A. Carril de 1 al 18 *A. franciscana* de la localidad de Cáhuil; B. Carril 1 al 18 *A. persimilis* de la localidad de Laguna Amarga.

Las enzimas Alu I y Tas I digirieron exitosamente el fragmento del gen de la proteína chaperona amplificado a través de la PCR en ambas especies, mientras que la enzima Eco47 I sólo actuó exitosamente en *A. franciscana* sin visualizarse fragmentos de corte en *A. persimilis*. En tanto la enzima Dpn I generó fragmentos en ninguna de las 2 especies estudiadas (Fig. 3).

En la figura 2 se observa el registro electroforético del fragmento digerido con la enzima Tas I para ambas especies de Artemia. *A. persimilis* generó 2 fragmentos visibles de 144 y 112 bp, mientras que *A. franciscana* generó sólo un fragmento de menor tamaño de 104 bp.



Figura 3: Análisis electroforético de productos PCR del exon que codifica para la chaperona Hsp26 en gel de agarosa al 1% digerido en la enzimas Dpn I. M= marcador de peso molecular 100bp. Carril 1 y 5: Control producto PCR de *A. franciscana* sin enzima de restricción. Carril 2-5: Producto PCR de *A. franciscana* digerida con la enzima de restricción. Carril 6 y 11: Control producto PCR de *A. persimilis* sin enzima de restricción. Carril 7-10: Producto PCR de *A. persimilis* digerida con la enzima de restricción.



Figura 2: Análisis electroforético de productos PCR del exon que codifica para la chaperona Hsp26 en gel de agarosa al 2% digerido con la enzima de restricción Tas I. M= marcador de peso molecular 100bp. Carril 1: Control de producto PCR de *A. persimilis* sin la enzima de restricción (217 bp); Carril 2-10: producto PCR de *A. persimilis* digerida con la enzima de restricción; Carril 11: Control de producto PCR de *A. franciscana* sin la enzima de restricción (217bp). Carril 12-20: producto PCR de *A. franciscana* digerida con la enzima de restricción.

La enzima Alu I generó 2 fragmentos de 144 y 100 bp en *A. franciscana* en tanto que el fragmento del gen de la chaperona amplificado no generó fragmentos digeridos para al especie hermana *A. persimilis*. Por otra parte la enzima Eco47 I. Detecto y tipificó claramente ambas especie: *A. franciscana* con sólo un fragmento visible (58 bp) y *A. persimilis* con 2 fragmentos algo mas pequeños (144 y 100 bp).

La Tabla 3 presenta un resumen de los resultados en los que se detallan las enzimas y especies estudiadas con sus respectivos número y tamaño de fragmentos.

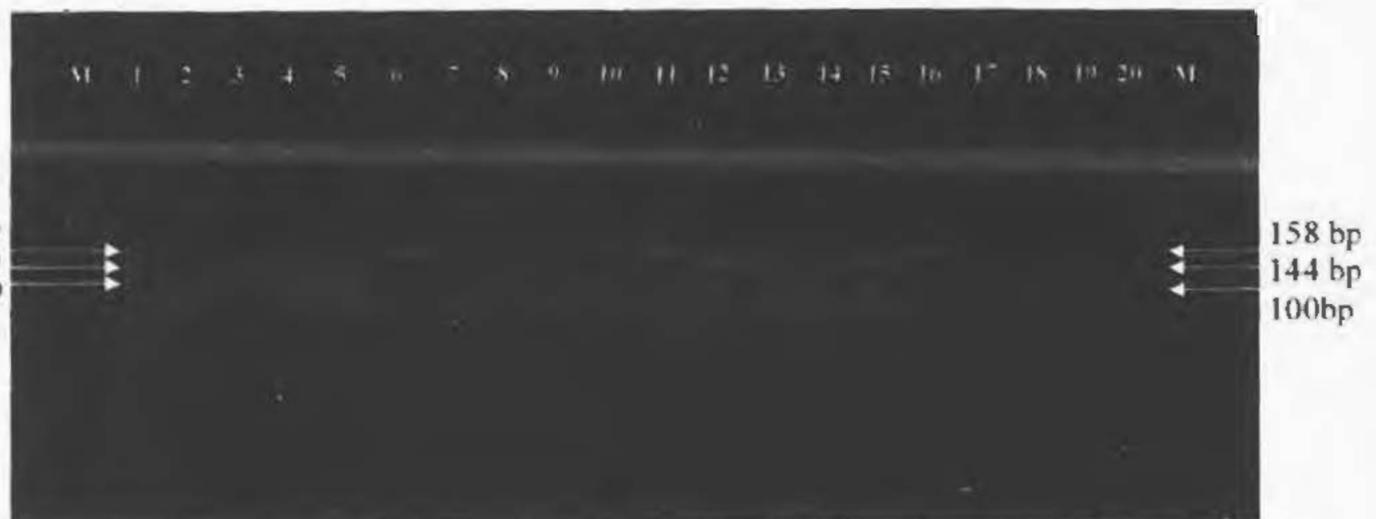


Figura 3: Análisis electroforético de productos PCR del exon que codifica para la chaperona Hsp26 en gel de agarosa al 2% digerido con las enzimas de restricción Alu I y Eco47 I.

M= marcador de peso molecular 100bp. Carril 1: Control de producto PCR de *A. franciscana* sin enzima de restricción (fragmento 217bp); Carril 2-5: producto PCR de *A. franciscana* digerida con la enzima de restricción Alu; Carril 6: Control de producto PCR de *A. persimilis* sin enzima de restricción (fragmento 217bp). Carril 7-10: producto PCR de *A. persimilis* digerida con la enzima de restricción Alu I; Carril 11: Control de producto PCR de *A. franciscana* sin enzima de restricción (fragmento 217); Carril 12-15: producto PCR de *A. franciscana* digerida con la enzima de restricción Eco47 I; Carril 16: Control de producto PCR de *A. persimilis* sin enzima de restricción (217bp). Carril 16-20: producto PCR de *A. persimilis* digerida con la enzima de restricción Eco47 I.

Tabla 3: Resumen del patrón electroforético de RFLP de *A. franciscana* y *A. persimilis*

Enzima	<i>A. franciscana</i> (n =20)		<i>A. persimilis</i> (n =20)	
	Numero de Fragmentos	Tamaño (bp)	Numero de Fragmentos	Tamaño (bp)
Alu I	2	144 100	0	-
Eco47 I	1	158	2	144 100
Dpn I	0	-	0	-
Tas I	1	104	2	144 112

DISCUSION

Las sHSP (small heat shock proteins) son una conservada familia de las proteínas que se encuentran prácticamente en todos los organismos. Son denominadas chaperonas moleculares formando largos complejos oligoméricos (≈ 500 kDa). Estas chaperonas constituyen la primera línea de defensa o resistencia contra el stress por calor u oxidativo protegiendo a las células de la denaturación de las proteínas. Particularmente *Artemia* se caracteriza por habitar ambientes extremos en términos de salinidad y temperatura que afectan significativamente su sobrevivencia (Vanhaecke et al 1984). Estos ambientes que incluyen salinidad hasta 300 ppm, baja concentración de oxígeno, altitudes que superan los 4.500m y temperaturas que pueden alcanzar hasta los 34°C (Triantaphyllidis et al. 1994). La reproducción a través de gástrulas enquistadas (quistes) le permiten sobrevivir durante años bajo condiciones de anoxia debido a que mantienen ATP y GTP para así cubrir las necesidades bajo estas condiciones extremas (Warner & Clegg 2001).

Se han descrito una gran variedad de reacciones de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar y tipificar *Artemia* mediante un fragmento de 1500 bp de rDNA mitocondrial (Bossier et al 2004) con el fin de autenticar las especies y el origen de ellas. Sin embargo, aunque las poblaciones analizadas fueron agrupadas en 5 especies (*A. franciscana*, *A. persimilis*, *A. sinica*, *A. salina* y *A. parthenogenetica*) se observó que existe una gran diversidad genética dentro de cada especie. En este trabajo se comparan dos especies de *Artemia* a través de RFLP para detectar y tipificar ambas especies. Los patrones de restricción difirieron entre ambas especies, especialmente el generado por la enzima Eco47 I y Tas I, lo que nos permitirá utilizar esta herramienta molecular con el fin

REFERENCIAS

- Bossier P, Xiaomei W, Catania F, Doom S, Van Stappen G, Naessens E & Sorgeloos P. 2004 An RFLP database for authentication of commercial cyst samples of the brine shrimp *Artemia* spp. (International Study on *Artemia* IX). *Aquaculture*, 231: 93-112
- Qiu Z, Bossier P, Wang X, Bojikova-Fournier S & T MacRae. 2006. Diversity, structure and expression of the gene for p26, a small heat shock protein from *Artemia*. *Genomics*, 88(2):230-40.
- Stromer T, Fischer E, Richter K, Haslbeck M & Buchner J. 2007 Analysis of the regulation of the molecular chaperone Hsp26 by temperature-induced dissociation. *J. Biol. Chem* In press
- Triantaphyllidis G, Pilla E, Thomas K, Abatzopoulos T, Beardmore J & Sorgeloos. 1994. International study on *Artemia*. LII. Incubation of *Artemia* cyst samples at high temperature reveals mixed nature with *Artemia franciscana* cysts. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 183:273-282
- Vanhaecke P, Siddal S, & Sorgeloos P. 1984. International Study on *Artemia*. XXXII: Combined effects of temperature and salinity on the survival of *Artemia* of various geographical origin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 80(3): 259-275.
- Vos J, Leger P, Vanhaecke P & Sorgeloos P. 1984. Quality evaluation of brine shrimp *Artemia* cysts produced in asian salt ponds. *Hydrobiologia*, 108(1):17-23.
- Warner A & Clegg J. 2001. Diguanosine nucleotide metabolism and the survival of *Artemia* embryos during years of continuous anoxia. *European Journal of Biochemistry*, 268 (6): 1568-1576.

V. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

1. BAERT, P., N.T.N. ANH, VU DO QUYNH, y N.V. HOA, 1997. Increasing cyst yields in *Artemia* culture ponds in Vietnam: the multi-cycle system.
2. GAJARDO, G. M. DA CONCEICAO, L. WEBER & J.A. BEARDMORE. 1995. Genetic variability and interpopulational differentiation among *Artemia* strains from South America. *Hydrobiologia*, 302: 21-29.
3. COLIHUEQUE, N. & GAJARDO, G. 1996. Chromosomal analysis in *Artemia* populations from South America. *Cytobios (UK)* 88:141-148.
4. GAJARDO, G.; COLIHUEQUE, N.; PARRAGUEZ, M. & SORGELOOS, P. 1998. International study on *Artemia*. LVIII. Morphological differentiation and reproductive isolation of *Artemia* populations from South America. *International Journal of Salt Lake Research*, 7 (2): 133-151.
5. GAJARDO, G., BEARDMORE, J. A. & SORGELOOS, P. 2001. International study on *Artemia*. LXII. Genomic relationships between *Artemia franciscana* and *A. persimilis*, inferred from chromocentre numbers. *Heredity* 87 (2): 172-177.
6. KIM, J., MASSEE, K., HARDY, R., 1996. Adult *Artemia* as food for first feeding coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 144 (1996) 217-226.
7. LAVENS, P., y SORGELOOS, P., 1996, Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO, Fisheries technical papers. 306 pp.
8. NEI, M., 1978. Estimation of average heterozigosity and genetic distance from a small number of individuals.
9. PARRA, O., GONZALEZ, M. y DELLAROSSA, V., 1983. Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales con especial referencia al fitoplancton de Chile: Chlorophyceae, parte I: Volvocales, Tetrasporales, Chroococcales y Ulothricales, Ed. Universidad de Concepción, 151 pp.
10. TAMARU, C., AKO, H., PAGUIRIGAN, R. Jr., and PANG, L., 1998. Enrichment of *Artemia* for use in freshwater ornamental fish production. Center for Tropical and Subtropical Aquaculture, Publication number 133.
11. VINATEA, L., 1990. Producción comercial de *Artemia* sp. en la salina "Cristo Redentor", Acaraú-CE, Brasil. II Simposio Brasileiro sobre cultivo de camarón. Anais vol.I, Joao Pessoa, 1990.