

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada



**Efecto interactivo de la Temperatura y la Calidad
Nutrimental de Microalgas Sobre Algunas Variables Fisiológicas
en Semillas de Mano de León *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus***

TESIS

DOCTORADO EN CIENCIAS

ANA NALLELY CERON ORTIZ

ENSENADA BAJA CFA, MEXICO JULIO DE 2006

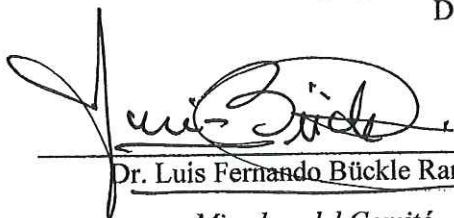
TESIS DEFENDIDA POR

ANA NALLELY CERÓN ORTIZ

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Director del Comité



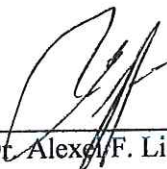
Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez
Miembro del Comité



Dra. Carmen Paniagua Chávez
Miembro del Comité



Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Miembro del Comité



Dr. Alexei F. Licea Navarro
Coordinador del Programa de Posgrado



Dr. Raúl Ramón Castro Escamilla
Director de Estudios de Posgrado

13 de Julio de 2006

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA**

**EFFECTO INTERACTIVO DE LA TEMPERATURA Y LA CALIDAD
NUTRIMENTAL DE MICROALGAS SOBRE ALGUNAS VARIABLES
FISIOLÓGICAS EN SEMILLAS DE MANO DE LEÓN *Lyropecten (Nodipecten)*
subnodosus.**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

ANA NALLELY CERÓN ORTIZ

Ensenada, Baja California, México, Julio del 2006.

RESUMEN de la tesis presentada por **Ana Nallely Cerón Ortiz** como requerimiento parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en ACUICULTURA. Ensenada, Baja California, México. Julio 2006.

EFFECTO INTERACTIVO DE LA TEMPERATURA Y LA CALIDAD NUTRIMENTAL DE MICROALGAS SOBRE ALGUNAS VARIABLES FISIOLÓGICAS EN SEMILLAS DE MANO DE LEÓN *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus*.

Resumen aprobado por:


Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Directora de Tesis

La almeja mano de león *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus* es un representante de la clase bivalvia con gran proyección acuicultural y comercial. Sin embargo, pocos han sido los estudios enfocados a conocer el efecto de las variables ambientales sobre el crecimiento y supervivencia en la etapa de semilla de esta especie. En el presente estudio se evaluó el efecto interactivo de la temperatura (23, 26 y 29 °C) y la calidad nutricional de tres dietas bialgales (M1: *Pavlova lutheri*-*Chaetoceros calcitrans*; M2: *Pavlova lutheri*-*Isochrysis* sp.; M3: *Isochrysis* sp.-*Chaetoceros calcitrans*) sobre el crecimiento y supervivencia de semillas de *L. (N.) subnodosus*. La tasa de filtración se evaluó con tres distintas raciones de alimento (100,000; 200,000 y 400,000 cél·ml⁻¹). Los resultados obtenidos mostraron las mayores tasas de filtración durante las primeras horas, disminuyendo a través del tiempo independientemente de la ración. Sin embargo, se observó una ausencia total de alimento después de la quinta hora en la ración de 100,000 cél·ml⁻¹ y la presencia de alimento remanente y producción de pseudoheces en la ración de 400,000 cél·ml⁻¹. Por lo anterior, se seleccionó la ración de 200,000 cél·ml⁻¹ para los ensayos de alimentación. Mortalidades superiores al 70 % fueron registradas durante las dos primeras semanas en los organismos mantenidos a 29 °C, lo cual indica que semillas de *L. (N.) subnodosus* no son capaces de regular sus funciones metabólicas en esta temperatura. Los resultados obtenidos en el primer ensayo de alimentación resultaron con los mejores crecimientos en las semillas alimentadas con la dieta M1 en las temperaturas de 23 y 26 °C, apoyando el hecho de que en un intervalo óptimo de temperaturas, la calidad nutricional de las dietas tiene el efecto principal sobre el crecimiento y supervivencia en esta especie. Sin embargo, estos resultados registraron una discrepancia con los obtenidos en el segundo ensayo con respecto a las dietas. Debido a que en este último los mayores resultados en crecimiento y supervivencia se obtuvieron en los organismos alimentados con M3 en ambas temperaturas, esto se relaciona a las diferencias en densidad entre los cultivos, debido a una mayor mortalidad al inicio del experimento en los organismos alimentados con M3 en ambas temperaturas (23 y 26 °C), confirmándose posteriormente, a través de un tercer ensayo. Los valores obtenidos en las tasas de consumo de oxígeno y de excreción de amonio en las semillas de *L. (N.) subnodosus* mostraron un efecto significativo entre las dietas y las

temperaturas (23 y 26 °C). Los resultados de la razón O:N obtenidos en los dos ensayos de alimentación varían de una semana a otra, registrando la tendencia a incrementar a través del tiempo. Los valores obtenidos en los diferentes tratamientos indican el uso de proteínas como sustrato principal en la obtención de energía para el crecimiento.

Palabras clave: Microalgas, dietas, *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus*, Composición Bioquímica, Variables fisiológicas.

ABSTRACT of the thesis presented by **Ana Nallely Cerón Ortiz** as a partial requirement to obtain the DOCTOR OF SCIENCE degree in AQUACULTURE. Ensenada, Baja California, Mexico. July 2006.

INTERACTIVE EFFECT OF TEMPERATURE AND NUTRITIONAL QUALITY OF
MICROALGAE ON SOME PHYSIOLOGICAL VARIABLES OF SPATS OF LION'S
HAND CLAM *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus*.

The lion's hand clam *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus* is a bivalve with an important aquaculture projection and commercial value due to its rapid growth and the good market of its adductor muscle. However, few studies had been performed to know the effect of the environmental variables on the growth and survival of lion's hand clam spats. In this work, the interactive effect between the temperature (23, 26 and 29 °C) and nutritional quality of three microalgae diets (M1: *Pavlova lutheri* - *Chaetoceros calcitrans*; M2: *Pavlova lutheri* - *Isochrysis* sp.; M3: *Isochrysis* sp. - *Chaetoceros calcitrans*) on the growth and survival were evaluated in spats. The filtration rates were evaluated at three different concentration of food (100,000; 200,000 and 400,000 cell·mL⁻¹). The highest filtration rates were obtained at the first hours after supplying the food, subsequently, decreased through time independently of the initial concentration. A total absence of food were registered after five hours in the spats fed with 100,000 cell·mL⁻¹. Spats fed with microalgae at 400,000 cell·mL⁻¹ produced pseudofeces. This treatment had the highest remanent food. Thus, the concentration of 200,000 cell mL⁻¹ was selected as the optimal concentration for the feeding experiments with the three diets of microalgae. In the experiment with temperature of 29 °C, higher mortalities (~70 %) were registered during the first week of culture. This indicated that *L. (N.) subnodosus* spats were no able to regulate they metabolic functions in this temperature. The best results of growth in the first experiment were registered in spats fed with M1 and maintained at 23 and 26 °C. This indicated that these temperatures are in the optimum range for this species. The nutritional quality of the diet had a principal effect on growth and survival compared to temperature. However, these results were different in the second feeding experiment. In the second feeding experiment, the highest growth was registered in the spats fed with M3 in both temperatures. The last results are due to the differences in densities among cultures, where higher mortalities were registered in the organism fed with M3 at 23 and 26 °C during the first weeks of experimentation. These results were confirmed in the third experiment. Significant differences were found in oxygen consumption and ammonia excretion in spats growth at different temperatures (23 and 26 °C) and diets. Oxygen-nitrogen ratio (O:N) had a tendency to increase through time. The O:N values indicate that *L. (N.) subnodosus* spats used proteins as principal substrate to obtain energy for somatic growth

Keywords: Microalgae, Diets, *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus*, Biochemical Composition, Physiological Variables.

DEDICATORIA

A mis padres Julita y Nazario por su apoyo
en las decisiones más importantes de mi vida.

A mis hermanos Hilda, Nazario y Cesar
por su confianza y apoyo.

A mis hijos, Jorge y Samanta por ser
el motor principal en mi vida

A mi esposo Gabriel por su comprensión
y ayuda.

A mis amigos por sus muestras
de afecto y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a mi directora de tesis Dra. Beatriz Cordero quien me apoyó y dirigió con paciencia y dedicación a través de la duración de mi Doctorado.

Al Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez, por su interés y apoyo en este trabajo, así como sus observaciones y sugerencias, las cuales fueron de gran importancia.

A la Dra. Carmen Paniagua Chávez, por su tiempo e interés en la elaboración de mi tesis, así como sus observaciones y sugerencia para la retroalimentación de mi trabajo.

A la Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega, quien me dirigió con paciencia y dedicación en la elaboración de una parte esencial de mi tesis.

A mis padres y hermanos, quienes me impulsaron y alentaron en todo momento para la culminación en esta etapa de mi desarrollo profesional.

A mis hijos, por el simple y sencillo hecho de existir, quienes con sus sonrisas y abrazos me impulsaron día a día.

A mi esposo Gabriel López Sánchez, por su apoyo durante la realización de mi tesis, porque siempre supo darme palabras de aliento y cariño cuando sentí caer, por entender y respetar mis aspiraciones.

A las familias Flores Ascencio, Urías Román y Ochoa Fraire, quienes me brindaron siempre una amistad sincera y sin reservas, con quienes disfruté grandes momentos de mi vida y por los cuales agradeceré a Dios toda en todo momento por ponerlos en mi camino.

A los técnicos del Departamento de Acuicultura: Norberto Flores, José Espinosa, Francisco Valenzuela, Adrián Celaya y Luis Murillo, quienes me apoyaron durante la parte experimental de mi tesis, al mantener siempre en funcionamiento las condiciones controladas del laboratorio húmedo.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por el apoyo brindado para mi formación académica y el desarrollo de la tesis de doctorado a través de los proyectos de investigación 6360 y 6912.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme favorecido a través de su Sistema de Becas para llevar a cabo mis estudios de Doctorado.

CONTENIDO

Página

I.- INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	12
II.1 Objetivo general	12
II.2 Objetivos específicos	12
III. HIPÓTESIS.....	13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	13
IV.1 MICROALGAS.....	13
IV.1.1 Cultivo de microalgas.....	13
IV.1.2 Determinación de biomasa.....	14
IV.1.3 Composición bioquímica.....	15
IV.1.4 Ácidos grasos.....	15
IV.2 Cultivo de <i>Lyropecten (Nodipecten) subnodosus</i> (primero y segundo experimento).....	16
IV.2.1 Obtención y acondicionamiento de semillas.....	16
IV.2.2 Ración alimenticia y tasa de filtración.....	18
IV.2.3 Alimentación.....	19
IV.2.4 Mediciones de crecimiento.....	21
IV.3 Consumo de oxígeno y excreción de amonio.....	22
IV.4 Efecto de la densidad de organismos en el cultivo (tercer experimento)	25
IV.5 Análisis estadístico.....	27
V. RESULTADOS.....	28
V.1 Cultivo de microalgas.....	28
V.1.1 Sistema semicontinuo.....	28
V.1.1.1 Peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO).....	30
V.1.1.2 Composición bioquímica.....	31
V.2 Mezclas.....	34
V.2.1 Peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO).....	34
V.2.2 Composición bioquímica.....	34

CONTENIDO (continuación)

Página

V.3 Cultivo de <i>L. (N.) subnodosus</i>	36
V.3.1 Tasa de filtración y Ración alimenticia.....	38
V.3.2 Crecimiento de <i>L. (N.) subnodosus</i>	42
V.3.2.1 Longitud y ancho de la concha.....	42
V.3.2.2 Peso húmedo, peso seco total y peso seco orgánico.....	45
V.3.2.3 Tasa de crecimiento (k) y supervivencia.....	48
V.3.2.4 Composición bioquímica de <i>L. (N.) subnodosus</i>	50
V.3.2.5 Producción de amonio, consumo de oxígeno y razón O:N	55
VI. DISCUSIÓN.....	62
VII. CONCLUSIONES.....	85
LITERATURA CITADA.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sistema cerrado con inyección de aire constante usado en el cultivo de <i>L. (N.) subnodosus</i> durante los experimentos de alimentación y crecimiento.....	18
2	Diseño experimental usado en el cultivo de <i>L. (N.) subnodosus</i> durante el primer experimento de alimentación y crecimiento.	20
3	Diseño experimental usado en el cultivo de <i>L. (N.) subnodosus</i> durante el segundo experimento de alimentación y crecimiento.....	21
4	Respirómetro semi-abierto provisto con cámaras respirométricas de 50 ml (B) usado en la medición del consumo de oxígeno y excreción de amonio de <i>L. (N.) subnodosus</i>	24
5	Diseño experimental usado en el cultivo de <i>L. (N.) subnodosus</i> durante el experimento de alimentación y densidad.....	26
6	Número de células ($\times 10^6$ cél. $\cdot$ ml $^{-1}$) de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp. (A), <i>Pavlova lutheri</i> (B) y <i>Chaetoceros calcitrans</i> (C) mantenidas en sistema semicontinuo. Datos promedio del primero y segundo experimento.....	29
7	Tasas de filtración (T.F en L $\cdot$ h $\cdot$ org $^{-1}$) de la almeja mano de león <i>L. (N.) subnodosus</i> alimentada con tres mezclas de microalgas y mantenida a 23 °C. M1: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Isochrysis</i> sp.; M2: <i>Chaetoceros calcitrans</i> – <i>Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Pavlova lutheri</i> – <i>Chaetoceros calcitrans</i> . Raciones alimenticias: 100,000; 200,000 y 400,000 cél. $\cdot$ ml $^{-1}$. Primer experimento (A) y segundo experimento (B).....	39

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
8	Tasas de filtración (T.F en $L \cdot h^{-1} \cdot org^{-1}$) de la almeja mano de león <i>L. (N.) subnodosus</i> alimentada con tres mezclas de microalgas y mantenida a 26 °C. M1: <i>Pavlova lutheri-Isochrysis</i> sp.; M2: <i>Chaetoceros calcitrans-Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Pavlova lutheri-Chaetoceros calcitrans</i> . Raciones alimenticias: 100,000; 200,000 y 400,000 $cél \cdot ml^{-1}$. Primer experimento (A) y segundo experimento (B).....	40
9	Tasas de filtración (T.F en $L \cdot h^{-1} \cdot org^{-1}$) de la almeja mano de león <i>L. (N.) subnodosus</i> alimentada con tres mezclas de microalgas y mantenida a 29 °C. M1: <i>Pavlova lutheri-Isochrysis</i> sp.; M2: <i>Chaetoceros calcitrans-Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Pavlova lutheri-Chaetoceros calcitrans</i> . Raciones alimenticias: 100,000; 200,000 y 400,000 $cél \cdot ml^{-1}$. Segundo experimento.....	41

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla</i>	<i>Página</i>
I Tasa de crecimiento (μ) promedio (desviación estándar entre paréntesis) en tres especies de microalgas mantenidas en sistema estático. Datos del primero y segundo experimento.....	30
II Peso seco total (PST) en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, peso seco orgánico (PSO) en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y porcentaje de cenizas de tres especies de microalgas mantenidas en sistema semicontinuo. ISO: <i>Isochrysis</i> sp.; PA: <i>Pavlova lutheri</i> ; CH: <i>Chaetoceros calcitrans</i> . Datos promedio del primero y segundo experimento. Desviación estándar entre paréntesis.....	31
III Porcentaje de proteínas, carbohidratos y lípidos en base a peso seco orgánico de tres especies de microalgas en sistema semicontinuo. ISO: <i>Isochrysis</i> sp.; PA: <i>Pavlova lutheri</i> ; CH: <i>Chaetoceros calcitrans</i> . Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ($P < 0.05$). $a > b > c$. Datos promedio del primero y segundo experimento. Desviación estándar entre paréntesis.....	33
IV Porcentaje total promedio de ácidos grasos de tres microalgas mantenidas en sistema semicontinuo. ISO: <i>Isochrysis</i> sp.; PA: <i>Pavlova lutheri</i> ; CH: <i>Chaetoceros calcitrans</i> . Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ($P < 0.05$). $a > b > c$. Datos promedio del primero y segundo experimento.....	33
V Peso seco total (PST) en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, peso seco orgánico (PSO) en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y porcentaje de cenizas de tres mezclas de microalgas utilizadas en la alimentación de <i>L. (N.) subnodosus</i> . (M1: <i>Pavlova lutheri</i> – <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M2: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Isochrysis</i> sp. – <i>Chaetoceros calcitrans</i>). Datos promedio del primero y segundo experimento. Desviación estándar entre paréntesis.....	34
VI Porcentaje de proteínas, carbohidratos y lípidos en base a peso seco orgánico (PSO) de tres mezclas de microalgas utilizadas en la alimentación de <i>L. (N.) subnodosus</i> (M1: <i>Pavlova lutheri</i> – <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M2: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Isochrysis</i> sp. – <i>Chaetoceros calcitrans</i>). Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ($P < 0.05$). $a > b > c$. Datos promedio del primero y segundo experimento. Desviación estándar entre paréntesis.....	35

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla	Página
VII Porcentaje total de ácidos grasos de tres mezclas de microalgas utilizadas en la alimentación de <i>L. (N.) subnodosus</i> . M1: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M2: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Isochrysis</i> sp- <i>Chaetoceros calcitrans</i> . Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ($P < 0.05$). $a > b > c$. Datos promedio del primero y segundo experimento.....	37
VIII Promedio final de longitud (L) y ancho (A) de la concha (en mm), de <i>L. (N.) subnodosus</i> alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: <i>Pavlova lutheri</i> – <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M2: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Isochrysis</i> sp. – <i>Chaetoceros calcitrans</i>) y mantenida en dos temperaturas. Primer experimento. Los valores correspondientes al mismo parámetro con diferentes letras en la misma columna y línea muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). Desviación estándar entre paréntesis. Longitud inicial = 3 mm	42
IX Promedio final de longitud (L) y ancho (A) de la concha en mm de <i>L. (N.) subnodosus</i> alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: <i>Pavlova lutheri</i> – <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M2: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Isochrysis</i> sp. – <i>Chaetoceros calcitrans</i>) y mantenida en tres temperaturas (23, 26 y 29 °C). Segundo experimento. Los valores correspondientes al mismo parámetro con diferentes letras en la misma columna y línea muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). Desviación estándar entre paréntesis. Longitud inicial 4 mm	44
X Promedio final de longitud (L) y ancho (A) de la concha en mm de <i>L. (N.) subnodosus</i> alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: <i>Pavlova lutheri</i> – <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M2: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Isochrysis</i> sp. – <i>Chaetoceros calcitrans</i>) y mantenida a 23 °C en tres diferentes densidades ($D_1=40$, $D_2=80$ y $D_3=120$ organismos). Tercer experimento. Los valores correspondientes al mismo parámetro con diferentes letras en la misma columna y línea muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). Desviación estándar entre paréntesis. Longitud inicial 3.77 mm	44

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		Página
XI	Promedio final de peso húmedo (PH), peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO) en mg de <i>L. (N.) subnodosus</i> alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: <i>Pavlova lutheri</i> – <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M2: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Isochrysis</i> sp. – <i>Chaetoceros calcitrans</i>) y mantenida en dos temperaturas. Primer experimento. Los valores correspondientes al mismo parámetro con diferentes letras en la misma columna y línea muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). $PH_{inicial}$: 8 mg, $PST_{inicial}$: 4 mg y $PSO_{inicial}$: 2 mg. Desviación estándar entre paréntesis.....	45
XII	Promedio final de peso húmedo (PH), peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO) en mg de <i>L. (N.) subnodosus</i> alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: <i>Pavlova lutheri</i> – <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M2: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Isochrysis</i> sp. – <i>Chaetoceros calcitrans</i>) y mantenida en tres temperaturas. Segundo experimento. Los valores correspondientes al mismo parámetro con diferentes letras en la misma columna y línea muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). $PH_{inicial}$: 5 mg, $PST_{inicial}$: 3 mg y $PSO_{inicial}$: 0.4 mg. Desviación estándar entre paréntesis.....	46
XIII	Promedio final de peso húmedo (PH), peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO) en mg de <i>L. (N.) subnodosus</i> alimentada con tres mezclas algales (M1: <i>Pavlova lutheri</i> – <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M3: <i>Isochrysis</i> sp. – <i>Chaetoceros calcitrans</i>) y mantenida a 23 °C en tres diferentes densidades ($D_1=40$, $D_2=80$ y $D_3=120$ organismos). Tercer experimento. Los valores correspondientes al mismo parámetro con diferentes letras en la misma columna y línea muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). $PH_{inicial}$: 6.73 mg, $PST_{inicial}$: 4.11 mg y $PSO_{inicial}$: 0.51 mg. Desviación estándar entre paréntesis.....	47

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		Página
XIV	Porcentaje de supervivencia (S) y tasa de crecimiento (k), en base al peso orgánico, expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ de <i>L. (N.) subnodosus</i> alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: <i>Pavlova lutheri</i> – <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M2: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Isochrysis</i> sp. – <i>Chaetoceros calcitrans</i>) y mantenida en dos temperaturas. Primer experimento.....	48
XV	Porcentaje de supervivencia (S) y tasa de crecimiento (k), en base a peso orgánico, expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ de <i>L. (N.) subnodosus</i> alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: <i>Pavlova lutheri</i> – <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M2: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Isochrysis</i> sp. – <i>Chaetoceros calcitrans</i>) y mantenida en tres temperaturas. Segundo experimento.....	49
XVI	Porcentaje de supervivencia y tasa de crecimiento (k), en base a peso orgánico, expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ de <i>L. (N.) subnodosus</i> cultivada a 23 °C en tres diferentes densidades ($D_1=40$, $D_2=80$ y $D_3=120$ organismos) y alimentada con dos mezclas de microalgas (M1: <i>Pavlova lutheri</i> – <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M3: <i>Isochrysis</i> sp. – <i>Chaetoceros calcitrans</i>). Tercer experimento.....	50
XVII	Porcentaje inicial y final de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C) con base a peso seco orgánico de la almeja mano de león <i>L. (N.) subnodosus</i> alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M2: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Chaetoceros calcitrans</i>) y mantenida en dos temperaturas. Diferentes letras en la misma línea indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Segundo experimento. Desviación estándar entre paréntesis.. ..	53
XVIII	Porcentaje inicial y final del total de ácidos grasos de la almeja mano de león <i>L. (N.) subnodosus</i> alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M2: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Chaetoceros calcitrans</i>) y mantenidas en dos temperaturas. Diferentes letras en la misma línea indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Segundo experimento.....	54

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		Página
XIX	Producción de amonio ($\mu\text{gNH}_4\cdot\text{h}^{-1}$) en base al peso seco total (PST) y peso seco orgánico de la almeja mano de león <i>L. (N.) subnodosus</i> alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: <i>Pavlova lutheri</i> – <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M2: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Isochrysis</i> sp. – <i>Chaetoceros calcitrans</i>) y mantenida en diferentes temperaturas (23, 26 y 29 °C). Primer experimento (A) y segundo experimento (B). Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas ($P \leq 0.05$). $a>b>c>d$. Desviación estándar entre paréntesis.....	59
XX	Consumo de oxígeno ($\text{mlO}_2\cdot\text{h}^{-1}$) en base al peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO) de la almeja mano de león <i>L. (N.) subnodosus</i> alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: <i>Pavlova lutheri</i> – <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M2: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Isochrysis</i> sp. – <i>Chaetoceros calcitrans</i>) y mantenida en diferentes temperaturas (23, 26 y 29 °C). Primer experimento (A) y segundo experimento (B). Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas ($P \leq 0.05$). $a>b>c>d$. Desviación estándar entre paréntesis.....	60
XXI	Razón O:N en base al peso seco total de la almeja mano de león <i>L. (N.) subnodosus</i> alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: <i>Pavlova lutheri</i> – <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; M2: <i>Pavlova lutheri</i> - <i>Isochrysis</i> sp.; M3: <i>Isochrysis</i> sp. – <i>Chaetoceros calcitrans</i>) y mantenida en diferentes temperaturas (23, 26 y 29 °C). Primer experimento (A) y segundo experimento (B). Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas ($P \leq 0.05$). $a>b>c>d$. Desviación estándar entre paréntesis.....	61

Efecto interactivo de la temperatura y la calidad nutrimental de microalgas sobre algunas variables fisiológicas en semillas de mano de león *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus*.

I. INTRODUCCION

Las microalgas son organismos cosmopolitas con una gran adaptabilidad a distintas condiciones ambientales, siempre y cuando existan una fuente de carbono y nutrientes esenciales para su óptimo desarrollo (Shelef y Soeder, 1980; Tomaselli, 2004). Estos microorganismos son ampliamente utilizados en distintos campos de la industria y de la medicina; sobre todo por contener diversos compuestos importantes como lo son las vitaminas, proteínas y ácidos grasos entre otros (Chisti 2000; Shimizu 2000; Andersen, 2005). Sin embargo, uno de los campos en donde han tenido mayor auge es en la acuicultura, donde forman parte de la alimentación de un amplio número de organismos acuáticos (Wikfors, 1986; Muller-Feuga, 2004).

Debido a su función como principal alimento en la mayoría de las etapas de desarrollo de moluscos, en los primeros estadios de algunos crustáceos y peces; el cultivo de microalgas forma una parte fundamental en los laboratorios y granjas dedicados a la producción de estos organismos (Brown *et al.*, 1998; Muller-Feuga *et al.*, 2003, Zmora y Richmond, 2004).

Dentro de las principales características que deben ser tomadas en cuenta durante la elección de una especie de microalga, se encuentra el tamaño, la digestibilidad y el valor nutricional; esto para asegurar que se cubran los requerimientos específicos del organismo a alimentar (Albentosa *et al.*, 1996; Bougrier *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1998).

Sin embargo, no es posible generalizar el hecho de que una microalga considerada como buen alimento para una especie cubra los requerimientos nutricionales de otra; por lo cual se deben desarrollar estudios acerca del efecto que tienen cada una de las especies de microalgas al ser utilizadas como alimento en un organismo en particular (Brown *et al.*, 1998).

La capacidad del organismo para ingerir y asimilar el alimento, junto con la composición bioquímica de las microalgas son los elementos que proporcionan la calidad nutricional del alimento. La composición bioquímica puede variar durante el cultivo dependiendo de diversos factores como el fotoperiodo, la intensidad de luz, la temperatura, el tipo de nutrientes (medio de cultivo), la tasa de dilución y la fase de crecimiento cuando es cosechada (Brown *et al.*, 1989; Sukenik y Wahnnon, 1991; Tonon *et al.*, 2002). Debido a lo anterior, es necesario conocer y controlar estos factores con el propósito de mantener una composición bioquímica constante y asegurar con ello una adecuada calidad nutricional que satisfaga los requerimientos nutricionales de los organismos (Cordero y Voltolina, 1994).

Los requerimientos nutricionales de los organismos varían a través de las distintas etapas de su desarrollo; por ejemplo, en la etapa de semilla es importante la aportación de elevados porcentajes de proteínas y cuando los organismos se encuentran en la etapa de reproducción la demanda de proteínas disminuye y aumenta los requerimientos de lípidos (Uriarte y Farías, 1999). Las diferentes demandas de los componentes bioquímicos en las distintas fases de crecimiento de un organismo han fomentado el estudio de la importancia de cada uno de ellos durante el cultivo. Uno de los principales componentes que repercuten de manera importante en el crecimiento y la supervivencia son los lípidos principalmente

los ácidos grasos, así como su relación con las proteínas (Fidalgo *et al.*, 1998). Es por ello que se debe tomar en cuenta que el crecimiento de los organismos no puede ser explicado simplemente por el contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos, sino que el conjunto de estos tres componentes determinan el valor dietario total del alimento (Nikos y Lucas, 2000a).

Los lípidos, son fuentes energéticas y metabolitos específicos esenciales para el crecimiento de los organismos. El aspecto más importante de estos constituyentes bioquímicos en la nutrición es el contenido y la proporción de ciertos ácidos grasos esenciales, así como su repercusión en el crecimiento, supervivencia, constitución de la pared celular y maduración en la mayoría de los organismos (Fidalgo *et al.*, 1998). Dentro de estos se encuentra el grupo de los poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés), entre los que destacan los ácidos eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω 3) y docosahexaenoico (DHA, 22:6 ω 3) (Kinsella, 1990; D'Abramo y Sheen, 1993; Sukenik *et al.*, 1994). Sin embargo, los requerimientos de ciertos grupos de ácidos grasos varían dependiendo de la especie de organismos (Webb y Chu, 1982; Caers *et al.*, 1999).

Algunos de los ácidos grasos son considerados esenciales debido al hecho de que algunos de ellos no pueden ser sintetizados en forma natural por el organismo; o bien la síntesis de estos compuestos no es en cantidad suficiente para el buen desempeño de las diferentes funciones del animal (Volkman *et al.*, 1992; Dunstan *et al.*, 1992). Al igual que el contenido de proteínas y carbohidratos, la proporción de ácidos grasos en las microalgas varía dependiendo de las condiciones de cultivo (Sukenik *et al.*, 1993).

Para elevar la calidad nutricional del alimento que se utiliza en el cultivo de organismos acuáticos, se ha sugerido el uso de dietas compuestas de más de una microalga, debido a que los componentes bioquímicos presentes en la mezcla de microalgas se complementan enriqueciendo con ello su valor nutricional (Fidalgo *et al.*, 1998; Southgate *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2000; Phatarpekar *et al.*, 2000).

El principal propósito de elevar el valor nutricional de las dietas para que puedan satisfacer los requerimientos nutricionales es su eficiencia sobre el crecimiento de los organismos (Fidalgo *et al.*, 1994), el cual se presenta cuando existe un balance energético positivo, esto es cuando la energía es asimilada y una porción de ella es utilizada para síntesis de tejido con lo que se incrementa el peso corporal de los organismos (Yantian y Blake, 1996).

Debido a la gran importancia que presenta la energía incorporada por el organismo a través del alimento ingerido y las diferentes direcciones que toma para satisfacer los requerimientos energéticos de los distintos procesos metabólicos o fisiológicos, la medición del flujo y gasto de energía por medio de un balance energético es necesario en los experimentos de crecimiento y alimentación (Thompson *et al.*, 1994; Bougrier *et al.*, 1997, Haure *et al.*, 1998).

Los moluscos son probablemente los animales más diversos en forma y fisiología que otros invertebrados, la tasa metabólica difiere ampliamente de un grupo a otro, sin embargo, las variaciones que se presentan entre una misma especie son el resultado de la interacción de factores intrínsecos y extrínsecos. Por lo tanto, para la obtención de la tasa metabólica de una misma especie, es necesario que se realicen en organismos con el mismo

sexo, edad, talla del cuerpo y bajo las mismas condiciones de cultivo, con el propósito de poder realizar comparaciones posteriores (Ghiretti, 1966).

Dentro de los factores extrínsecos se encuentra la temperatura la cual incrementa o disminuye el gasto de energía, debido a que acelera o retrasa muchos procesos fisiológicos como la actividad alimenticia y el crecimiento (Hoffman, 1983; Albentosa *et al.*, 1994a; Bougrier *et al.*, 1995; Haure *et al.*, 1998). La cantidad y presentación del alimento también afectan ciertos procesos fisiológicos; Albentosa *et al.* (1997) observaron un incremento en la tasa de ingestión en semillas de *Ruditapes decussatus* alimentadas con elevadas concentraciones de microalga secas. Resultados similares fueron obtenidos por Riisgard y Randlov (1981) con *Mytilus edulis*. Lo anterior puede deberse al hecho de que la glándula digestiva principal se satura y como consecuencia una mayor cantidad de alimento es eliminado en forma de heces canalizando la energía que podía utilizarse en el crecimiento a la producción de pseudoheces (Griffiths and Griffiths, 1987).

Una de las funciones fisiológicas que tienen gran importancia en el conocimiento del balance energético es el consumo de oxígeno debido al hecho de que su medición representa una pérdida importante de la energía proporcionada por el alimento (Lu *et al.*, 1999). Este gasto puede incrementarse cuando el organismo no se encuentra en las condiciones óptimas para el desarrollo de sus funciones fisiológicas, lo cual trae como consecuencia un estado de estrés que influye en un mayor gasto energético y por ende en una disminución en el crecimiento del organismo. Se ha observado que la tasa de respiración en los bivalvos tiene una gran variabilidad entre las especies aún en condiciones similares. El consumo de oxígeno en especies de este grupo representa el producto de dos factores: el volumen de ventilación y la cantidad de gas disuelto en cada litro de agua.

La disponibilidad de alimento también afecta el consumo de oxígeno, se ha observado que en periodos en los que el alimento disponible es poco o nulo la tasa de consumo de oxígeno disminuye (Guiretti, 1966). El metabolismo oxidativo se puede expresar en tres términos: el consumo de oxígeno, la cantidad de CO₂ liberado o con la tasa de excreción amoniacal (Lu *et al*, 1999). Esta última, es un proceso fisiológico que consume energía para su realización y que es importante tomar en cuenta al momento de realizar un balance energético. El efecto principal de altos contenidos de amonio en su forma no ionizada (NH₃) en los cultivos de la mayoría de los organismos acuáticos es la muerte del mismo. Lo anterior ha sido registrado por Wang *et al*. (2003) en estanques de camarón. En la mayoría de los bivalvos, el amonio es el principal producto final del catabolismo protéico, comprendido entre el 41 y el 94 % de la excreción nitrogenada total (Widdows, 1978a; Griffiths y Griffiths, 1987; Lu *et al*., 1999). En relación a la excreción amoniacal, el valor obtenido puede ser afectado por factores externos; por ejemplo, la temperatura, la latitud, la especie, la talla y el peso (Bayne, 1973b; Widdows, 1978a; Navarro y Winter, 1982).

La producción de amonio y el consumo de oxígeno parecen estar relacionados con las condiciones fisiológicas y reproductivas del organismo principalmente por el efecto de la temperatura (Bayne, 1973b; Widdows, 1978b), en el otoño y cerca del invierno la excreción de amonio es mínima durante el periodo de gametogénesis e incrementa en primavera y verano cuando el organismo mantiene los gametos maduros en el manto. Esto refleja un marcado cambio estacional con relación a los carbohidratos como la principal reserva energética en otoño e invierno y de las proteínas en primavera-verano (Widdows, 1978a).

La excreción de amonio y el consumo de oxígeno son dos funciones ampliamente ligadas debido al hecho de que son utilizados como indicadores de estrés, ocasionado por el hecho de mantener a los organismos en condiciones no óptimas para ellos (Díaz-Herrera *et al.*, 1992). Como resultado a lo anterior existe una razón expresada como O: N (razón atómica oxígeno: nitrógeno); su importancia radica en el hecho de que sirve como indicador del balance en los tejidos animales entre la tasa de catabolismo del sustrato energético de proteínas, carbohidratos y lípidos. Dependiendo del valor obtenido en esta razón indica el sustrato metabólico utilizado, valores bajos en esta relación indican que se está catabolizando principalmente proteínas, mientras que un valor alto señala la utilización de carbohidratos y/o lípidos (Bayne, 1973a; Mayzaud y Conover, 1988).

Existen otros factores que afectan el crecimiento y el aporte de energía de los organismos los cuales deben ser tomados en cuenta dentro de los estudios de crecimiento y balance energético; dos de estos parámetros que afectan y toman parte en el momento de la evaluación y comparación de resultados son la ración alimenticia y la tasa de filtración (Caers *et al.*, 1999). El entendimiento de los requerimientos energéticos de los moluscos bivalvos necesita el conocimiento de la ración que es ingerida y la eficiencia con la cual la energía proporcionada por el alimento en cierta ración es destinada para el crecimiento (Langton *et al.*, 1977).

La tasa de filtración es un parámetro ampliamente estudiado en organismos filtradores como lo son los moluscos bivalvos, sin embargo, los resultados obtenidos acerca de la tasa de filtración aún causa controversia debido al uso de diferentes métodos y a la existencia de distintos factores que pueden ocasionar una subestimación de los resultados (Riisgard, 1991). Dentro de los factores que afectan la tasa de filtración se encuentran la

especie, la talla, la edad, la temperatura, las corrientes, el sustrato, las condiciones hidrodinámicas, la concentración de alimento y la fase en que se cosecha la microalga utilizada para alimento (Griffiths, 1980; Cole *et al.*, 1992; Albentosa *et al.*, 1994b).

La concentración de alimento que se proporciona al organismo influye de gran manera en la cuantificación de la tasa de filtración, debido a que se ha observado una relación inversa entre esta tasa y la concentración de alimento lo cual ha sido interpretado como un mecanismo regulador que controla la tasa de filtración hasta un punto en que permanece constante (Winter, 1973; Navarro y Winter, 1982; Sprung y Rose 1988). En general, la tasa de filtración después de proporcionado el alimento al organismo disminuye a través de tiempo (Ulrik, 1991). Sin embargo, esta reducción e incluso pequeñas variaciones en ella pueden presentarse debido a un posible estrés lo que ocasiona un cierre parcial de sus valvas y como consecuencia una reducción en la tasa de filtración. Riisgard (1991) ha considerado este comportamiento un efecto secundario en el mejillón azul *Mytilus edulis* como respuesta a condiciones no óptimas para el desarrollo del organismo.

Los valores obtenidos acerca de la tasa de filtración dependen de la especie y edad del organismo (Urban *et al.*, 1983; Lu y Blake, 1997). Se ha observado que la tasa de filtración en los moluscos bivalvos se incrementa en función de la edad indistintamente del alimento disponible (Navarro y Winter, 1982), ésto puede explicarse debido a que la capacidad de filtración de un organismo esté correlacionado con la superficie de sus branquias y de que estas estructuras aumentan su tamaño en relación el organismo incrementa en talla (Riisgard y Randlov, 1981; Araya *et al.*, 1993, Fidalgo *et al.*, 1998). La tasa de filtración se incrementa en relación a un aumento en la temperatura hasta un punto después del cual disminuye (Albentosa *et al.*, 1994a); esto puede explicarse debido a que la

viscosidad del agua disminuye con la temperatura lo cual puede incrementar la tasa de bombeo afectando la filtración (Jorgensen *et al.*, 1990).

Existen diferentes formas de expresar y describir la ración alimenticia en los moluscos bivalvos, pero generalmente se expresa como la ración del peso específico diario, número de células o porcentaje de peso seco del alga por peso vivo del organismo (Urban *et al.*, 1983). Al igual que la tasa de filtración, la ración alimenticia es afectada por diferentes factores que pueden llegar a sobreestimar la ración alimenticia considerada como óptima para ciertos organismos. Entre estos factores se encuentran la especie (Coutteau *et al.*, 1994), su estadio de crecimiento al momento del cultivo (Webb y Chu, 1982) y la cantidad de alimento disponible por organismo (Lu y Blake, 1997).

La importancia de proporcionar al organismo una ración óptima radica en el hecho de que la cantidad de alimento disponible es uno de los factores que puede llegar a afectar el crecimiento del organismo en cultivo (Lu y Blake, 1997). Además, el proporcionar a la mayoría de moluscos bivalvos grandes raciones alimenticias que no se consideran óptimas para ellos, tiene como consecuencia la producción de pseudoheces por parte de los organismos afectando con ello la calidad de agua del cultivo ocasionando el cierre parcial de las válvulas de alimentación produciendo con ello que la tasa de ingestión del alimento sea menor y esta situación repercutirá de forma negativa en el crecimiento (Mohlenberg y Riisgard, 1979). Una consecuencia más de proporcionar una ración no óptima al organismo es que la energía disponible para el crecimiento y reproducción es gastada en la producción de pseudoheces (Navarro y Winter, 1982). Debido a lo anterior, es necesario encontrar una ración alimenticia óptima que satisfaga los requerimientos del organismo sobre todo en aquellas especies de interés comercial.

Los bancos naturales de moluscos bivalvos continúan siendo explotados debido al elevado valor comercial de alguno de ellos y a los hábitos sedentarios que presentan algunos organismos pertenecientes a este grupo como lo son las escalopas (Rangel, 1990; Reyes, 1990), pertenecientes a la familia de los pectínidos, estas soportan importantes pesquerías en varias partes del mundo las cuales se han incrementando en años recientes, lo cual ha traído como consecuencia una sobrepesca y por ende una disminución en las poblaciones naturales (Reyes, 1986).

En el litoral del pacífico mexicano se encuentran 28 especies de pectínidos (Keen, 1971), de ellas tres son consideradas de gran importancia económica como lo son la almeja voladora *Pecten vogdesi*, la almeja catarina *Argopecten circularis* y almeja mano de león *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus* (Reyes, 1990; Baqueiro *et al.*, 1982).

La escalopa *L. (Nodipecten) subnodosus* es un molusco bivalvo con un elevado potencial acuicultural debido a sus características de crecimiento y a su elevado valor comercial (principalmente en Europa y Estados Unidos) (Racotta *et al.* 2003). En condiciones optimas de cultivo *L. (Nodipecten) subnodosus* ha registrado tasas de crecimiento anuales de 9 a 10 cm en largo de la concha y aproximadamente de 200 g en el peso de su músculo abductor (García-Pámanes, 1994; Parés-Sierra 1996).

El escaso conocimiento acerca de la biología y ecología de *L. (Nodipecten) subnodosus* se ha enfocado solamente en algunos estadios de su desarrollo. Sin embargo, algunos de los estadios toman una gran importancia en el cultivo de esta especie como son los estadios larvales y el momento de la metamorfosis; debido al alto índice de mortalidad que sucede en general a los organismos pertenecientes a esta especie. Actualmente, es sabido que durante la cría de larvas, los aspectos más importantes a tomar en cuenta son: el

efecto de las variables físicoquímicas como la temperatura y la salinidad, las condiciones del medio de cultivo, la densidad y la disponibilidad de alimento (Castagna y Kraeuter, 1981). Es importante mencionar que los requerimientos nutricionales y energéticos de larvas y semillas de *L. (N.) subnodosus* han sido escasamente evaluados.

Las investigaciones sobre la biología, reproducción y aplicación de nuevas técnicas para el cultivo en esta especie no han sido suficientes, por lo cual existe la necesidad de continuar con investigaciones principalmente en las especies de almejas que se han mencionado por diferentes autores como potenciales para la acuicultura y las cuales se encuentran en vías de ser sobreexplotadas. Además, es necesario incrementar estudios acerca de las diferentes etapas del desarrollo de estos organismos, ya que hasta el momento en algunas de las especies como *L. (N.) subnodosus* han sido enfocadas a la captación de semilla del medio natural con diferentes recolectores, a la preengorda y engorda en sistemas submarinos, o al estudio del ciclo reproductivo de estos organismos (Ruiz y Cáceres, 1991; García-Domínguez, *et al.*, 1992).

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo general

Determinar el efecto de diferentes dietas microalgales sobre algunos aspectos fisiológicos como el consumo de oxígeno, excreción amoniacal y el crecimiento de semillas de *L. (N.) subnodosus* cultivadas en diferentes temperaturas.

II.2 Objetivos específicos

- 1.- Evaluar la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos) en un sistema semicontinuo de tres especies de microalgas (*Isochrysis* sp., *Pavlova lutheri* y *Chaetoceros calcitrans*) y sus mezclas (M1: *Pavlova lutheri*-*Chaetoceros calcitrans*; M2: *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri*; M3: *Isochrysis* sp.-*Chaetoceros calcitrans*) proporcionadas como alimento a semillas de *L. (N.) subnodosus*.
- 2.- Conocer la tasa de filtración y la ración alimenticia óptima en semillas de *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas y cultivada en tres diferentes temperaturas (23, 26 y 29 °C).
- 3.- Evaluar la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos), el crecimiento y supervivencia en semillas de *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas y cultivadas en tres diferentes temperaturas.
- 4.- Estudiar el consumo de oxígeno y la excreción amoniacal en semillas de *L. (N.) subnodosus* cultivadas en tres diferentes temperaturas.
- 5.- Evaluar la razón atómica O: N de semillas de *L. (N.) subnodosus* cultivadas en tres diferentes temperaturas.

III. HIPÓTESIS

La temperatura y el valor nutricional de tres mezclas de microalgas influirá en el crecimiento de *L. (N.) subnodosus*.

IV. MATERIALES Y METODOS

IV.1 MICROALGAS

IV.1.1 Cultivo de microalgas

Las microalgas utilizadas en el presente trabajo fueron *Isochrysis* sp. (IS-XI), *Pavlova lutheri* (PA-LI) y *Chaetoceros calcitrans* (CH-CL) que se obtuvieron de la Colección de Microalgas del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

El cultivo de las microalgas se inició con inóculos sucesivos partiendo de 10 ml de cultivo y continuando con 100 ml, 2 litros y 15 litros. Las tres microalgas se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (20 °C), salinidad, pH (7.5-8, el cual se controló con inyección directa de CO₂ por 15 segundos) y luz continua proporcionada por lámparas fluorescentes (luz blanca fría de 75 Watts).

El agua de mar utilizada en los cultivos de microalgas se filtró a través de una serie de cartuchos de 10, 5 y 1 µm. En los cultivos de 10 ml hasta 2 litros, el agua de mar utilizada se esterilizó previamente en autoclave. El agua de mar en los cultivos de 15 l se esterilizó con 3 ml de cloro comercial por litro de agua durante 24 h y se le agregó tiosulfato de sodio en una proporción de 150 mg/l de agua de mar para la eliminación total del cloro, se proporciono aireación continua para ayudar al proceso; el aire circuló por

filtros con carbón activado para evitar contaminaciones posteriores. El medio de cultivo utilizado fue el medio “f/2” de Guillard y Ryther (1962), con silicatos para el caso de la microalga *C. calcitrans*.

IV.1.2 Determinación de biomasa.

El cultivo de las microalgas en volúmenes de 15 l se inició con inóculos de 200×10^3 cél·ml⁻¹ para cada cepa, se monitoreó diariamente la temperatura y el pH, así como el número de células. El recuento diario de número de células se realizó en un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad, adaptado con una reglilla. Inicialmente, los cultivos se mantuvieron en un sistema estático y una vez alcanzado el número de células seleccionado para los experimentos de alimentación (dentro de la fase de crecimiento exponencial tardío) se inicio el cultivo semicontinuo, y se aplicó una tasa de dilución del 20 % (determinada en experimentos preliminares). El recuento del número de células se realizó antes y después de la dilución. El medio utilizado para la renovación del cultivo en cada dilución fue el medio “f/2”.

Se recolectaron volúmenes conocidos de los cultivos semicontinuos (por triplicado) cada tercer día para determinar la biomasa en base a peso seco. Estos se filtraron a través de filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro, previamente lavados, incinerados en una mufla a 490 °C y pesados. Al filtrar las muestras se lavaron con formiato de amonio al 3% para la eliminación de sales. Los filtros con la muestra se colocaron en una estufa a 60 °C por 24 h para obtener el peso seco total (PST), posteriormente se calcinaron en una mufla por 12 h para la determinación de cenizas y por

diferencia entre el PST y las cenizas se obtuvo el peso seco orgánico (PSO) (Sorokin, 1973).

IV.1.3 Composición bioquímica

Los análisis bioquímicos de las microalgas producidas en los cultivos (proteínas, carbohidratos y lípidos) se realizaron por triplicado, para lo cual se filtraron volúmenes conocidos de cultivo en filtros Whatman GF/C de 25 mm de diámetro. Las técnicas utilizadas fueron: proteínas por el método de Lowry *et al.* (1951), los carbohidratos se analizaron por el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico de Dubois *et al.* (1956), los lípidos por el método de Pande *et al.* (1963), previa extracción con el método de Bligh y Dyer (1959). Para las curvas de calibración se usaron como estándares, albúmina de bovino en el caso de las proteínas, glucosa anhidra para los carbohidratos y tripalmitina para los lípidos.

IV.1.4 Ácidos grasos

Para el análisis de los ácidos grasos de la microalga, se tomaron por triplicado volúmenes conocidos de los cultivos cada tercer día. Las microalgas cosechadas se centrifugaron y lavaron con formiato de amonio al 3 % para la eliminación de sales. Las muestras obtenidas se almacenaron a -70 °C hasta su análisis.

La extracción de los lípidos se realizó por el método de Bligh y Dyer (1959). La fase lipídica se secó con nitrógeno gaseoso, posteriormente se le agregó el estándar interno (ácido triheptadecanoico, C_{17:0}), se sometió a metanólisis con 5 % de HCl en metanol durante 2.5 h en baño María a 85 °C (Sato y Murata, 1988). La extracción de los ácidos

grasos se realizó con hexano grado HPLC y la determinación por medio de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), HP G1800C GCD Series II..

La columna utilizada en el análisis es de tipo capilar, de sílice fundido, de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 mm de espesor de película (Omegawax TM 250).

Las condiciones del análisis fueron: 1 µl de volumen de inyección (como gas transportador se uso helio con pureza del 99.999 % y flujo de 0.8 ml·min⁻¹), una razón de dispersión de 1:00, el tiempo de no dispersión de un minuto, la temperatura inicial fue de 110 °C durante un minuto y se incrementó 35 °C por min⁻¹ hasta alcanzar 200 °C, donde se mantuvo por 50 min.

Los ácidos grasos se identificaron comparando los espectros de masas con los espectros contenidos en la biblioteca de espectros de masas HP (Mass Spectral Libraries, 1998). Esta identificación se confirmó comparando los tiempos de retención de los picos con los tiempos de retención de una mezcla de 43 estándares comerciales de metil-ésteres de ácidos grasos (SIGMA: 189-16, 189-19 y D2534).

IV.2 Cultivo de *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus* (primero y segundo experimento)

IV.2.1 Obtención y acondicionamiento de semillas.

Las semillas de *L. (N.) subnodosus* (≈4 mm de longitud) se obtuvieron del Laboratorio de producción de moluscos perteneciente al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), localizado en La Paz, B.C.S.

En este trabajo se realizaron inicialmente dos experimentos para evaluar el efecto de la temperatura y la dieta sobre el crecimiento de *L. (N.) subnodosus*. El primer experimento consistió en evaluar las temperaturas de 23 y 26 °C, y en el segundo experimento se incluyó una temperatura adicional de 29 °C. La aclimatación de las semillas a las diferentes temperaturas, se realizó con un incremento paulatino de la temperatura del agua (2 °C por día) hasta alcanzar las temperaturas seleccionadas. Se realizó un tercer experimento para evaluar el efecto de la densidad de organismos sobre el crecimiento de esta especie, el cual será descrito posteriormente.

En el periodo de acondicionamiento, los organismos se colocaron en un sistema cerrado con inyección de aire constante "air lift". Los aireadores se colocaron dentro de cámaras de plástico de 1 litro, cuyo fondo se reemplazó por una malla de 50 µm. Cada cámara con su aireador se colocó dentro de una cubeta de 10 l (Figura 1). La aireación en el sistema minimizó la sedimentación del alimento. El agua de mar utilizada en el cultivo estuvo primeramente en contacto con luz UV y posteriormente se filtro a través de una serie de cartuchos de 10, 5 y 1 µm. Se realizaron diariamente recambios de agua del 50 % y una limpieza total del sistema cada tres días para minimizar la contaminación por heces y alimento sobrante. Durante el tiempo de acondicionamiento (7 días) las semillas se alimentaron con una mezcla de *Pavlova lutheri* y *Chaetoceros calcitrans*.

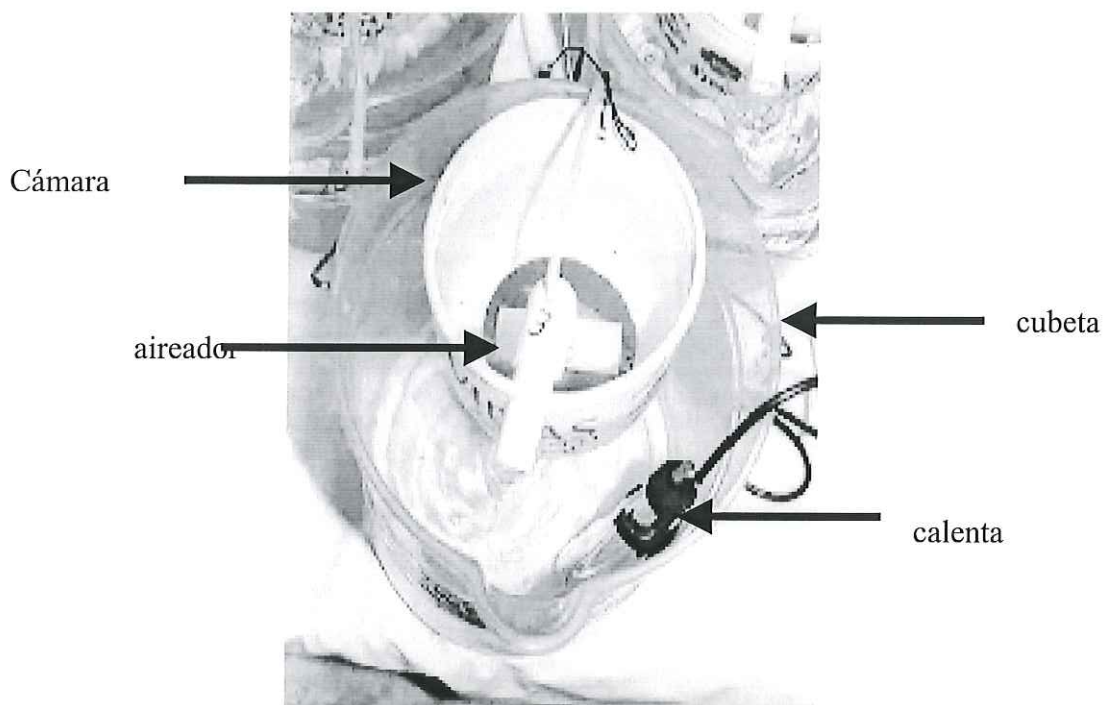


Figura 1. Sistema cerrado con inyección de aire constante usado en el cultivo de *L. (N.) subnodosus* durante los experimentos de alimentación y crecimiento.

IV.2.2 Ración alimenticia y tasa de filtración

Previamente a los ensayos de alimentación en ambos experimentos se determinó la ración alimenticia óptima y la tasa de filtración para semillas de *L. (N.) subnodosus*. Las raciones probadas correspondieron a 100,000, 200,000 y 400,000 cél·ml⁻¹; las cuales se suministraron durante dos días por ración en cada una de las temperaturas (23, 26 y 29 °C ± 1°C).

La tasa de filtración se determinó aplicando la fórmula descrita por Schurink y Griffiths (1992); para la cual el número de células en el sistema después de proporcionada la ración alimenticia se registró cada hora hasta que se mantuvo constante:

$$T.F (h^{-1}) = \frac{(\log_e N_1 - \log_e N_2) V}{TN} \quad (1)$$

Donde N_1 y N_2 son la cantidad inicial y final de microalgas, V es el volumen del recipiente en litros, T es el tiempo en horas y N es el número de organismos en el recipiente.

IV.2.3 Alimentación

Una vez terminada la aclimatación de los organismos a las diferentes temperaturas y seleccionada la ración alimenticia óptima, se iniciaron los bioensayos de crecimiento, para lo cual se formaron al azar doce grupos de 100 y 150 organismos (primero y segundo experimento respectivamente) para cada una de las temperaturas seleccionadas en el experimento correspondiente. Cada grupo de organismos se colocó en una de las cámaras y cubetas del sistema descrito anteriormente (Figuras 2 y 3).

Las tres microalgas utilizadas para la alimentación se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial tardío y se ensayaron en tres tipos de dietas bialgales, quedando de la siguiente manera: M1: *Pavlova lutheri*-*Chaetoceros calcitrans*; M2: *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri*; M3: *Isochrysis* sp.-*Chaetoceros calcitrans*.

La alimentación de *L. (N.) subnodosus* se realizó en función del tipo de microalga, por lo cual se utilizaron diferentes proporciones. En las mezclas que contenía la especie *C. calcitrans* la proporción fue de 1:2 (2 proporciones de *C. calcitrans*) debido a los reportes de que *C. calcitrans* contiene hasta un 50% de cenizas y lo que se pretendió es que los

organismos se alimentaran con las mismas proporciones de materia orgánica. Para la mezcla de especies flageladas (*P. lutheri* e *Isochrysis* sp.) se utilizó una proporción de 1:1.

La ración alimenticia óptima inicial para *L. (N.) subnodosus* se incrementó semanalmente un número de 25,000 cél·ml⁻¹ en función de la demanda de alimento de los organismos en cada tratamiento, para lo cual, diariamente se midió el número de células en las cubetas antes de alimentar a los organismos. Los ensayos de alimentación tuvieron una duración de 6 semanas en el primer experimento y 10 en el segundo.

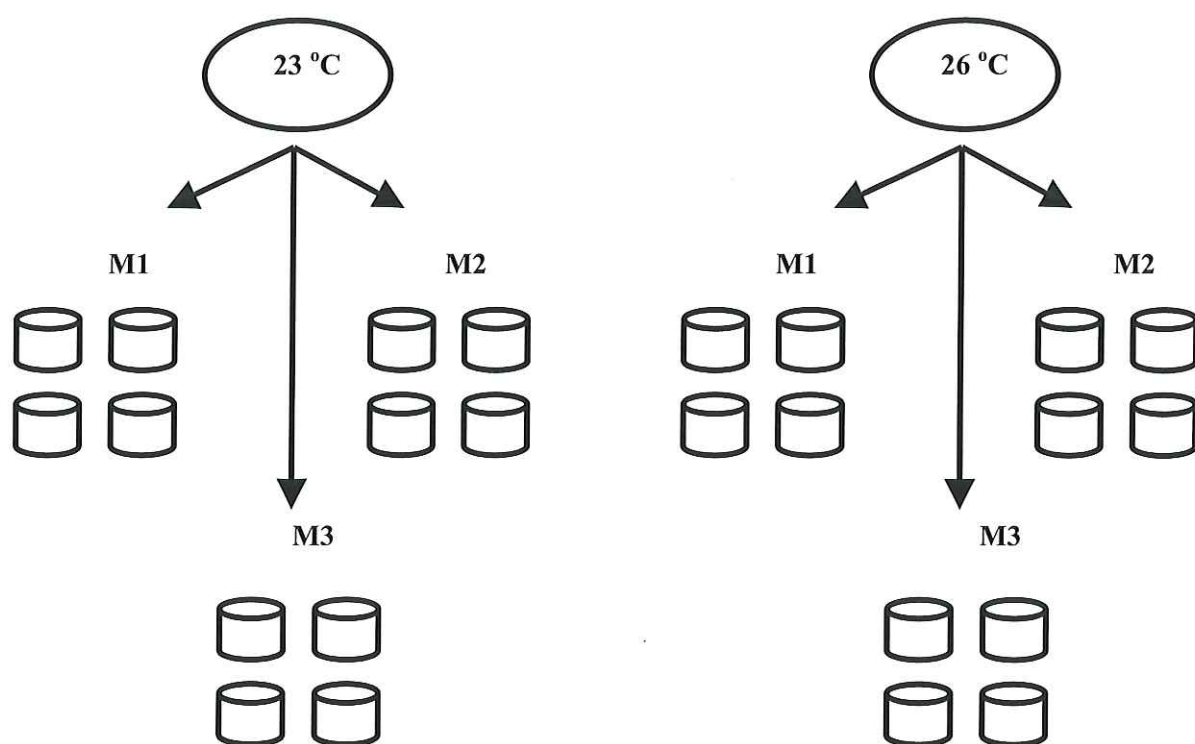


Figura 2. Diseño experimental usado en el cultivo de *L. (N.) subnodosus* durante el primer experimento de alimentación y crecimiento.

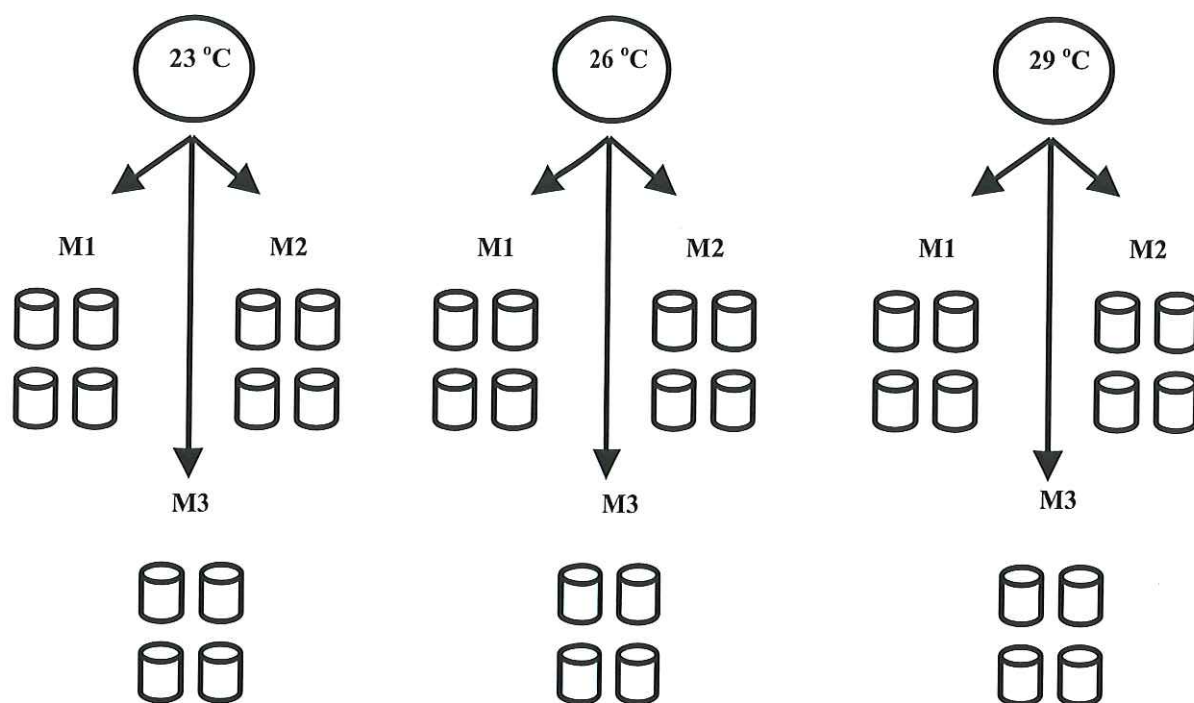


Figura 3. Diseño experimental usado en el cultivo de *L. (N.) subnodosus* durante el segundo experimento de alimentación y crecimiento.

IV.2.4 Mediciones de crecimiento

Al inicio de los experimentos de alimentación, un lote de 30 y 60 organismos (primero y segundo experimento respectivamente) se sacrificaron con el objetivo de conocer los parámetros iniciales de longitud (eje dorso ventral), el ancho de la concha (eje antero posterior), el peso húmedo (PH), el peso seco total (PST) y el peso seco orgánico (PSO). Semanalmente se colectó una muestra aleatoria de 28 y 15 organismos (primero y segundo experimento respectivamente) de cada uno de los tratamientos, se les midió la longitud y el ancho de la concha, así como el PH. El PST y PSO se obtuvieron

semanalmente en el primer experimento (16 semillas por tratamiento) y cada dos semanas en el segundo (24 semillas por tratamiento).

Para conocer los parámetros biométricos como longitud y ancho de la concha se utilizó un microscopio estereoscópico (Zeiss, Stemi 2000-C), adaptado con una reglilla. El PH se obtuvo colocando rápidamente a los organismos en un papel secante para retirar la mayor cantidad de agua, para posteriormente pesarlos por medio de una balanza analítica Mettler AE 240. El PST y PSO se obtuvieron utilizando el método gravimétrico descrito por Sorokin (1973), con un periodo de tiempo de dos días a 60 °C para la obtención del peso constante.

La tasa de crecimiento diario (k) se obtuvo al aplicar la formula:

$$k = \ln (M_t/M_o) / t \quad (2)$$

Donde $\ln$ = logaritmo natural, M_t = medición al día t , M_o = medición al día cero, t =día.

El porcentaje de supervivencia se registró semanalmente en ambos experimentos.

En el segundo experimento, al inicio y al final del mismo una muestra de 30 semillas se sacrificó con el objetivo de conocer y evaluar la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos) del tejido, aplicando los métodos antes descritos para microalgas.

IV.3 Consumo de oxígeno y excreción de amonio

El consumo de oxígeno y la excreción amoniacal se obtuvieron utilizando un respirómetro semi-abierto provisto con cámaras respirométricas de 50 ml (Figura 4). Los organismos se colocaron al azar en cada cámara respirométrica y permanecieron sin

alimento durante 24 h previas a las mediciones. En el primer experimento se depositaron 15 organismos en cada cámara y se instalaron cuatro cámaras por tratamiento, para el segundo experimento el número de organismos se incremento a 20 y las cámaras se redujeron a 3 por tratamiento.

Antes de cerrar el flujo de agua de cada cámara respirométrica, se colectaron dos muestras iniciales de agua, una para medir la concentración de oxígeno disuelto y otra para conocer la concentración de amonio. Las cámaras se mantuvieron cerradas por 90 min, con el propósito de que el contenido de oxígeno disuelto no disminuyera del 30 % debido a que niveles menores causan estrés en los organismos, el cual afecta los resultados obtenidos de estos parámetros (Stern *et al.*, 1984). Después de este tiempo, se obtuvieron muestras de agua por el desplazamiento del volumen propiciado al inflar un globo colocado en el interior de cada cámara y conectado a través de un sistema de mangueras; una muestra de agua de 3 ml (para medición de oxígeno), se colocó en un dispositivo cerrado herméticamente para evitar variaciones en el contenido de oxígeno, la concentración de éste gas disuelto en el agua se midió con un oxímetro modelo YSI # 52 provisto de un sensor polarográfico. La tasa de consumo de oxígeno (VO_2) se calculó obteniendo la diferencia entre la concentración inicial y final de O_2 , y se expresó como mg de $O_2 h^{-1} \cdot g^{-1}$ de peso seco.

Las muestras de agua inicial y final de 10 ml (para determinar la producción de amonio NH_4^+) se obtuvieron de cada cámara respirométrica en forma similar a la descrita para las mediciones del consumo de oxígeno. La cuantificación del amonio se realizó por el método de azul de indofenol (Rodier, 1978), en donde el contenido de amonio se midió en un espectrofotómetro (ELYPTICA Modelo ELY-2000) a una longitud de onda de 640 nm.

La tasa de excreción amoniacal se calculó obteniendo la diferencia entre la concentración inicial y final, y se expresó en mg de $\text{NH}_4^+ \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de peso seco.

En el primer experimento, el consumo de oxígeno y la excreción amoniacal se registraron en la segunda, tercera, cuarta y quinta semana. En el segundo experimento las mediciones se realizaron en las semanas 5 y 10 para los organismos mantenidos a las temperaturas de 23 y 26 °C, en los mantenidos a 29 °C, solamente se registró una lectura correspondiente a la segunda semana, debido a las altas mortalidades que se presentaron en esta temperatura.

La relación atómica O:N se calculó por medio de los datos del consumo de oxígeno y de la excreción de amonio de los organismos aplicando los principios de la termoquímica respiratoria.

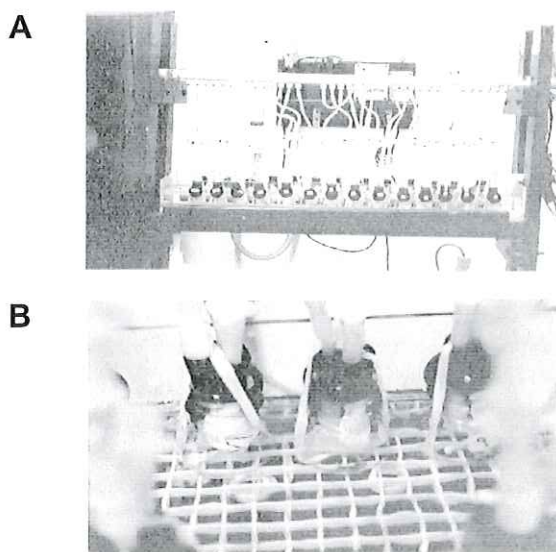


Figura 4. Respirómetro semi-abierto (A) provisto con cámaras respirométricas de 50 ml (B) usado en la medición del consumo de oxígeno y excreción de amonio de *L. (N.) subnodosus*.

IV.4 Efecto de la densidad de organismos en el cultivo (tercer experimento)

Debido a los resultados obtenidos en el segundo experimento, se hizo necesario realizar un tercer experimento, con el propósito de conocer el efecto de la densidad de los organismos en el cultivo y su influencia en el crecimiento; así como para confirmar los resultados obtenidos en el primer experimento.

Las semillas de *L. (N.) subnodosus* se obtuvieron de la Institución antes mencionada. Los organismos se aclimataron durante 3 días a 23 °C (temperatura seleccionada en los ensayos anteriores). Durante este periodo, las semillas se alimentaron con una mezcla de *P. lutheri* y *C. calcitrans*.

Una vez aclimatados los organismos se distribuyeron al azar formando 18 grupos: considerando tres densidades de semillas (40, 80 y 120) y dos dietas de microalgas (M1: *Pavlova lutheri* - *Chaetoceros calcitrans* y M3: *Isochrysis* sp. – *Chaetoceros calcitrans*), con tres repeticiones para cada tratamiento (Figura 5). Los 18 grupos se colocaron en el sistema descrito anteriormente para los dos primeros experimentos.

La ración alimenticia óptima inicial fue de $200 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ y se incrementó semanalmente de manera similar a los dos primeros experimentos. Las tres microalgas utilizadas para la alimentación se cultivaron de la forma descrita anteriormente; de manera similar, se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial tardía y se ensayaron en dos tipos de dietas bialgales.

El crecimiento de los organismos se obtuvo semanalmente, iniciando con mediciones de largo y ancho de la concha de 30 organismos, continuando cada semana con muestras aleatorias de 30 organismos por tratamiento. En relación al peso húmedo (PH),

peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO), un número inicial de 30 organismos fue sacrificado para la obtención de estos parámetros, seguido de mediciones semanales de 9 organismos por tratamiento para la densidad más baja y de 12 para las densidades de 80 y 120 semillas.

La tasa de crecimiento diario, el porcentaje de supervivencia, el largo y ancho de la concha, el PH, el PST y el PSO se obtuvieron con los métodos mencionados en los primeros dos experimentos. El ensayo de densidad tuvo una duración de 4 semanas.

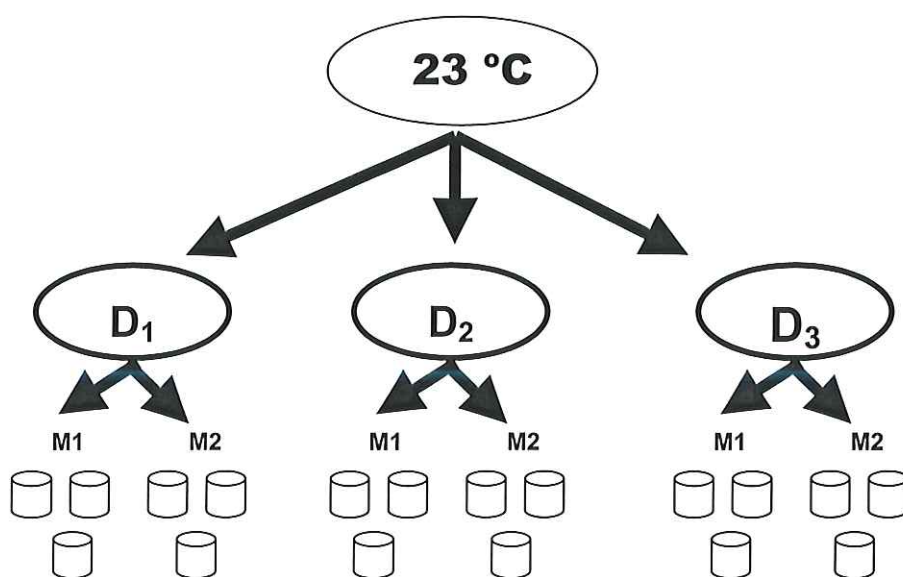


Figura 5. Diseño experimental usado en el cultivo de *L. (N.) subnodosus* durante el experimento de alimentación y densidad.

IV.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron con el paquete estadístico Statistica y SismaStat 2.03. Se realizaron pruebas de homocedasticidad de varianzas, así como de normalidad e independencia de los datos obtenidos. Para conocer la asociación entre los pares de las variables como largo, ancho, PH, PST y PSO se realizaron análisis de correlación.

El efecto de la temperatura y el alimento sobre el crecimiento en las semillas de *L. (N.) subnodosus*, en base a los parámetros antes mencionados así como en el consumo de oxígeno, producción de amonio y la razón O:N se evaluó por medio de un diseño factorial k por l, utilizando una Mancova de 2 vías.

La evaluación de la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos) en base al peso seco total y peso seco orgánico de las tres microalgas y sus mezclas, así como del tejido de los organismos se realizó por medio de una Ancova de 1 vía para cada una de las variables.

La densidad y el alimento sobre el crecimiento (longitud, ancho, PH, PST y PSO) de *L. (N.) subnodosus* se evaluó por medio de un diseño factorial k por l, utilizando una Mancova de 2 vías.

V. RESULTADOS

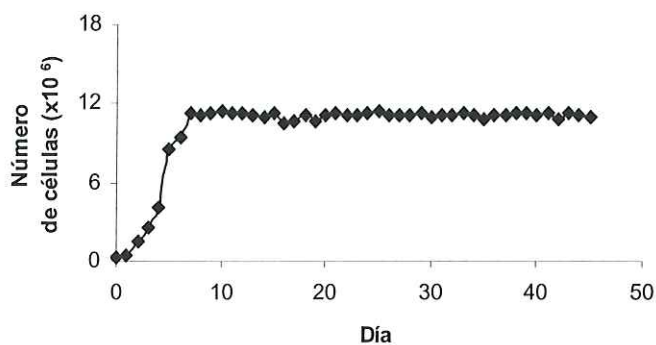
V.1 Cultivo de microalgas

V.1.1 Sistema semicontinuo

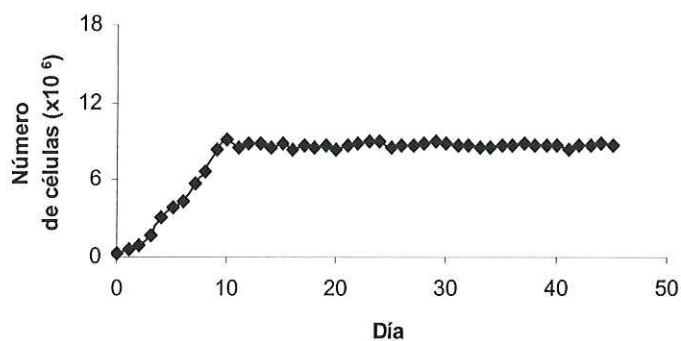
Los cultivos de microalgas en los diferentes experimentos se iniciaron con un tamaño de inóculo de 300, 000 cél·ml⁻¹ alcanzando en *Isochrysis* sp. el promedio deseado de 11×10^6 cél·ml⁻¹ el día 7 del cultivo, en *Pavlova lutheri* de 9×10^6 cél·ml⁻¹ el día 10 y para *Chaetoceros calcitrans* los 13×10^6 cél·ml⁻¹ el quinto día. La tasa de dilución del 20 % aplicada en los cultivos una vez alcanzada la biomasa seleccionada para cada microalga, mantuvo estable el número de células durante la alimentación de *L. (N.) subnodosus* (Figura 6).

Las tasas de crecimiento de las tres microalgas antes mencionadas se muestran en la Tabla I. Las mayores tasa de crecimiento en los diferentes experimentos se registraron los primeros días de cultivo en las tres microalgas. En *Isochrysis* sp. y *C. calcitrans* las más altas tasas de crecimiento se obtuvieron el día 2 del cultivo (1.64 ± 0.19 y 2.98 ± 0.00 respectivamente), en la microalga *P. lutheri* la mayor tasa se registró el día 1 (1.09 ± 0.05).

A



B



C

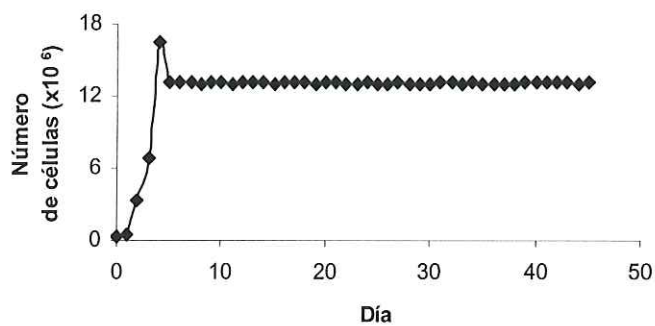


Figura 6. Número de células (x10⁶ cél·ml⁻¹) de las microalgas *Isochrysis* sp. (A), *Pavlova lutheri* (B) y *Chaetoceros calcitrans* (C) mantenidas en sistema semicontinuo. Datos promedio del primero y segundo experimento.

Tabla I. Tasa de crecimiento (μ) promedio (desviación estándar entre paréntesis) en tres especies de microalgas mantenidas en sistema estático. Datos del primero y segundo experimento.

DIA	<i>Isochrysis</i> sp.	<i>Pavlova lutheri</i>	<i>Chaetoceros calcitrans</i>
1	0.76 (0.04)	1.09 (0.05)	0.52 (0.04)
2	1.64 (0.19)	0.60 (0.02)	2.98 (0.00)
3	0.67 (0.36)	0.81 (0.00)	1.01 (0.08)
4	0.68 (0.22)	0.88 (0.03)	1.24 (0.03)
5	1.05 (0.00)	0.29 (0.00)	
6	0.15 (0.00)	0.15 (0.03)	
7	0.23 (0.00)	0.40 (0.06)	
8		0.21 (0.02)	
9		0.35 (0.01)	
10		0.12 (0.04)	

V.1.1.1 Peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO)

La biomasa promedio en base al PST y PSO de las microalgas *Isochrysis* sp., *Pavlova lutheri* y *Chaetoceros calcitrans* cultivadas en sistema semicontinuo se muestra en la Tabla II. Los resultados obtenidos de PST y PSO se mantuvieron estables durante el experimento de alimentación de *L. (N.) subnodosus*. El contenido de ceniza en las tres microalgas se mantuvo estable durante el experimento de alimentación, encontrándose los mayores porcentajes en *C. calcitrans* (42.00 %). Las microalgas *Isochrysis* sp. y *P. lutheri* registraron valores promedio de 32.55 y 32.88 % respectivamente.

Tabla II. Peso seco total (PST) en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, peso seco orgánico (PSO) en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y porcentaje de cenizas de tres especies de microalgas mantenidas en sistema semicontinuo. ISO: *Isochrysis* sp.; PA: *Pavlova lutheri*; CH: *Chaetoceros calcitrans*. Datos promedio del primero y segundo experimento. Desviación estándar entre paréntesis.

	PST ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	PSO ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	CENIZAS (%)
ISO	546.73 (31.76)	363.50 (20.73)	32.55 (4.62)
PA	363.11 (20.52)	242.92 (8.64)	32.88 (2.30)
CH	399.38 (17.43)	234.80 (22.64)	42.00 (5.76)

V.1.1.2 Composición bioquímica

Los resultados de la composición bioquímica en base al PSO de las microalgas *Isochrysis* sp., *Pavlova lutheri* y *Chaetoceros calcitrans* cultivadas en sistema semicontinuo se muestra en la Tabla III y IV. Los resultados en la composición bioquímica promedio en base al PSO muestran diferencias significativas en el contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos entre las microalgas ($P \leq 0.05$). Los mayores porcentajes de proteínas se registraron en la microalga *Isochrysis* sp., seguida de *P. lutheri* y *C. calcitrans*. En relación al contenido de carbohidratos, los mejores porcentajes se obtuvieron en la microalga *Isochrysis* sp. Las diferencias significativas entre microalgas en relación a los lípidos mostraron los mejores resultado en *C. calcitrans* comparada con *Pavlova lutheri* e *Isochrysis* sp.

En relación a los ácidos grasos, los mayores porcentajes de ácidos grasos saturados (SFA) fueron de 55.67 %. Diferencias significativas en el contenido del SFA 14:0 se encontraron entre las microalgas *Isochrysis* sp. y *C. calcitrans* con respecto a *P. lutheri* ($P \leq 0.05$). Los valores obtenidos en el SFA 16:0 mostraron diferencias significativas entre

Isochrysis sp. y *P. lutheri* con respecto a *C. calcitrans* ($P \leq 0.05$). En relación al SFA 18:0 los más altos porcentajes fueron registrados en *Isochrysis* sp. ($P \leq 0.05$) con respecto a *C. calcitrans* y *P. lutheri*, entre estas dos últimas microalgas no se encontraron diferencias significativas en el contenido de este ácido graso ($P \geq 0.05$).

En general, el más alto porcentaje total de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) fue 24.62 %. Los mayores porcentajes del ácido graso 16:1 se encontraron en la microalga *C. calcitrans*, seguida de *P. lutheri* y posteriormente de *Isochrysis* sp. ($P \leq 0.05$). En relación a los ácidos grasos 18:1 ω 7 y 18:1 ω 9 los mayores porcentajes se registraron en *Isochrysis* sp., seguida de *C. calcitrans* y *P. lutheri* ($P \leq 0.05$).

El mayor porcentaje total promedio de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) fue 32.95 %. Los mayores porcentajes de los ácidos grasos 18:2, 18:3 y 22:6 ω 3 se registraron en la microalga *Isochrysis* sp., seguida por *P. lutheri* y posteriormente *C. calcitrans* ($P \leq 0.05$). Los mayores porcentajes de los PUFA 18:4 y 20:5 ω 3 se encontraron en la microalga *P. lutheri* seguida por *C. calcitrans* y posteriormente *Isochrysis* sp ($P \leq 0.05$). Los resultados obtenidos en el contenido del ácido graso 20:4 ω 6 muestran los mayores porcentajes en la microalga *P. lutheri* y *C. calcitrans* con respecto a *Isochrysis* sp. ($P \leq 0.05$).

Tabla III Porcentaje de proteínas, carbohidratos y lípidos en base a peso seco orgánico de tres especies de microalgas cultivadas en sistema semicontinuo. ISO: *Isochrysis* sp.; PA: *Pavlova lutheri*; CH: *Chaetoceros calcitrans*. Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ($P < 0.05$). $a > b > c$. Datos promedio del primero y segundo experimento. Desviación estándar entre paréntesis.

Microalgas	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
ISO	49.82 _a (0.52)	25.00 _a (0.63)	25.18 _c (0.89)
PA	48.09 _b (0.52)	16.07 _c (0.21)	35.87 _b (0.98)
CH	43.81 _c (0.47)	17.85 _b (0.43)	38.34 _a (2.00)

Tabla IV Porcentaje total promedio de ácidos grasos de tres microalgas mantenidas en sistema semicontinuo. ISO: *Isochrysis* sp.; PA: *Pavlova lutheri*; CH: *Chaetoceros calcitrans*. Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ($P < 0.05$). $a > b > c$. Datos promedio del primero y segundo experimento.

Ácidos grasos	ISO	PA	CH
SFA			
14:0	24.68 _a	20.22 _b	25.86 _a
16:0	27.00 _a	26.32 _a	24.92 _b
18:0	3.99 _a	0.78 _b	0.87 _b
Total	55.67	47.32	51.65
MUFA			
16:1	4.00 _c	14.28 _b	18.18 _a
18:1 ω 7	7.81 _a	2.75 _c	3.22 _b
18:1 ω 9	7.81 _a	2.70 _c	3.22 _b
Total	19.62	19.73	24.62
PUFA			
18:2	5.11 _a	1.99 _b	0.72 _c
18:3	5.92 _a	1.24 _b	0.76 _c
18:4	0.47 _c	0.76 _a	0.82 _b
20:4 ω 6	0.89 _b	1.91 _a	1.86 _a
20:5 ω 3	0.95 _c	19.20 _a	16.85 _b
22:6 ω 3	11.44 _a	7.85 _b	2.72 _c
Total	24.71	32.95	23.73

SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.

V.2 Mezclas

V.2.1 Peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO)

Los valores de biomasa expresada en PST y PSO de las mezclas utilizadas como alimento se muestran en la Tabla V. Los porcentajes de cenizas obtenidos en las tres mezclas se mantuvieron estables durante el experimento de alimentación, registrándose los mayores porcentajes en las dietas M1 y M3, las cuales contenían a la diatomea *C. calcitrans*.

Tabla V Peso seco total (PST) en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, peso seco orgánico (PSO) en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y porcentaje de cenizas de tres mezclas de microalgas utilizadas en la alimentación de *L. (N.) subnodosus*. (M1: *Pavlova lutheri* – *Chaetoceros calcitrans*; M2: *Pavlova lutheri* - *Isochrysis* sp.; M3: *Isochrysis* sp. – *Chaetoceros calcitrans*). Datos promedio del primero y segundo experimento. Desviación estándar entre paréntesis.

MEZCLAS	PST ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	PSO ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	CENIZAS (%)
M1	452.29 (68.06)	295.33 (29.35)	34.98 (3.62)
M2	431.53 (44.84)	288.20 (22.55)	32.88 (3.85)
M3	509.68 (52.60)	312.61 (26.34)	37.06 (4.96)

V.2.2 Composición bioquímica

Los resultados en el contenido bioquímico (proteínas, carbohidratos y lípidos) de las mezclas en base al PSO se muestran en las Tablas VI. La composición bioquímica en base al PSO de las mezclas usadas como alimento para *L. (N.) subnodosus* registró diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Las dietas M1 y M2 registraron los mayores porcentajes de

proteínas. Sin embargo, la dieta M1 no mostró diferencias significativas con respecto a M3 ($P \geq 0.05$). Diferencias significativas entre las tres dietas se encontraron en el contenido de carbohidratos y lípidos ($P \leq 0.05$), obteniéndose los mejores porcentajes de carbohidratos en M1 seguida de M3 y M2. En relación a los lípidos, los mayores porcentajes se registraron en M3 seguida de M1 y M2 .

Tabla VI Porcentaje de proteínas, carbohidratos y lípidos en base a peso seco orgánico (PSO) de tres mezclas de microalgas utilizadas en la alimentación de *L. (N.) subnodosus* (M1: *Pavlova lutheri* – *Chaetoceros calcitrans*; M2: *Pavlova lutheri* - *Isochrysis* sp.; M3: *Isochrysis* sp. – *Chaetoceros calcitrans*). Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ($P < 0.05$). a>b>c. Datos promedio del primero y segundo experimento. Desviación estándar entre paréntesis.

MEZCLAS	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
M1	48.56 _{ab} (1.14)	25.30 _a (0.53)	26.14 _b (1.03)
M2	51.96 _a (0.36)	23.60 _c (0.27)	24.44 _c (1.95)
M3	47.41 _b (0.46)	24.55 _b (0.94)	28.04 _a (1.84)

Diferencias significativas en el contenido de los ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) se registraron entre mezclas ($P \leq 0.05$) (Tabla VII). Los porcentajes totales de SFA se encontraron en el intervalo de 48.10 a 50.61 %. Los porcentajes del ácido graso 14:0 obtenidos en las dietas no mostraron diferencias significativas entre ellas ($P \geq 0.05$). En relación al ácido graso 16:0 los mayores porcentajes se obtuvieron en M1 y M2 con respecto a M3 ($P \leq 0.05$). Los resultados en el contenido del ácido graso 18:0 muestran diferencias significativas entre las dietas M2 y M3 con respecto a M1 ($P \leq 0.05$).

La suma total de los MUFA obtenidos en las tres mezclas de microalgas se encontraron en el intervalo de 17.42 a 28.98 %. Los mayores porcentajes del ácido graso 16:1 se encontraron en M1 y M3 ($P \leq 0.05$). En relación a los ácidos grasos 18:1 ω 7 y 18:1 ω 9, los mayores porcentajes se encontraron en M2 y M3 con respecto a M1 ($P \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos en la suma total de PUFA se encontraron en el intervalo de 22.83 a 31.97 %. Los mayores porcentajes de los ácidos grasos 18:2 y 18:3 se encontraron en M2 y M3 con respecto a M1 ($P \leq 0.05$). Los máximos valores del PUFA 18:4 muestran diferencias significativas entre M2 con respecto a M1 y M3, encontrándose diferencias significativas también entre estas dos últimas mezclas ($P \leq 0.05$). En relación al contenido de los ácidos grasos 20:4 ω 6 y 20:5 ω 3 se registraron los mayores porcentajes en M1, seguida por M2 y posteriormente M3 ($P \leq 0.05$). Los resultados en el contenido del PUFA 22:6 ω 3 mostraron diferencias significativas en M2 con respecto a M1 y M3 ($P \leq 0.05$), encontrándose diferencias significativas también entre estas dos últimas mezclas ($P \leq 0.05$).

V.3 Cultivo de *L. (N.) subnodosus*

Los resultados obtenidos en los experimentos mostraron una correlación entre los parámetros medidos. Una alta correlación entre la longitud y el ancho de la concha de *L. (N.) subnodosus* se registró en todos los tratamientos (R^2 en un intervalo de 0.9955 a 0.9978). Altas correlaciones fueron encontradas también para el peso húmedo y peso seco total las correlaciones (R^2 en un intervalo de 0.8812 a 0.9144). Las correlaciones obtenidas entre el peso húmedo y el peso seco orgánico se registraron en un intervalo de 0.7973 a 0.8363. Las más bajas correlaciones se registraron entre el peso seco total y peso seco orgánico con un intervalo de 0.5933 a 0.6402.

Tabla VII Porcentaje total de ácidos grasos de tres mezclas de microalgas utilizadas en la alimentación de *L. (N.) subnodosus*. (M1: *Pavlova lutheri* – *Chaetoceros calcitrans*; M2: *Pavlova lutheri* - *Isochrysis* sp.; M3: *Isochrysis* sp. – *Chaetoceros calcitrans*). Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ($P < 0.05$). $a > b > c$. Datos promedio del primero y segundo experimento.

Ácidos grasos	M1	M2	M3
SFA			
14:0	23.58 a	22.16 a	23.36 a
16:0	25.56 a	26.26 a	22.43 b
18:0	0.73 b	2.19 a	2.31 a
Total	49.87	50.61	48.10
MUFA			
16:1	16.01 a	3.40 b	16.45 a
18:1 ω 7	2.82 b	7.01 a	6.28 a
18:1 ω 9	2.79 b	7.01 a	6.28 a
Total	21.32	17.42	28.98
PUFA			
18:2	1.34 b	3.10 a	2.34 a
18:3	1.57 b	3.60 a	3.13 a
18:4	0.66 b	1.88 a	0.44 c
20:4 ω 6	2.83 a	1.69 b	1.25 c
20:5 ω 3	17.29 a	10.20 b	8.44 c
22:6 ω 3	5.12 c	11.50 a	7.23 b
Total	28.81	31.97	22.83

SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.

V.3.1 Tasa de filtración y Ración alimenticia

Los resultados obtenidos en el primero y segundo experimento en relación a la tasa de filtración de *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas en dos diferentes temperaturas y a tres concentraciones de microalgas se muestran en las figuras 7, 8 y 9. En general, en ambos experimentos indistintamente de las dietas y temperaturas, las mayores tasas de filtración se observaron durante las primeras horas después de proporcionar el alimento a los organismos, para posteriormente ir disminuyendo.

Debido a la ausencia de microalgas observadas después de la quinta hora con la ración de $100 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$ y de una alta producción de pseudoheces y alimento remanente en la ración de $400 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$ posterior a las 24 h en las unidades experimentales tanto en el primero y segundo experimento, se seleccionó la ración de $200 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$ para los ensayos de alimentación en semillas de *L. (N.) subnodosus*.

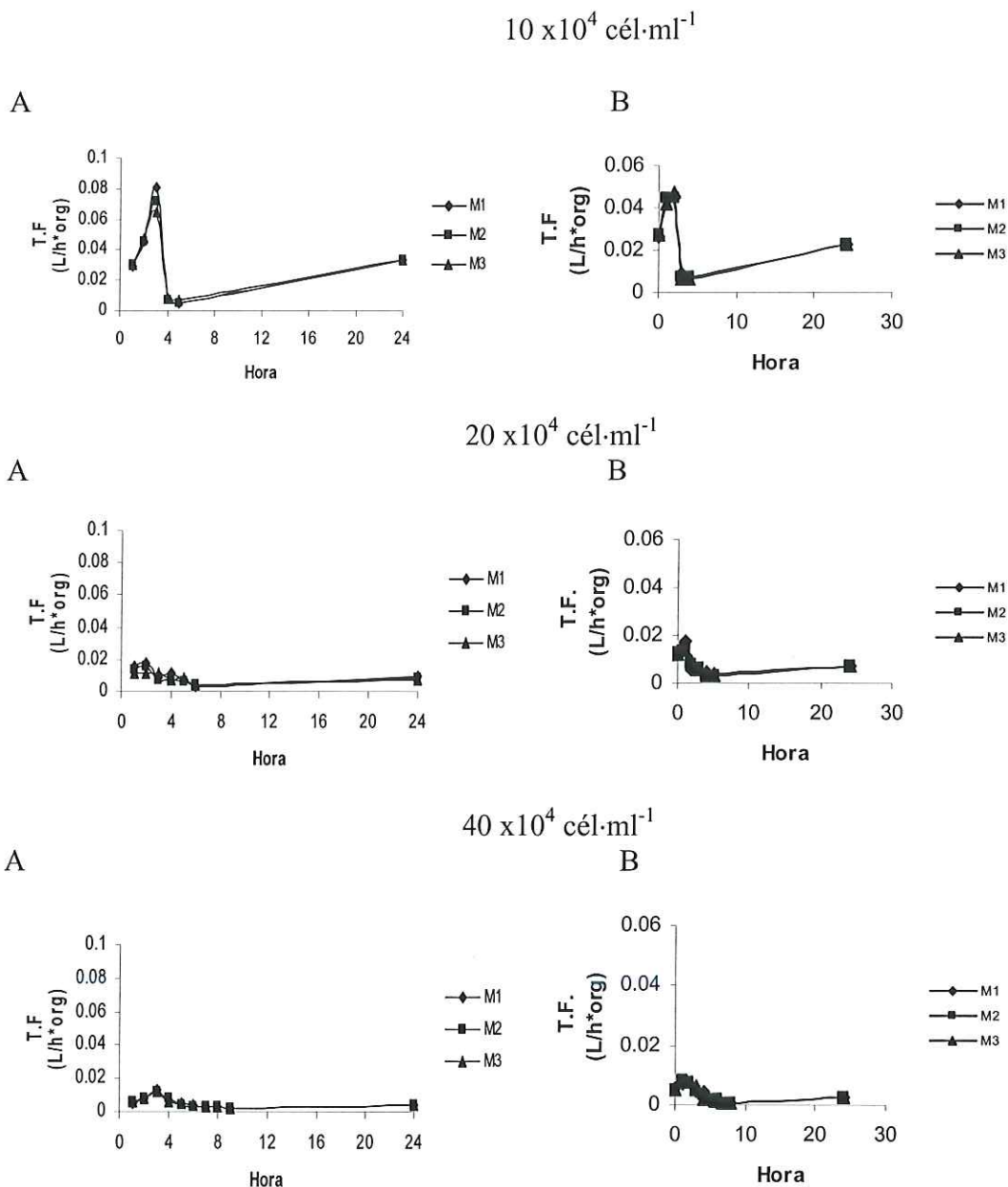


Figura 7. Tasas de filtración (T.F en $\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{org}^{-1}$) de la almeja mano de león *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas y mantenida a 23°C . M1: *Pavlova lutheri* - *Isochrysis* sp.; M2: *Chaetoceros calcitrans*–*Isochrysis* sp.; M3: *Pavlova lutheri*–*Chaetoceros calcitrans*. Raciones alimenticias: 100,000; 200,000 y 400,000 $\text{cél} \cdot \text{ml}^{-1}$. Primer experimento (A) y segundo experimento (B).

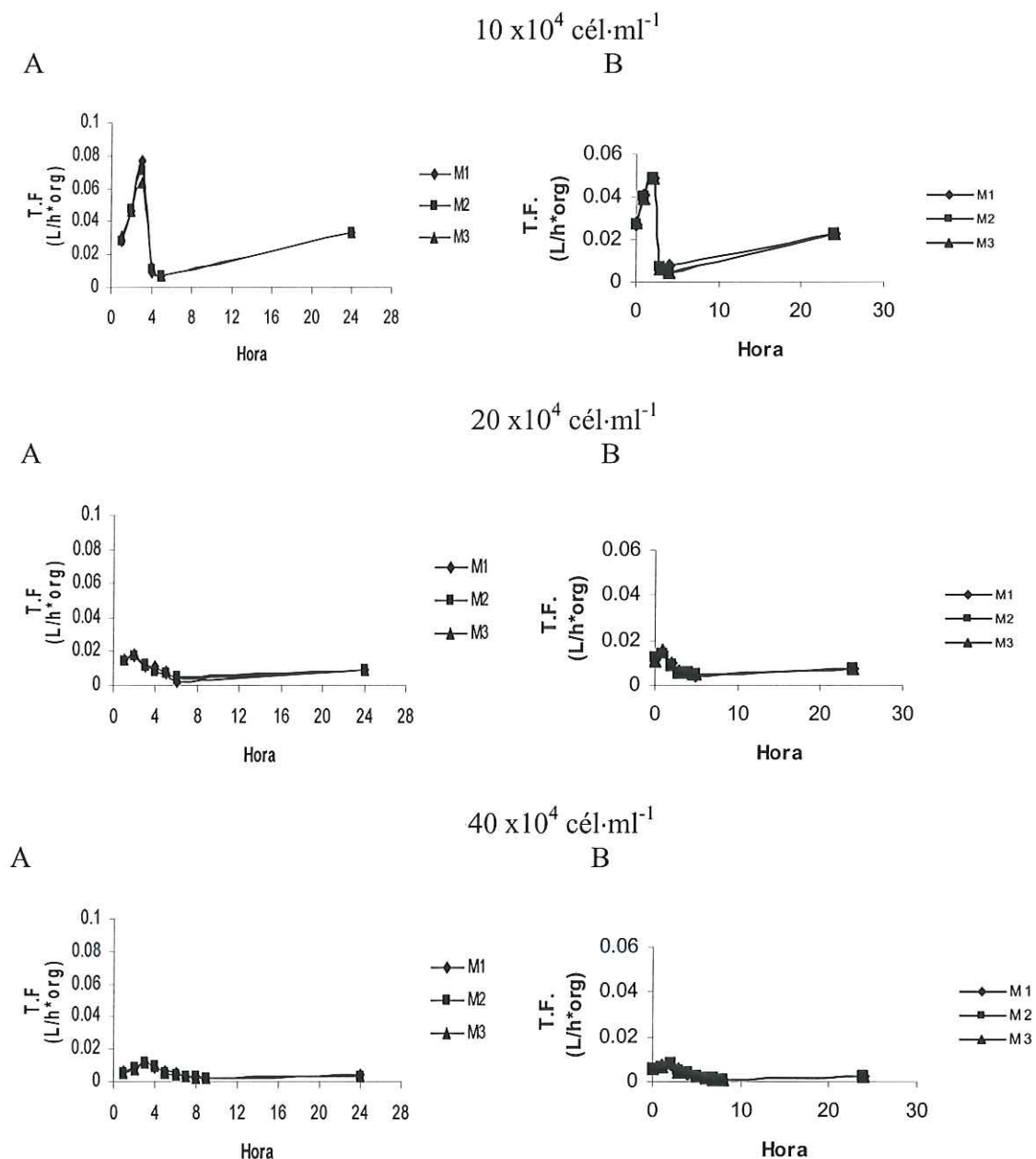
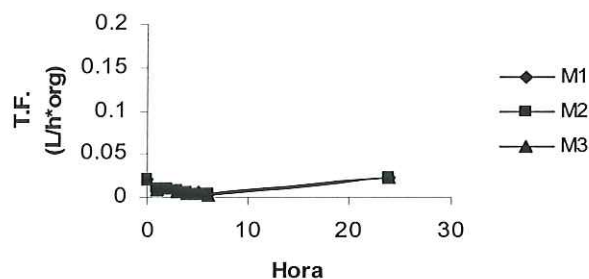
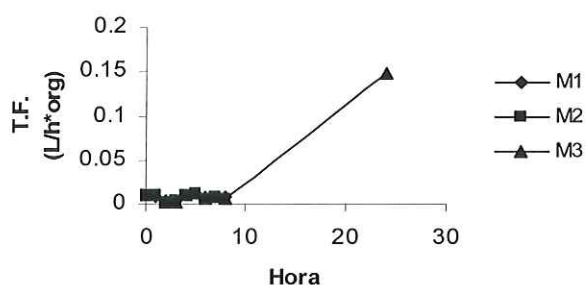


Figura 8. Tasas de filtración (T.F en $\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{org}^{-1}$) de la almeja mano de león *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas y mantenida a 26°C . M1: *Pavlova lutheri*-*Isochrysis* sp.; M2: *Chaetoceros calcitrans*-*Isochrysis* sp.; M3: *Pavlova lutheri*-*Chaetoceros calcitrans*. Raciones alimenticias: 100,000; 200,000 y 400,000 $\text{cél} \cdot \text{ml}^{-1}$. Primer experimento (A) y segundo experimento (B).

$10 \times 10^4 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$



$20 \times 10^4 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$



$40 \times 10^4 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$

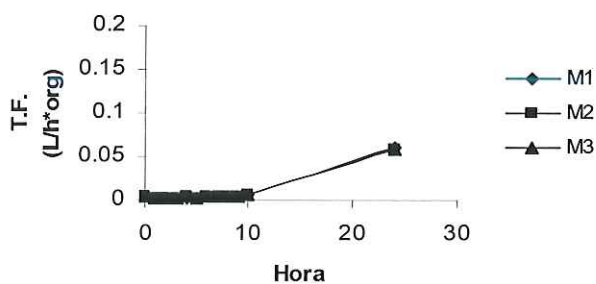


Figura 9. Tasas de filtración (T.F en $\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{org}^{-1}$) de la almeja mano de león *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas y mantenida a 29°C . M1: *Pavlova lutheri*-*Isochrysis* sp.; M2: *Chaetoceros calcitrans*-*Isochrysis* sp.; M3: *Pavlova lutheri*-*Chaetoceros calcitrans*. Raciones alimenticias: $100,000$; $200,000$ y $400,000 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$. Segundo experimento.

V.3.2 Crecimiento de *L. (N.) subnodosus*

V.3.2.1 Longitud y ancho de la concha

Los resultados de crecimiento en base a la longitud y el ancho de la concha del primer experimento se muestran en la Tabla VIII. Los mayores resultados en longitud (eje dorso-ventral) y ancho (eje antero-posterior) de la concha al final del primer experimento (6^{ta} semana) se obtuvieron en los organismos alimentados con M1 en ambas temperaturas ($P \leq 0.05$). Registrándose incrementos de crecimiento de la concha en un intervalo de 235 a 280 % en longitud y de 249 a 307 % en ancho a 23 °C, y de 232 a 280 % de longitud y 243 a 291 % en ancho a 26 °C.

Tabla VIII Promedio final de Longitud (L) y ancho (A) de la concha (en mm), de *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: *Pavlova lutheri* – *Chaetoceros calcitrans*; M2: *Pavlova lutheri* - *Isochrysis* sp.; M3: *Isochrysis* sp. – *Chaetoceros calcitrans*) y mantenida en dos temperaturas. Primer experimento. Los valores correspondientes al mismo parámetro con diferentes letras en la misma columna y línea muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). Desviación estándar entre paréntesis. Longitud inicial= 3 mm.

	23 °C		26 °C	
	L	A	L	A
M1	8.45 _a (1.68)	8.33 _a (1.49)	8.45 _a (1.68)	7.91 _a (1.67)
M2	7.07 _b (0.86)	6.77 _b (0.86)	7.00 _b (0.36)	6.92 _b (0.20)
M3	7.10 _b (1.37)	6.79 _b (1.38)	7.10 _b (1.77)	6.60 _b (1.97)

a>b>c

Los resultados de crecimiento en base a la longitud y ancho de la concha de *L. (N.) subnodosus* en el segundo experimento se muestran en la Tabla IX. Los organismos cultivados a la temperatura de 29 °C e independientemente de la dieta proporcionada registraron altas mortalidades las dos primeras semanas de cultivo, por lo cual, los resultados proporcionados son correspondientes solamente a estas semanas.

Debido a lo anterior, el análisis estadístico se aplicó solamente a los resultados en longitud y ancho obtenidos en los organismos cultivados a 23 y 26 °C, los cuales muestran diferencias significativas entre dietas y temperaturas ($P \leq 0.05$). Los mayores resultados en longitud y ancho se registraron en los organismos alimentados con M3 ($P \leq 0.05$) independientemente de la temperatura ($P \geq 0.05$). Sin embargo, diferencias significativas entre temperaturas se registraron en los organismos alimentados con M2 ($P \leq 0.05$). Donde los mayores resultados en largo y ancho fueron obtenidos en los organismos mantenidos a 23 °C con respecto a los cultivados en 26 °C ($P \leq 0.05$). Registrándose incrementos de crecimiento de la concha en un intervalo de 262 a 272 % en longitud y de 266 a 278 % en ancho a 23 °C, y de 252 a 273 % de longitud y 262 a 280 % en ancho a 26 °C.

Los resultados de crecimiento en base a la longitud y ancho promedio de la concha de *L. (N.) subnodosus* en el tercer experimento se muestra en la Tabla X. Los valores registrados en longitud y ancho de la concha de los organismos mostraron diferencias significativas entre dietas y densidades ($P \leq 0.05$). Los mayores resultados se obtuvieron en los organismos cultivados en la densidad más pequeña y alimentados con M1 con respecto a los demás tratamientos ($P \leq 0.05$). Registrándose incrementos de crecimiento de la concha en un intervalo de 234 a 280 % en longitud y de 249 a 307 % en ancho a 23 °C, y de 232 a 280 % de longitud y 243 a 291 % en ancho a 26 °C.

Tabla IX Promedio final de longitud (L) y ancho (A) de la concha en mm de *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: *Pavlova lutheri* – *Chaetoceros calcitrans*; M2: *Pavlova lutheri* - *Isochrysis* sp.; M3: *Isochrysis* sp. – *Chaetoceros calcitrans*) y mantenida en tres temperaturas. Segundo experimento. Los valores correspondientes al mismo parámetro con diferentes letras en la misma columna y línea muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). Desviación estándar entre paréntesis. Longitud inicial= 4 mm.

	23 °C		26 °C		*29 °C	
	L	A	L	A	L	A
M1	9.20 _b (1.37)	8.70 _b (1.47)	8.97 _b (1.07)	8.56 _b (0.95)	4.64 (0.46)	4.32 (0.46)
M2	9.31 _b (1.25)	8.91 _b (1.21)	8.84 _c (1.10)	8.50 _c (1.04)	4.17 (0.41)	3.88 (0.41)
M3	9.55 _a (1.23)	9.08 _a (0.78)	9.56 _a (0.96)	9.16 _a (0.89)	4.23 (0.45)	3.94 (0.39)

*resultados al inicio de la tercera semana.

a>b>c.

Tabla X Promedio final de longitud (L) y ancho (A) de la concha en mm de *L. (N.) subnodosus* alimentada con dos mezclas de microalgas (M1: *Pavlova lutheri* – *Chaetoceros calcitrans*; M3: *Isochrysis* sp. – *Chaetoceros calcitrans*) y mantenida a 23 °C en tres diferentes densidades ($D_1=40$, $D_2=80$ y $D_3=120$ organismos). Tercer experimento. Los valores correspondientes al mismo parámetro con diferentes letras en la misma columna y línea muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). Desviación estándar entre paréntesis. Longitud inicial= 3.77 mm.

	D₁		D₂		D₃	
	L	A	L	A	L	A
M1	7.09 _a (0.68)	6.78 _a (0.68)	6.50 _{bc} (0.41)	6.19 _{bc} (0.41)	6.34 _{cd} (0.30)	6.04 _{cd} (0.30)
M2	6.52 _b (0.41)	6.21 _b (0.42)	6.27 _{cd} (0.29)	5.97 _{cd} (0.29)	6.05 _d (0.32)	5.75 _d (0.33)

a>b>c.

V.3.2.2 Peso húmedo (PH), peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO)

Los resultados de crecimiento en base a PH, PST y PSO de los organismos obtenidos en el primer experimento se muestran en la Tabla XI. Los mejores resultados en PH y PST al final del primer experimento (6^{ta} semana) se obtuvieron en los organismos alimentados con M1. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre dietas ni temperaturas ($P > 0.05$). Registrándose incrementos en PH de 1270 a 1500 % y de 1012 a 1380 % en PST. En relación al PSO, se encontraron diferencias significativas entre dietas y temperaturas ($P \leq 0.05$), obteniéndose los mayores resultados en los organismos alimentados con M1 y mantenidos a 23 °C. Los incrementos de PSO se registraron en el intervalo de 980 a 1585 %.

Tabla XI Promedio final de peso húmedo (PH), peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO) en mg de *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: *Pavlova lutheri* – *Chaetoceros calcitrans*; M2: *Pavlova lutheri* - *Isochrysis* sp.; M3: *Isochrysis* sp. – *Chaetoceros calcitrans*) y mantenida en dos temperaturas. Primer experimento. Los valores correspondientes al mismo parámetro con diferentes letras en la misma columna y línea muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). PH_{inicial}: 8 mg, PST_{inicial}: 4 mg y PSO_{inicial}: 2 mg. Desviación estándar entre paréntesis.

	M1	M2	M3
23 °C			
PH	120 _a (21.5)	106 _a (19.2)	102 _a (13.1)
PST	49.5 _a (9.7)	41.7 _a (7.8)	40.5 _a (7.8)
PSO	31.7 _a (4.9)	26.2 _{ab} (5.0)	25.4 _{ab} (4.2)
26 °C			
PH	116 _a (13.0)	107 _a (17.6)	104 _a (12.0)
PST	55.2 _a (7.5)	51.5 _a (7.6)	50.6 _a (9.3)
PSO	25.2 _{ab} (3.1)	21.6 _b (4.1)	19.6 _b (2.8)

a>b>c

Los resultados de PH, PST y PSO de los organismos obtenidos en el segundo experimento se muestran en la Tabla XII. En relación a las temperaturas de 23 y 26 °C, los valores obtenidos mostraron diferencias significativas entre dietas y temperaturas ($P \leq 0.05$). Los mayores resultados en PH, PST y PSO se registraron en los organismos mantenidos a 26 °C ($P \leq 0.05$) a excepción de los alimentados con la dieta M2. Los incrementos en base al PH se obtuvieron en un intervalo de 1752 a 1923 %, para el PST de 2008 a 2182 %, y de 2305 a 2955 % en PSO.

Tabla XII Promedio final de peso húmedo (PH), peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO) en mg de *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: *Pavlova lutheri* – *Chaetoceros calcitrans*; M2: *Pavlova lutheri* - *Isochrysis* sp.; M3: *Isochrysis* sp. – *Chaetoceros calcitrans*) y mantenida en tres temperaturas. Segundo experimento. Los valores correspondientes al mismo parámetro con diferentes letras en la misma columna y línea muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). PH_{inicial}: 5 mg, PST_{inicial}: 3 mg y PSO_{inicial}: 0.4 mg. Desviación estándar entre paréntesis.

	M1	M2	M3
23 °C			
PH	88.9 _b (0.97)	86.6 _b (1.37)	90.8 _b (2.24)
PST	54.9 _b (2.03)	52.5 _b (1.78)	55.8 _b (3.70)
PSO	9.32 _b (0.24)	8.76 _b (0.36)	10.0 _b (0.45)
26 °C			
PH	94.5 _a (0.77)	92.6 _a (0.19)	95.0 _a (0.15)
PST	56.7 _a (0.70)	55.5 _a (0.28)	57.4 _a (0.47)
PSO	10.6 _a (0.90)	9.30 _{ab} (0.16)	11.2 _a (0.31)
*29 °C			
PH	10.71 (0.67)	8.69 (0.23)	10.55 (0.21)
PST	4.22 (0.88)	4.86 (0.71)	4.73 (0.19)
PSO	1.19 (0.54)	1.63 (0.48)	1.86 (0.00)

*resultados al inicio de la tercera semana.

a>b>c.

Los resultados de crecimiento en base al PH, PST y PSO obtenidos en el tercer experimento se muestran en la Tabla XIII. Los valores obtenidos en PH, PST y PSO de los organismos mostraron diferencias significativas entre densidades y dietas ($P \leq 0.05$). Los mayores resultados en PH se obtuvieron en los organismos cultivados en la menor densidad (40 org) independientemente de la dieta y en los organismos alimentados con M1 en la densidad media (80 org) ($P \leq 0.05$). Los incrementos en PH se obtuvieron en un intervalo de 497 a 569 %. En relación al PST y PSO, los mayores resultados se registraron en los organismos cultivados en la menor densidad y alimentados con M1 ($P \leq 0.05$). Los incrementos en PST se obtuvieron en un intervalo de 441 a 493 %, y de 1127 a 1215 % en PSO.

Tabla XIII Promedio final de peso húmedo (PH), peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO) en mg de *L. (N.) subnodosus* alimentada con dos mezclas algales (M1: *Pavlova lutheri* – *Chaetoceros calcitrans*; M3: *Isochrysis* sp. – *Chaetoceros calcitrans*) y mantenida a 23 °C en tres diferentes densidades ($D_1=40$, $D_2=80$ y $D_3=120$ organismos). Tercer experimento. Los valores correspondientes al mismo parámetro con diferentes letras en la misma columna y línea muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). $PH_{inicial}$: 6.73 mg, $PST_{inicial}$: 4.11 mg y $PSO_{inicial}$: 0.51 mg. Desviación estándar entre paréntesis.

	D₁	D₂	D₃
M1			
PH	38.30 _a (0.41)	35.35 _{ab} (0.35)	34.02 _{bc} (0.67)
PST	20.29 _a (0.48)	19.11 _b (0.21)	18.37 _{bc} (0.39)
PSO	6.20 _a (0.07)	5.90 _{bc} (0.05)	5.70 _{de} (0.05)
M3			
PH	36.30 _{ab} (0.52)	33.51 _{bc} (0.33)	33.14 _c (12.0)
PST	19.23 _b (0.39)	18.15 _{cd} (0.27)	17.28 _d (0.39)
PSO	5.91 _b (0.08)	5.75 _{cd} (0.05)	5.56 _e (0.09)

a>b>c.

V.3.2.3 Tasas de crecimiento (k) y supervivencia

Las tasas de crecimiento (k) en base al peso seco orgánico de las semillas y los porcentajes de supervivencia obtenidos en el primer experimento se muestran en la Tabla XIV. Los valores más altos de k se obtuvieron en los organismos cultivados a 23 °C y alimentados con las dietas M1 y M2. En relación a la supervivencia en todos los tratamientos al final del primer experimento se mantuvo por arriba del 50 %, obteniéndose en ambas temperaturas los mejores resultados en los organismos alimentados con la dieta M1 y M2.

Tabla XIV Porcentaje de supervivencia (S) y tasa de crecimiento (k), en base al peso orgánico, expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ de *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: *Pavlova lutheri* – *Chaetoceros calcitrans*; M2: *Pavlova lutheri* - *Isochrysis* sp.; M3: *Isochrysis* sp. – *Chaetoceros calcitrans*) y mantenida en dos temperaturas. Primer experimento.

	23 °C		26 °C	
	S (%)	k	S (%)	k
M1	88.00	0.0613	87.33	0.0603
M2	83.00	0.0613	79.33	0.0567
M3	66.66	0.0605	68.33	0.0543

Las tasas de crecimiento (k) en base al peso seco orgánico de las semillas y los porcentajes de la supervivencia obtenidos en el segundo experimento se muestran en la Tabla XV. Los valores de k registrados en los organismos mantenidos a 29 °C representan los resultados obtenidos en la segunda semana del experimento. En general, los valores más altos de k obtenidos en los organismos cultivados a 23 y 26 °C se registraron en los

organismos alimentados con la dieta M3. En relación a los porcentajes de supervivencia, los organismos mantenidos a 29 °C registraron mortalidades por debajo del 50 % al inicio de la tercera semana del experimento independientemente de la dieta. En general, los porcentajes de supervivencia en los organismos a 23 °C y 26 °C al final del experimento mantuvieron valores por debajo del 50 %, a excepción de los alimentados con M1 a la temperatura de 23 °C (51.51 %). Las menores supervivencias en ambas temperaturas se registraron en los organismos alimentados con M3.

Tabla XV Porcentaje de supervivencia (S) y tasa de crecimiento (k), en base al peso orgánico, expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ de *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: *Pavlova lutheri* – *Chaetoceros calcitrans*; M2: *Pavlova lutheri* - *Isochrysis* sp.; M3: *Isochrysis* sp. – *Chaetoceros calcitrans*) y mantenida en tres temperaturas. Segundo experimento.

	23 °C		26 °C		*29 °C	
	S (%)	k	S (%)	k	S (%)	k
M1	51.51	0.0457	46.06	0.0475	30.95	0.0815
M2	23.03	0.0448	39.39	0.0456	29.06	0.1040
M3	19.85	0.0467	33.84	0.0483	2.04	0.1134

• resultados al inicio de la tercera semana

Las tasas de crecimiento (k) en base al peso seco orgánico y porcentaje de supervivencias de *L. (N.) subnodosus* obtenidas en el tercer experimento se muestran en la Tabla XVI. En general, los más altos valores de k se obtuvieron en los organismos alimentados con M1 en las tres densidades, registrándose los valores máximos en la densidad más baja con una tasa de $0.0892 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ en los organismos alimentados con M1 y de $0.0875 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ en M2. En relación a la supervivencia, se registraron valores mayores del

50 % en todos los tratamientos con tendencias similares a los resultados obtenidos en la tasa de crecimiento. En general, se obtuvieron los mayores porcentajes de supervivencia en los grupos de organismos alimentados con M1 en las tres densidades, registrándose los porcentajes más altos en los cultivo con la densidad más baja de organismos (40 org).

Tabla XVI Porcentaje de supervivencia y tasa de crecimiento (k), en base al peso orgánico, expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ de *L. (N.) subnodosus* cultivada a 23 °C en tres diferentes densidades ($D_1=40$, $D_2=80$ y $D_3=120$ organismos) y alimentada con dos mezclas de microalgas (M1: *Pavlova lutheri* – *Chaetoceros calcitrans*; M3: *Isochrysis* sp. – *Chaetoceros calcitrans*). Tercer experimento.

	D_1		D_2		D_3	
	S (%)	k	S (%)	k	S (%)	k
M1	89.16	0.0892	77.08	0.0874	71.94	0.0862
M3	82.16	0.0875	75.83	0.0865	67.77	0.0853

V.3.2.4 Composición bioquímica de *L. (N.) subnodosus*

Los resultados de la composición bioquímica en base al peso seco orgánico (proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos) de *L. (N.) subnodosus* obtenidos en el segundo experimento se muestran en las Tablas XVII y XVIII . Los resultados en el contenido inicial de proteínas registraron valores de 46.15 %, de 29.45 % para carbohidratos y en lípidos de 24.38 %. Los mayores porcentajes de ácidos grasos encontrados en los organismos corresponden a los ácidos grasos saturados con una suma total de 52.81 % con respecto a los ácidos grasos monoinsaturados (15.81 %) y poliinsaturados (31.65 %).

En relación a los resultados finales de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos de *L. (N.) subnodosus* se encontraron diferencias significativas en el contenido bioquímico de las semillas entre temperaturas y dietas ($P \leq 0.05$). Los mayores porcentajes de proteínas se registraron en los organismos alimentados con M1 respecto a M2 y M3 ($P \leq 0.05$) independientemente de la temperatura ($P \geq 0.05$). Sin embargo, diferencias significativas en el contenido de proteínas se registraron entre temperaturas en los organismos alimentados con M2 y M3 ($P \leq 0.05$). En relación al contenido de carbohidratos, se encontraron diferencias significativas entre dietas pero no entre temperaturas, obteniendo los mayores resultados en los organismos alimentados con M2 y M3 con respecto a M1 ($P \leq 0.05$). Los más altos porcentajes de lípidos se obtuvieron en los organismos alimentados con M2 y M3 respecto a M1 ($P \leq 0.05$) en ambas temperaturas. Asimismo, diferencias significativas en el contenido lipídico se registraron en los organismos alimentados con M1 y mantenidos a 23 °C con respecto a los mantenidos a 26 °C y alimentados con la misma dieta ($P \leq 0.05$).

Los porcentajes finales del total de ácidos grasos de *L. (N.) subnodosus* mostraron en general diferencias significativas entre dietas y temperaturas ($P \leq 0.05$). La suma total de los porcentajes de SFA encontrados en los organismos se registraron en el intervalo de 47.73 a 51.30 % en 23 °C y de 46.91 a 50.76 % para los mantenidos a 26 °C. Los porcentajes del SFA 14:0 no registraron diferencias significativas entre dietas y temperaturas ($P \leq 0.05$). Los mayores porcentajes del ácido graso 16:0 se obtuvieron en los organismos alimentados con M1 y M2 a 23 °C y en M2 a 26 °C con respecto a las otras dietas ($P \leq 0.05$). En relación al SFA 18:0 se registraron los más altos porcentajes en las

semillas alimentadas con M2 y M3 respecto a M1 ($P \leq 0.05$) independientemente de la temperatura ($P \geq 0.05$).

La suma total de los porcentajes de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) obtenidos en la semillas de *L. (N.) subnodosus* se encontraron en el intervalo de 16.81 a 28.91 % en la temperatura de 23 °C y de 15.63 a 28.49 % en la de 26 °C. Los mayores resultados del ácido graso 16:1 se registraron en los organismos alimentados con M1 y M3 a 23 °C y solamente con M1 a 26 °C ($P \leq 0.05$). En relación a los MUFA 18:1 ω 7 y 18:1 ω 9, los más altos porcentajes se encontraron en los organismos alimentados con M2 y M3 con respecto a M1 ($P \leq 0.05$) independientemente de la temperatura ($P \geq 0.05$).

La suma total de los porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) obtenidos en las semillas de *L. (N.) subnodosus* se encontraron en el intervalo de 23.35 a 31.87 % en 23 °C y de 23.28 a 33.59 % en la temperatura de 26 °C. Los resultados en el contenido de PUFA de los organismos mostraron diferencias significativas entre dietas ($P \leq 0.05$) pero no entre temperaturas ($P \geq 0.05$). Los mayores porcentajes del ácido graso 18:2 se registraron en los organismos alimentados con M2 respecto a M1 y M3 ($P \leq 0.05$). Asimismo, los mayores resultados en el contenido del PUFA 18:3 se obtuvo en los organismos alimentados con M2 y M3 respecto a M1 ($P \leq 0.05$). En relación al ácido graso 18:4, los porcentajes más altos se registraron en los organismos alimentados con M2 respecto a M1 y M3 ($P \leq 0.05$). Los mayores resultados en el contenido del PUFA 20:4 ω 6 se obtuvieron en los organismos alimentados con M1 y M2 respecto a M3 ($P \leq 0.05$). Los organismos alimentados con la dieta M1 registraron los más altos porcentajes del ácido graso 20:5 ω 3 respecto a los alimentados con M2 y M3 ($P \leq 0.05$). En relación al ácido

graso 22:6 ω 3, los mayores resultados se obtuvieron en los organismos alimentados con M2 respecto a M1 y M3 ($P \leq 0.05$).

Tabla XVII Porcentaje inicial y final de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C) con base en el peso seco orgánico de la almeja mano de león *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: *Pavlova lutheri*- *Chaetoceros calcitrans*; M2: *Pavlova lutheri* -*Isochrysis* sp.; M3: *Isochrysis* sp.-*Chaetoceros calcitrans*) y mantenida en dos temperaturas. Diferentes letras en la misma línea indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Segundo experimento. Desviación estándar entre paréntesis.

Inicial			Final				
			23 °C			26 °C	
		M1	M2	M3	M1	M2	M3
A	46.15	54.01 _a	50.77 _b	48.44 _c	52.36 _a	47.57 _c	49.32 _b
	(1.46)	(3.24)	(3.21)	(1.84)	(4.34)	(2.51)	(2.30)
B	29.45	23.82 _b	25.54 _a	26.65 _a	24.79 _b	26.79 _a	25.76 _a
	(1.88)	(0.93)	(1.92)	(1.86)	(1.57)	(1.18)	(1.00)
C	24.38	22.15 _c	23.68 _a	24.90 _a	22.83 _b	25.62 _a	24.90 _a
	(1.24)	(0.97)	(1.09)	(0.94)	(0.81)	(1.19)	(1.17)

a>b>c.

Tabla XVIII Porcentaje inicial y final del total de ácidos grasos de la almeja mano de león *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: *Pavlova lutheri*- *Chaetoceros calcitrans*; M2: *Pavlova lutheri* -*Isochrysis* sp.; M3: *Isochrysis* sp.-*Chaetoceros calcitrans*) y mantenidas en dos temperaturas. Diferentes letras en la misma línea indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Segundo experimento.

Ácidos grasos	Inicial		Final					
			23 °C			26 °C		
		M1	M2	M3	M1	M2	M3	
SFA								
14:0	20.94	23.00 a	22.39 a	22.57 a	21.64 a	21.74 a	21.11 a	
16:0	24.11	25.45 a	25.98 a	22.57 b	24.46 b	26.51 a	22.12 c	
18:0	7.75	0.85 b	2.92 a	2.58 a	0.80 b	2.50 a	2.23 a	
	52.81	49.30	51.30	47.73	46.91	50.76	48.46	
MUFA								
16:1	8.68	16.61a	2.19 b	15.85 a	17.34 a	2.88 c	15.56 b	
18:1ω7	3.42	3.08 b	7.31 a	6.52 a	3.18 b	6.37 a	6.34 a	
18:1ω9	3.42	3.08 b	7.31a	6.52 a	3.18 b	6.37 a	6.34 a	
	15.81	22.77	16.81	28.91	23.71	15.63	28.49	
PUFA								
18:2	2.63	1.78 c	3.07 a	2.35 b	1.21 c	3.43 a	2.32 b	
18:3	2.84	1.45 b	3.34 a	3.30 a	1.27 b	3.81 a	3.16 a	
18:4	0.60	0.77 b	1.97 a	0.61 b	0.62 b	2.15 a	0.48 b	
20:4 ω6	2.35	2.01 a	1.82 a	1.42 b	2.41 a	1.93 a	1.35 b	
20:5 ω3	12.93	15.77 a	9.92 b	7.52 c	18.33 a	10.84 b	8.85 c	
22:6 ω3	10.27	6.11 c	11.73 a	8.13 b	5.51 c	11.40 a	7.09 b	
	31.65	27.91	31.87	23.35	29.36	33.59	23.28	

a>b>c.

V.3.2.5 Producción de amonio, consumo de oxígeno, y razón O:N.

Los resultados de la producción de amonio, consumo de oxígeno y razón O:N de *L. (N.) subnodosus* obtenidos en el primero y segundo experimento se muestran en la Tabla XIX, XX y XXI. En general, en ambos experimentos los valores obtenidos en la producción de amonio y consumo de oxígeno en base al peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO) de los organismos registran la tendencia de disminuir en las distintas semanas a través del experimento.

La mayor producción de amonio en el primer experimento se registró en el muestreo realizado durante la segunda semana en ambas temperaturas (23 y 26 °C) disminuyendo esta producción en las semanas consecutivas. Los resultados obtenidos en la producción de amonio por parte de las semillas mostraron diferencias significativas entre temperaturas y dietas en las distintas semanas ($P \leq 0.05$). Los más altos valores de producción de amonio en base al peso seco total de las semillas en la 2ª semana se obtuvieron en los organismos mantenidos a 26 °C y alimentados con M3 ($0.1702 \mu\text{gNH}_4\cdot\text{h}^{-1}$) con respecto a los demás tratamientos ($P \leq 0.05$). En relación al PSO de los organismos la más alta producción de amonio se registró en los organismos alimentados con M1 (23 °C) y M3 (26 °C). La producción de amonio por parte de los organismos en PST durante la tercer y cuarta semana mostró los más altos valores en la temperatura de 23 °C ($P \leq 0.05$) independientemente de la dieta ($P \geq 0.05$). En relación al PSO los más altos resultados en ambas temperaturas se registraron en los organismos alimentados con M1 y M2 con respecto a M3 ($P \leq 0.05$) durante la tercer semana y en los alimentados con M1 y M2 a 26 °C para la cuarta semana ($P \leq 0.05$). Los resultados de producción de amonio en PST y PSO obtenidos durante la quinta semana de experimentación mostraron los más altos

valores en los organismos alimentados con M3 a 23 °C y con M1 a 26 °C respectivamente ($P \leq 0.05$).

La producción de amonio en el segundo experimento siguió una tendencia similar a la obtenida en el primer experimento, registrándose una disminución en la producción a través del tiempo. La mayor producción de amonio a 23 y 26 °C se obtuvo en el muestreo realizado durante la 5ª semana. Los resultados mostraron diferencias significativas en la producción de amonio de los organismos en PST y PSO entre dietas y temperaturas ($P \leq 0.05$). Los valores más elevados obtenidos durante la 5ª semana respecto a la producción de amonio en PST y PSO de los organismos se registraron en la temperatura de 23 °C con la dieta M1 ($P \leq 0.05$). Los resultados de producción de amonio a la 11ª semana en PST mostraron los más altos valores en las semillas alimentadas con M1 y M2 en ambas temperaturas ($P \leq 0.05$). En relación a los resultados en PSO de los organismos, se obtuvieron las más altas producciones de amonio en las semillas alimentadas con M1 y M2 a 23 °C, así como en M1 a 26 °C ($P \leq 0.05$). La producción de amonio por parte de los organismos mantenidos a 29 °C para la 2 semana del experimento se encontró en el intervalo de 0.2150 a 0.2768 $\mu\text{gNH}_4\cdot\text{h}^{-1}$ en PST del organismo y de 1.816 a 2.404 $\mu\text{gNH}_4\cdot\text{h}^{-1}$ en PSO.

La tendencia de los resultados de consumo de oxígeno de los organismos es similar a la obtenida en la producción de amonio, registrándose en ambos experimentos una disminución en el consumo de oxígeno a través de los experimentos. Los resultados de consumo de oxígeno en PST y PSO de los organismos mostraron diferencias significativas entre dietas y temperaturas en las distintas semanas ($P \leq 0.05$).

Los valores más elevados del consumo de oxígeno tanto en PST y PSO de los organismos durante el primer experimento se registraron en la segunda semana. El consumo más elevado de oxígeno en PST de los organismos en la segunda y tercer semana se registraron en las semillas mantenidas a 26 °C ($P \leq 0.05$) independientemente de la dieta ($P \geq 0.05$). En relación al consumo de oxígeno en PSO de los organismos, los valores más elevados durante la segunda semana se observaron en las semillas alimentadas con M1 a 23 °C y en las mantenidas a 26 °C independientemente de la dieta ($P \leq 0.05$). En la tercera semana los consumos de oxígeno más elevados en PSO de los organismos se registraron en la temperatura de 26 °C ($P \leq 0.05$) independientemente de la dieta ($P \geq 0.05$). Los resultados obtenidos en relación al consumo de oxígeno en PST y PSO de los organismos en la cuarta semana mostraron los valores más elevados en las semillas alimentadas con M1 y mantenidas a 26 °C ($P \leq 0.05$). En relación a la quinta semana, los mayores consumos de oxígeno se obtuvieron en las semillas alimentadas con M1 a 26 °C en base al peso seco total y a 23 °C en base al peso seco orgánico ($P \leq 0.05$).

Los resultados del consumo de oxígeno en base al peso seco total y peso seco orgánico de los organismos durante el segundo experimento mostraron diferentes significativas entre dietas y temperaturas ($P \leq 0.05$). Los mayores consumos de oxígeno en base al peso seco total de los organismos a la quinta semana se obtuvieron en las semillas mantenidas a 23 °C ($P \leq 0.05$). En relación al consumo de oxígeno en base al peso seco orgánico los más altos valores se registraron en las semillas a 23 °C y en las alimentadas con M1 y M2 a 26 °C ($P \leq 0.05$). Los consumos de oxígeno obtenidos en la onceava semana mostraron los mayores resultados en base al peso seco total de los organismos alimentados con la dieta M1 y M2 a la temperatura de 26 °C ($P \leq 0.05$). El consumo de

oxígeno obtenido en los organismos a 29 °C en la segunda semana se encontró en el intervalo de 0.00012 a 0.00016 $\text{mlO}_2\cdot\text{h}^{-1}$ en base al peso seco total y de 0.00115 a 0.00144 $\text{mlO}_2\cdot\text{h}^{-1}$ en base al peso seco orgánico.

Los resultados de la razón O:N obtenidos en el primer experimento varían de una semana a la otra, registrando la tendencia a aumentar a través del tiempo. Los resultados obtenidos en la razón O:N mostraron diferencias significativas entre temperaturas y dietas en las distintas semanas ($P \leq 0.05$). En general, los valores más elevados de la razón O:N se obtuvieron en los organismos alimentados con M1 y M2 a 26 °C ($P \leq 0.05$).

En relación a los resultados de la razón O:N obtenidos en el segundo experimento mostraron diferentes significativas entre dietas y temperaturas ($P \leq 0.05$). Los valores de la razón O:N en la 5^{ta} semana se registraron en un intervalo de 0.844 a 0.940. Los valores más altos en la 11^{va} semana se registraron en los organismos alimentados con M2 y M3 a 23 °C ($P \leq 0.05$). En relación a los resultados de la razón O:N obtenidos a 29 °C en la segunda semana de experimentación, los valores se encuentran en el intervalo de 0.646 a 0.791.

Tabla XIX Producción de amonio ($\mu\text{gNH}_4\cdot\text{h}^{-1}$) en base al peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO) de la almeja mano de león *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: *Pavlova lutheri* – *Chaetoceros calcitrans*; M2: *Pavlova lutheri* - *Isochrysis* sp.; M3: *Isochrysis* sp. – *Chaetoceros calcitrans*) y mantenida en diferentes temperaturas (23, 26 y 29 °C). Primer experimento (A) y segundo experimento (B). Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas ($P \leq 0.05$). a>b>c>d. Desviación estándar entre paréntesis.

A)

Semana		PST			PSO		
		M1	M2	M3	M1	M2	M3
23 °C	2	0.1441 _b	0.1349 _c	0.1308 _c	1.2317 _a	0.8450 _c	0.9905 _b
		(0.001)	(0.002)	(0.005)	(0.013)	(0.016)	(0.039)
	3	0.1396 _a	0.1250 _{ab}	0.1241 _{ab}	0.8850 _a	0.8426 _{ab}	0.7449 _{bc}
		(0.003)	(0.015)	(0.003)	(0.025)	(0.104)	(0.020)
	4	0.1132 _a	0.1209 _a	0.1225 _a	0.7531 _{bc}	0.7578 _{bc}	0.7287 _c
		(0.002)	(0.001)	(0.001)	(0.018)	(0.010)	(0.006)
	5	0.0859 _b	0.0908 _b	0.1160 _a	0.7440 _{bc}	0.7153 _{bc}	0.7167 _{bc}
		(0.002)	(0.005)	(0.002)	(0.019)	(0.040)	(0.017)
	2	0.1489 _b	0.1458 _b	0.1702 _a	1.0127 _b	0.9804 _b	1.2960 _a
		(0.005)	(0.002)	(0.005)	(0.038)	(0.015)	(0.039)
	3	0.0943 _c	0.1120 _b	0.1095 _b	0.8811 _a	0.8768 _a	0.7019 _c
		(0.002)	(0.004)	(0.004)	(0.023)	(0.038)	(0.026)
	4	0.0928 _b	0.0953 _b	0.0945 _b	0.8573 _a	0.8305 _{ab}	0.6943 _c
		(0.003)	(0.010)	(0.001)	(0.028)	(0.095)	(0.009)
	5	0.0692 _d	0.0757 _{cd}	0.0826 _{bc}	0.8408 _a	0.7502 _b	0.6693 _c
		(0.005)	(0.000)	(0.002)	(0.071)	(0.002)	(0.019)

B)

Semana		PST			PSO		
		M1	M2	M3	M1	M2	M3
23 °C	5	0.2201 _a	0.1753 _c	0.1937 _b	2.508 _a	1.968 _c	2.227 _b
		(0.014)	(0.011)	(0.014)	(0.163)	(0.133)	(0.161)
	11	0.0245 _a	0.0240 _{ab}	0.0222 _b	0.1445 _a	0.1439 _a	0.1240 _b
		(0.000)	(0.000)	(0.000)	(0.001)	(0.000)	(0.001)
26 °C	5	0.1561 _d	0.1469 _d	0.1304 _d	1.948 _c	2.035 _b	1.442 _d
		(0.001)	(0.006)	(0.001)	(0.020)	(0.095)	(0.019)
	11	0.0248 _a	0.0234 _{ab}	0.0213 _c	0.1326 _{ab}	0.1274 _b	0.1090 _c
		(0.000)	(0.000)	(0.000)	(0.000)	(0.002)	(0.001)
29 °C	2	0.2768	0.2478	0.2150	2.384	2.404	1.816
		(0.021)	(0.037)	(0.004)	(0.188)	(0.368)	(0.035)

Tabla XX Consumo de oxígeno ($\text{mlO}_2 \cdot \text{h}^{-1}$) en base al peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO) de la almeja mano de león *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: *Pavlova lutheri* – *Chaetoceros calcitrans*; M2: *Pavlova lutheri* - *Isochrysis* sp.; M3: *Isochrysis* sp. – *Chaetoceros calcitrans*) y mantenida en diferentes temperaturas (23, 26 y 29 °C). Primer experimento (A) y segundo experimento (B). Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas ($P \leq 0.05$). $a > b > c > d$. Desviación estándar entre paréntesis.

A)

Semana		PST			PSO		
		M1	M2	M3	M1	M2	M3
23 °C	2	7.6×10^{-5} _b (5.3×10^{-6})	7.4×10^{-5} _b (8.2×10^{-6})	7.3×10^{-5} _b (3.4×10^{-6})	0.00065 _a (4.5×10^{-5})	0.00058 _b (6.5×10^{-5})	0.00055 _b (2.6×10^{-5})
	3	6.7×10^{-5} _b (5.6×10^{-6})	6.9×10^{-5} _b (4.0×10^{-6})	6.6×10^{-5} _b (1.8×10^{-6})	0.00056 _b (4.7×10^{-5})	0.00052 _b (3.0×10^{-5})	0.00055 _b (1.5×10^{-5})
	4	6.6×10^{-5} _b (2.9×10^{-6})	6.8×10^{-5} _b (2.2×10^{-6})	6.6×10^{-5} _b (2.9×10^{-6})	0.00052 _b (2.3×10^{-5})	0.00048 _b (1.6×10^{-5})	0.00048 _b (2.2×10^{-5})
	5	6.1×10^{-5} _b (2.1×10^{-6})	6.1×10^{-5} _b (2.3×10^{-6})	6.1×10^{-5} _b (2.3×10^{-6})	0.00070 _a (2.4×10^{-5})	0.00059 _b (7.6×10^{-5})	0.00049 _b (9.9×10^{-5})
26 °C	2	8.9×10^{-5} _a (1.9×10^{-5})	9.3×10^{-5} _a (2.5×10^{-6})	9.7×10^{-5} _a (1.7×10^{-5})	0.00060 _a (0.000)	0.00063 _a (0.000)	0.00073 _a (0.000)
	3	8.2×10^{-5} _a (1.2×10^{-5})	8.6×10^{-5} _a (6.7×10^{-6})	9.1×10^{-5} _a (6.8×10^{-6})	0.00076 _a (0.000)	0.00067 _a (5.3×10^{-5})	0.00073 _a (5.4×10^{-5})
	4	7.9×10^{-5} _a (3.5×10^{-5})	6.5×10^{-5} _b (2.3×10^{-5})	6.0×10^{-5} _b (7.1×10^{-6})	0.00073 _a (0.000)	0.00056 _b (0.000)	0.00059 _b (7.0×10^{-5})
	5	7.6×10^{-5} _a (2.5×10^{-6})	6.0×10^{-5} _b (7.6×10^{-6})	6.1×10^{-5} _b (9.9×10^{-6})	0.00051 _b (1.7×10^{-5})	0.00047 _b (1.7×10^{-5})	0.00041 _b (1.6×10^{-5})

B)

Semana		PST			PSO		
		M1	M2	M3	M1	M2	M3
23 °C	5	0.00015 _a (2.3×10^{-5})	0.00013 _{ab} (1.2×10^{-5})	0.00013 _{ab} (9.1×10^{-6})	0.00180 _a (0.000)	0.00148 _a (0.000)	0.00150 _a (0.000)
	11	2.0×10^{-5} _b (5.4×10^{-6})	2.6×10^{-5} _b (1.4×10^{-6})	2.2×10^{-5} _b (2.5×10^{-6})	0.00122 _a (3.2×10^{-5})	0.00160 _a (8.7×10^{-6})	0.00128 _a (1.4×10^{-5})
26 °C	5	0.00011 _{bc} (0.0000)	0.00011 _{bc} (1.0×10^{-5})	9.6×10^{-5} _c (0.0000)	0.00142 _{ab} (0.000)	0.00152 _a (0.000)	0.00107 _b (0.000)
	11	8.8×10^{-5} _a (0.0000)	9.0×10^{-5} _a (3.4×10^{-6})	1.1×10^{-5} _c (2.4×10^{-6})	4.7×10^{-5} _b (0.0000)	4.9×10^{-5} _b (1.8×10^{-6})	5.9×10^{-5} _b (1.2×10^{-6})
29 °C	2	0.00016 (3.0×10^{-6})	0.00012 (7.9×10^{-6})	0.00013 (0.0000)	0.00144 (0.000)	0.00124 (7.7×10^{-5})	0.00115 (0.000)

Tabla XXI Razón O:N en base al peso seco total de la almeja mano de león *L. (N.) subnodosus* alimentada con tres mezclas de microalgas (M1: *Pavlova lutheri* – *Chaetoceros calcitrans*; M2: *Pavlova lutheri* - *Isochrysis* sp.; M3: *Isochrysis* sp. – *Chaetoceros calcitrans*) y mantenida en diferentes temperaturas (23, 26 y 29 °C). Primer experimento (A) y segundo experimento (B). Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas ($P \leq 0.05$). $a > b > c > d$. Desviación estándar entre paréntesis.

A)

Semana		Razón O: N		
		M1	M2	M3
23 °C				
	2	0.665 (0.04) _c	0.688 (0.07) _c	0.697 (0.04) _c
	3	0.606 (0.05) _b	0.689 (0.10) _b	0.672 (0.03) _b
	4	0.732 (0.02) _{bd}	0.703 (0.03) _d	0.672 (0.03) _d
	5	0.889 (0.04) _{bc}	0.850 (0.07) _c	0.657 (0.03) _d
26 °C				
	2	0.748 (0.18) _{ab}	0.803 (0.21) _a	0.712 (0.12) _b
	3	1.088 (0.17) _a	0.963 (0.08) _a	1.046 (0.07) _a
	4	1.073 (0.49) _a	0.852 (0.30) _{ab}	0.804 (0.09) _{bd}
	5	1.370 (0.09) _a	0.989 (0.12) _b	0.930 (0.14) _b

B)

Semana		Razón O: N		
		M1	M2	M3
23 °C				
	5	0.900 (0.06) _a	0.940 (0.05) _a	0.844 (0.01) _a
	11	1.051 (0.27) _b	1.386 (0.06) _a	1.284 (0.12) _a
26 °C				
	5	0.916 (0.00) _a	0.937 (0.02) _a	0.928 (0.01) _a
	11	0.443 (0.00) _d	0.480 (0.01) _d	0.680 (0.01) _c
29 °C				
	2	0.757 (0.09)	0.646 (0.08)	0.791 (0.01)

VI. DISCUSION

El uso de microalgas vivas como alimento en algunas especies de organismos acuáticos son parte primordial de su cultivo. En específico se encuentra el caso de los moluscos bivalvos cuyo único alimento en el medio natural se compone de fitoplancton, por lo cual las microalgas forman la parte medular de su alimentación y por ende de su crecimiento, por tal motivo es necesario seleccionar las especies de microalgas que satisfagan los requerimientos nutricionales de cada una de las especies de bivalvos que se cultiven (Brown *et al.*, 1989).

El valor nutricional de las microalgas se relaciona con el contenido de sus componentes bioquímicos como las proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos y vitaminas. La calidad y cantidad de estos componentes depende de diversos factores entre los que se encuentran la temperatura, el medio de cultivo, la fase en la cual se cosechan las microalgas, la intensidad de la luz y la especie de microalga (Reyes Zamorano, 2002; Guevara-Ponce, 2002). Estos factores influyen también en el crecimiento de las microalgas, lo cual se ve reflejado en sus tasas de crecimiento y en el tiempo en el que tardan en alcanzar las diferentes fases de crecimiento (Cury y Roy, 1989; Dubinsky *et al.*, 1995). En el presente trabajo, las diferencias obtenidas en las tasas de crecimiento entre las tres microalgas confirman el efecto de la especie sobre el crecimiento.

Se ha demostrado que las microalgas pertenecientes al género *Chaetoceros* registran altas tasas de crecimiento (Angulo-Escarsega, 2001; Guevara-Ponce, 2002). Asimismo, en cultivos de *Chaetoceros calcitrans* se han obtenido concentraciones celulares de más de 16×10^6 cel·ml⁻¹ en la fase de crecimiento exponencial (Cerón-Ortiz, 2000). Resultados similares fueron obtenidos en el presente trabajo, donde *C. calcitrans* alcanzó la fase tardía

de crecimiento exponencial en un periodo de tiempo más corto que *Isochrysis* y *P. lutheri*. Lo anterior se debe a que *C. calcitrans* registró las mayores tasas de crecimiento. Los menores resultados en el crecimiento celular y en las tasas de crecimiento fueron registradas en los cultivos de *Pavlova lutheri*, los cuales se deben a sus capacidades de crecimiento. Las concentraciones celulares y las tasas de crecimiento registradas en los cultivos de las tres microalgas en los diferentes experimentos se encontraron en el rango promedio de las utilizadas por Cerón-Ortiz (2000) y Burgueño-Loaiza (2002) bajo condiciones similares de cultivo. Sin embargo, Angulo-Escarsega (2001) en volúmenes mayores de 380 litros obtuvo menores tasas de crecimiento y bajas concentración en cultivos de la microalga *Chaetoceros* spp. Debido a lo anterior, las variaciones encontradas entre las concentraciones celulares y las tasas de crecimiento de las microalgas en este trabajo con las registradas por otros autores son consecuencia de las diferentes condiciones de cultivo utilizadas en cada una de las investigaciones. Debido a lo anterior, las variaciones encontradas entre las concentraciones celulares y las tasas de crecimiento de las microalgas en este trabajo con las registradas con otros autores son consecuencia de las diferentes condiciones de cultivo utilizadas en cada una de las investigaciones.

De manera similar el contenido bioquímico de las microalgas es afectado por las condiciones de cultivo seleccionadas en cada trabajo experimental. Sin embargo, uno de los principales objetivos en el cultivo de organismos es el hecho de mantener de manera estable la composición bioquímica del alimento (microalgas), asegurando con ello que se este proporcionando la misma calidad nutricional a los organismos durante el cultivo. Una de las formas de obtener una estabilidad en la composición bioquímica de las microalgas es manteniendo la fase de crecimiento seleccionada durante el periodo de alimentación de los

animales, lo cual es logrado al realizar recambios del cultivo de microalgas y renovar con medio de cultivo nuevo rico en nutrientes. Lo anterior es definido como tasa de dilución, la cual es diferente en cada una de las microalgas y depende de manera importante de las condiciones de cultivo, así como del efecto de estas últimas en la tasa de crecimiento de las microalgas. En el presente trabajo, la tasa de dilución correspondiente al 20 % del volumen del cultivo mantuvo en la fase de crecimiento exponencial tardía los cultivos de microalgas y sostuvo estable la composición bioquímica de las tres microalgas durante los ensayos de alimentación. La tasa de dilución seleccionada para este trabajo estuvo basada en estudios previos con estas microalgas (González 1991; Brown *et al.*, 1993; Cerón-Ortiz, 2000).

El contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos depende de la especie de microalga y de la fase de crecimiento en la cual se realiza la cosecha, asimismo es afectado por las condiciones de cultivo como la intensidad de luz y la temperatura (Trujillo Valle y Voltolina, 1994; Burgueño-Loaiza, 2002). El mayor contenido proteico en el cultivo de microalgas se obtiene generalmente en su fase de crecimiento exponencial disminuyendo progresivamente en las fases posteriores, siendo los carbohidratos y lípidos los que se encuentran en mayor proporción en estas etapas del cultivo (Fidalgo *et al.*, 1998). Debido a lo anterior y al hecho de que los requerimientos proteicos en etapa de semilla son más altos se decidió mantener los cultivos de microalgas en la etapa de crecimiento exponencial tardía realizando la cosecha en esta fase.

Las microalgas *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis* sp. y *P. lutheri* son tres especies con elevado valor nutricional (De Pauw y Persoone, 1988; Ward *et al.*, 1992). Siendo estas dos últimas las que contienen un elevado porcentaje de proteínas y ácidos grasos esenciales, lo cual fue corroborado en los diferentes experimentos realizados en este trabajo. Los

porcentajes de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos registrados en *C. calcitran*, *Isochrysis* sp. y *P. lutheri* se encuentran en el rango obtenido por Renaud *et al.* (1999), Cerón-Ortiz (2000), Pérez-Martínez (2002) y Tonon *et al.* (2002). Sin embargo, se registraron algunas diferencias en el contenidos bioquímico de las microalgas con respecto a otros autores, las cuales pueden ser debidas a las características específicas de cultivo de cada autor (Nikos y Lucas, 2000a).

El formular dietas con más de una especie de microalgas en base al peso seco orgánico, elimina el error relacionado con el contenido de elevados porcentajes de cenizas que se obtienen en algunas especies de microalgas, debido principalmente a que poseen una cubierta celular silícea como lo es la diatomea *Chaetoceros calcitrans* con. En relación a *P. lutheri* e *Isochrysis* sp. son microalgas que presentan bajos contenidos de cenizas. Brown *et al.* (1989) registraron valores de entre el 6 y 9 % respectivamente. Sin embargo, se ha observado que el aplicar un inadecuado tratamiento de lavado al momento de filtrar microalgas que no cuentan con cubierta celular silícea da como resultado un alto contenido de cenizas, debido a los residuos de sales provenientes del cultivo que se quedan en el filtro (González, 1991). En general durante el presente estudio, se registraron elevados contenidos de ceniza independientemente de la especie de microalgas, indicando con ello la presencia de sales en los filtros. De manera similar, los porcentajes de cenizas obtenidos en las mezclas de microalgas utilizadas como alimento para *L. (N.) subnodosus* fueron elevados, lo cual sugiere que el lavado de los filtros conteniendo a las mezcla de microalgas también fueron insuficientes dando como resultado un alto contenido de sales. Sin embargo, las proporciones de cada una de las microalgas en las dietas fueron seleccionadas en base a trabajos previos, en donde no se registraron altos contenidos de cenizas en las dos

microalgas flageladas y en los cuales se confirmó que el género *Chaetoceros* si contiene un elevado contenido de cenizas (Brown *et al.*, 1989; Renaud *et al.*, 1999). Asimismo, la expresión de los resultados sobre el contenido bioquímico existente en las microalgas y organismos en base al peso seco orgánico de los mismos evitó una posible sobreestimación en los resultados de la composición bioquímica.

La elección de dietas compuestas por más de una microalga para la alimentación de *L. (N.) subnodosus* fue debido al hecho de que el uso de este tipo de dietas incrementa el valor nutricional del alimento que se esta proporcionando al organismo (Basch, 1996). Lo anterior puede ser el resultado de conjuntar los elementos nutricionales de más de una especie de microalgas en la dieta, con lo cual se mejora los porcentajes de los componentes o bien se elimina el déficit de alguno de ello que se encontraba en cantidades menores (Martínez *et al.*, 2000; Nikos y Lucas., 2000a). La composición bioquímica de cada una de las dietas utilizadas en los ensayos de alimentación en este trabajo fue afectada por la composición bioquímica de las microalgas presentes en ellas. El alto contenido de proteínas y ácidos grasos poliinsaturados principalmente el 20:4 ω 6 y el 20:5 ω 3 en *P. lutheri* dio como resultado la diferencia en el contenido de estos componente en las dietas que contenían esta microalga. Resultados similares se obtuvieron en las dietas que contenía la microalga *Isochrysis* sp. y *C. calcitras* en relación con la presencia de carbohidratos, lípidos y el ácido 22:6 ω 3. Lo cual confirma el hecho de que al formular dietas con más de dos microalgas enriquece la constitución de sus componentes bioquímicos.

Asimismo, se ha observado que la composición bioquímica de la dieta influye en el contenido bioquímico de los organismos (Flores-Vergara *et al.*, 2004). En el presente estudio, la composición bioquímica de las dietas influyó en el contenido de cada uno de los

elementos bioquímicos (proteínas, carbohidratos y lípidos) en las semillas de *L. (N.) subnodosus*, indicando con ello que las dietas proporcionaron los nutrientes necesarios para el organismo aunque en concentraciones diferentes dependiendo de la dieta proporcionada como alimento. El efecto del contenido de los ácidos grasos en la dieta sobre la composición de estos elementos en las semillas de *L. (N.) subnodosus* también fue notado en los experimentos de alimentación. Los porcentajes de los ácidos grasos poliinsaturados 18:2, 18:3, 20:4 ω 6, 20:5 ω 3 y 22:6 ω 3; así como del ácido graso monoinsaturado 16:1 y el ácido graso saturado 18:0 obtenidos en semillas de *L. (N.) subnodosus* cultivadas en algunos tratamiento fueron menores al final del experimento que al inicio del mismo, lo anterior puede deberse a la utilización de estos ácidos grasos de manera específica en algunas funciones del metabolismo de *L. (N.) subnodosus* como lípidos estructurales en las membranas celulares y en forma de sustratos metabólicos de energía. Reacciones de elongación y desaturación de ácidos grasos de 18 carbonos para formar ácidos grasos de cadena larga (20 carbonos) han sido registradas en otras especies de moluscos bivalvos. En el presente trabajo la disminución en el contenidos final de algunos ácidos grasos poliinsaturados de más de 20 carbonos en el tejido de los organismos con respecto al inicio del experimento, sugiere que a pesar de que el contenido de estos ácidos es alto en algunas dietas (M1 y M2) fueron necesarios los procesos de elongación y desaturación por parte de los organismos para cubrir sus requerimiento. Lo anterior puede ser un indicativo de que *L. (N.) subnodosus* requiere altas cantidades de estos ácidos grasos.

Además del efecto de la composición bioquímica del alimento sobre el contenido bioquímico de los organismos mencionada anteriormente, se ha observado que la temperatura influye en el contenido de las diferentes clases de ácidos grasos en los

organismos (Hazle, 1995). En general, el contenido de ácidos grasos saturados es mayor en organismos de aguas más templadas y la proporción de ácidos grasos insaturados se incrementa en temperaturas frías, esto último ocurre para mantener la fluidez de la membrana celular (Khériji *et al.*, 2003; Flores-Vergara *et al.*, 2004). En el presente trabajo las proporciones de las diferentes clases de ácidos grasos concuerdan con lo referido por otros autores, en relación a que el contenido de ácidos grasos insaturados fue menor que el de los saturados debido al hecho de que *L. (N.) subnodosus* se cultivo en temperaturas templadas.

Se ha encontrado que ciertos ácidos grasos influyen de manera importante en el metabolismo de los organismos (Sargent *et al.*, 1995). Asimismo, altos contenidos de ácidos grasos en la dieta de los organismos tiene un efecto positivo en su crecimiento, lo cual ha sido registrado en moluscos bivalvos (Flores-Vergara *et al.*, 2004). Como ya se ha mencionado anteriormente los ácidos grasos de la familia de los poliinsaturados principalmente el araquidónico (20:4 ω 6), eicosapentanoico (20:5 ω 3) y el docosahexanoico (22:6 ω 3) han reflejado en diversos estudios de alimentación que son parte fundamental para incrementar el crecimiento de ciertos organismos (Harel *et al.*, 2002; Sargent *et al.*, 2002). Los estudios sobre el efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en algunas especies de organismos bivalvos muestran que la presencia de los ácidos grasos 20:5 ω 3 y 22:6 ω 3 es determinante en el incremento de las tasas de crecimiento de estos organismos. Sin embargo, hay que recordar que los requerimientos nutricionales son diferentes en las distintas etapas de desarrollo y principalmente en cada una de las especies de organismos (Domingues *et al.* 2003). El ácido graso 20:4 ω 6 ha sido relacionado principalmente con organismos de agua dulce y su importancia radica en que es precursor de eicosanoides

fisiológicamente activos como las prostaglandinas; las cuales son utilizadas para la inducir los desoves en peces (Sargent *et al.*, 1995) y en la regulación hormonal (Won y Orth, 1994). Además, en tejidos de peces el ácido 20:4 ω 6 se localiza casi exclusivamente en la posición 2 de la molécula de glicerol dentro del inositol de los fosfolípidos el cual tiene un rol crítico en algunas áreas de señales de transducción celular (Sargent *et al.*, 1989). Aunque se ha observado que la cantidad necesaria del ácido 20:4 ω 6 en peces es muy pequeña y por ello se ha disminuido su importancia en el desarrollo de los organismos. Bell y Sargent (2003) sugieren que en estadios específicos de los peces altos niveles son requeridos para contrarrestar periodos de estrés salino, así como para obtener altas tasas de supervivencia y crecimiento, resultados similares fueron obtenidos por Harel *et al.* (2002). Otra de sus importantes funciones en los organismos es su influencia en la fluidez de la membrana celular y su relación con el colesterol. Lo anterior se relaciona al hecho de que los ácidos grasos son componentes de los fosfolípidos, por lo cual pueden influenciar los procesos de transporte de iones modulando la actividad enzimática (Brasitus *et al.*, 1985). Asimismo, se ha observado que el colesterol actúa como una molécula moderadora produciendo estados intermedios de fluidez, y por lo tanto junto con la presencia de ácidos grasos poliinsaturados como el 20:4 ω 6 y 20:5 ω 3 influyen en la permeabilidad de la membrana plasmática resultando en un óptimo transporte de nutrientes a las diferentes células del cuerpo del organismo (Martin, 1982; Parker-Barnes *et al.*, 2000). Además, se conoce que el colesterol es utilizado en otros procesos fisiológicos como la reproducción, debido a su papel de precursor de hormonas (Thompson *et al.*, 2003). En el caso de la almeja mano de león *L. (N.) subnodosus* a pesar de no ser una especie de ambiente dulceacuícola, la presencia de los ácidos grasos poliinsaturados (20:4 ω 6 y 20:5 ω 3) y su

relación con el colesterol al parecer influyeron de manera positiva en su crecimiento, demostrando que para esta especie grandes porcentajes del ácido 22:6 ω 3 no son necesarios durante la etapa de semillas. Lo anterior puede explicar los resultados obtenidos en el primer experimento, donde los mejores crecimiento registrados en de *L. (N.) subnodosus* fueron en las semillas alimentadas con las mezclas que contenía la microalga *Pavlova lutheri*, cuyos porcentajes de los ácidos 20:4 ω 6 y 20:5 ω 6 fueron superiores a *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros calcitrans*. Resultados similares en semillas de *L. (N.) subnodosus* fueron obtenidos por Cerón-Ortiz (2000) en condiciones de cultivo semejantes al presente trabajo.

Sin embargo, los resultados obtenidos en el segundo experimento de crecimiento, mostraron que los máximos crecimientos fueron obtenidos en los organismos alimentados con la dieta M3 que no contenía la microalga *Pavlova lutheri*, seguida por las dos dietas en las cuales se encontraba esta microalga. Lo anterior puede haberse debido al hecho de que al inicio del segundo experimento se registraron altas mortalidades en los tratamientos con M3, lo cual dio como resultado una variación en la densidad de organismos entre los diferentes tratamientos de alimentación. Por lo tanto hubo la necesidad, de realizar un tercer experimento en donde se confirmó que la densidad de organismos en el cultivo tiene un efecto sobre el crecimiento de *L. (N.) subnodosus* a la par de la calidad nutricional del alimento y la temperatura. Estos resultados concuerdan con los realizados por otros autores con diferentes especies de organismos, donde se ha observado que la densidad en los cultivos tiene un efecto significativo en sus tasas de crecimiento y en la supervivencia. Browne *et al.* (2003) registraron altas mortalidades, bajas tasas de metamorfosis y lento crecimiento de *Litoria aurea* cuando se cultivo en altas densidades. En peces se han registrado bajos crecimientos en larvas de *Paralichthys dentatus* (King *et al.*, 2000) y alta

predisponibilidad a enfermedades ocasionada por estrés en *Plecoglossus altivelis* (Iguchi *et al.*, 2003) cuando los organismos son cultivados en altas densidades. Asimismo, en juveniles de cefalopodos como *Sepia officinalis* se ha observado el efecto de la densidad sobre el crecimiento descrito anteriormente (Domínguez *et al.*, 2003). En moluscos se ha observado también el efecto negativo de altas densidades sobre el crecimiento de este grupo de organismos. Huchette *et al.* (2003) obtuvieron un efecto negativo en el crecimiento de juveniles de abulón (*Haliotis rubra*) cultivados a altas densidades. Ortiz-Cuel (1994) registró altas mortalidades en los cultivos larvarios de *L. subnodosus* con las densidades más elevadas. En el experimento de densidad realizado en este trabajo, se confirmó que los mejores resultados en el crecimiento de semillas de *L. (N.) subnodosus* se obtienen en las densidades más pequeñas y principalmente cuando se alimenta con las dietas que contienen altos contenidos de proteínas y ácidos grasos poliinsaturados (20:4 ω 6 y 20:5 ω 3), biomoléculas importantes en el desarrollo y crecimiento de los organismos.

El efecto de la temperatura en el crecimiento de los organismos es otro factor que debe de tomarse en cuenta en el cultivo de bivalvos, debido a que aumenta o disminuye las tasas de crecimiento de los organismos (Sicard *et al.*, 1999). En el presente trabajo, el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *L. (N.) subnodosus* fue registrado principalmente en los resultados de crecimiento en base al peso seco orgánico en el primer experimento y en general en todos los pesos (húmedo, seco total y seco orgánico) en el segundo experimento con las temperaturas de 23 y 26 °C. Estas mínimas diferencias entre los dos experimentos, pueden indicar que factores no controlados al momento de realizar los ensayos pudieron influir en el resultado obtenido en cada experimento. Por ejemplo, en granjas de camarón cuando se usa semilla capturada del medio natural se han obtenido

variaciones en los resultados de crecimientos en diferentes ciclos de producción dentro de la misma granja, lo cual puede ser debido a la diferencia genética (genotipos) entre los stocks de las semillas utilizadas en cada ciclo, dando como resultado variaciones en la respuesta de la media general de los organismos a los rangos óptimos de temperatura (Coman *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos en el crecimiento en base a la longitud y ancho de la concha de *L. (N.) subnodosus* tanto en el primer y segundo experimento de este trabajo en la temperatura de 23 y 26 °C indican que hubo un efecto de la temperatura sobre estos parámetros de crecimiento. Se ha observado que cuando los organismos se cultiva fuera del rango óptimo de temperatura para su crecimiento resulta en una disminución en las tasas de crecimiento de los mismos, debido al hecho de que la energía proporcionada por el alimento es dirigida al mantenimiento de las principales funciones metabólicas y por lo tanto el crecimiento pasa a un segundo termino (Widdows, 1978a). Algunas especies logran sobrevivir a los cambios ambientales a través de compensaciones fisiológicas, las cuales son una medida de su capacidad de adaptación a las fluctuaciones de medio. La escalopa *L. (N.) subnodosus* es un organismo que se localiza en un rango de temperatura entre los 10 y 27 °C, por lo cual en este trabajo, el efecto de las temperaturas de 23 y 26 °C no tuvieron un efecto marcado sobre su crecimiento y supervivencia en estas temperaturas. Sin embargo, los resultados de crecimiento obtenidos en el segundo experimento con los organismos mantenidos a 29 °C muestran un gran efecto de esta temperatura con respecto a la de 23 y 26 °C. Además, se registraron altas mortalidades en todos los tratamientos mantenidos a esta temperatura (29 °C) a partir de la segunda semana del cultivo. Lo anterior sugiere que la temperatura de 29 °C se encuentra fuera del rango óptimo de crecimiento para *L. (N.) subnodosus* en costas mexicanas y que la aclimatación de los organismos a esta

temperatura no logró un incremento en su rango óptimo de temperatura. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los obtenidos en los laboratorios de cultivo de moluscos bivalvos del Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste en La Paz Baja California, en donde se obtuvieron mortalidades mayores del 50 % en temperaturas superiores a los 30 °C (Robles, com. personal). Esto confirma el hecho de que *L. (N.) subnodosus* no es capaz de regular sus procesos metabólicos a temperaturas superiores a 27 °C y por lo tanto la descompensación producida por altas temperaturas con lleva a la muerte del organismo. La variación entre los resultados de crecimiento obtenidos en base al largo y ancho de la concha con respecto a los diferentes pesos, nos indican que es necesario conocer de manera individual el efecto de cualquier variable del cultivo sobre los distintos parámetros de crecimiento.

Así como también es necesario conocer la relación entre ellos antes de seleccionar algún parámetro como indicador del crecimiento. En el presente estudio, se realizaron diversos análisis de correlación entre los parámetros de crecimiento, obteniendo una alta correlación entre el largo y ancho de la concha de *L. (N.) subnodosus*, lo anterior indica que el uso de cualquiera de estos dos parámetros es suficiente como indicador del crecimiento de la concha. Correlaciones similares fueron obtenidas por De la Roche *et al.* (2002) entre el largo y ancho de larvas y post-larvas de *Nodipecten (Lyropecten) nodosus* con valores de R^2 iguales a 0.98 y 0.96 respectivamente. Asimismo, en el presente estudio se obtuvieron altas correlaciones entre el peso húmedo tanto con el peso seco total como el peso seco orgánico, lo cual sugiere la posibilidad de utilizar el peso húmedo como indicador de crecimiento sin necesidad de sacrificar organismos de manera continua para la obtención del peso seco total y peso seco orgánico. Sin embargo, las bajas correlaciones entre el peso

seco total y el peso seco orgánico, así como entre la longitud de la concha y los diferentes pesos, muestran que si lo que se necesita es obtener de una forma precisa el efecto de alguna variable sobre el crecimiento de *L. (N.) subnodosus* es recomendable conocer de manera individual su influencia sobre cada uno de los parámetros de crecimiento.

Asimismo, el efecto de la temperatura y la calidad nutricional del alimento tienen un efecto en las tasas de crecimiento de los organismos (Nakamura *et al.*, 2002). Sin embargo, las diferencias en las tasas de crecimiento registradas entre autores se deben a factores como la especie, el estadio de crecimiento y a la fórmula empleada para evaluar este parámetro. La cantidad de alimento disponible, es otro factor que influye en las tasas de crecimiento de los organismos, se ha observado que cuando la cantidad de alimento es el óptimo se registran *incrementos en las tasas de crecimiento de los organismo* (Steffani y Branco, 2003). Racotta *et al.* (2003) registraron en la escalopa *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus* una tasas de crecimiento en longitud de $0.25 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ durante el primer año y de $0.22 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ durante el segundo; y en relación al peso del organismo un incremento de 1.4 a $5.8 \text{ g}\cdot\text{m}^{-1}$. Resultados similares fueron obtenidos por García-Domínguez *et al.* (1992). Las diferencias entre las tasas de crecimiento antes mencionadas reflejan la influencia de la talla y el estado reproductivo de *N. (L.) subnodosus* sobre este parámetro. Los resultados en relación a las tasas de crecimientos en base al peso seco orgánico de *L. (N.) subnodosus* obtenidos en el presente estudios, muestran valores inferiores a los reportados anteriormente. Estas diferencias pueden explicarse debido a la diferencia en talla y en el estadio de los organismos. Además, los resultados obtenidos por los autores antes mencionados fueron registrados en organismos cultivados en medio natural, contrario a los realizados en este trabajo, los cuales se llevaron a cabo en el laboratorio. Asimismo, la

duración de los experimentos entre autores e incluso dentro de este trabajo son diferentes, lo cual es un factor que aunado a los anteriores puede explicar las diferencias en las tasas de crecimiento obtenidas en el primero y segundo experimento dentro de este estudio. Sin embargo, resultados similares a los obtenidos en esta investigación fueron registrados por Lora-Vilchis *et al.* (2004) en relación a las tasas de crecimiento de juveniles de *L. subnodosus* en cultivos de laboratorio.

Además de la temperatura, la densidad y la calidad nutricional de las dietas en los cultivos de organismos es necesario tomar en cuenta dos parámetros que forman parte importante en los experimentos de crecimiento y alimentación como lo son la ración alimenticia (concentración de alimento proporcionada) y la tasa de filtración. Asimismo es recomendable conocer la relación y la influencia de algunas variables como la temperatura, la cantidad de alimento y la talla de los organismos sobre estos dos parámetros (Sanina, 1976; Caers *et al.*, 1999). La temperatura tiene un efecto directamente proporcional sobre las tasas de filtración, incrementando sus valores conforme se eleva la temperatura hasta llegar a un punto en donde las tasas comienzan a declinar (López-Sánchez, 2003). Sin embargo, algunas especies de pectínidos como *Argopecten irradians* las tasas de filtración permanecen independientes de la temperatura (Kirby-Smith, 1970). Lo anterior sugiere que las diferentes especies de pectínidos poseen diferente capacidad de aclimatación a las temperaturas, lo cual dependerá de las condiciones de cultivo y de la cantidad de alimento que se les proporcione (Navarro, 2001). En relación a la concentración de alimento se ha registrado una disminución en las tasas de filtración conforme se incrementa la cantidad de alimento (Navarro y Winter, 1982; Lu y Blake, 1997). La calidad de alimento sobre las tasas de filtración también ha sido estudiado en diversos bivalvos, Díaz y Martínez (1992)

no registraron diferencias significativas entre las tasas de aclaración con respecto a las dietas utilizadas en juveniles de *Argopecten purpuratus*. Las tasas de filtración obtenidas en el presente trabajo mostraron resultados similares en relación al efecto de la calidad de la dieta sobre las tasas de filtración, las cuales fueron independientes de la dieta y de las temperaturas de 23 y 26 °C. Sin embargo, se registraron diferencias en las tasas de filtración entre las raciones alimenticias a través del tiempo mostrando una tendencia a aumentar los valores de la tasa de filtración hasta un punto donde las tasas se mantienen estables. La tendencia antes mencionada y el tiempo en que se alcanza esta estabilidad dependió de la temperatura (principalmente la de 29 °C) y la concentración del alimento (ración alimenticia), obteniéndose la estabilidad de las tasas de filtración en un periodo de tiempo más corto en las raciones de 100,000 y 200,000 cél·ml⁻¹. En relación al resultado de las tasas de filtración en las dos temperaturas antes mencionadas los más altos valores obtenidos en las raciones más pequeñas se relaciona al hecho de que una vez rebasada la ración alimenticia máxima (400,000 cél·ml⁻¹) para la especie cultivada la tasas de filtración disminuyen. Las diferencias obtenidas en la tasa de filtración entre el primero y el segundo experimento a las temperaturas de 23 y 26 °C (independientemente de la dieta) son debidas posiblemente a la diferencia en el peso de los organismos entre los dos experimentos, el cual es mayor en las semillas del primer experimento. Cole *et al.* (1992) y Caers *et al.* (1999) han propuesto la influencia del peso de los organismos sobre la tasa de filtración, quienes sugieren que la tasa de filtración es modificada por el peso del organismo. En relación a las tasas de filtración obtenidas en los organismos cultivados a 29 °C, el efecto de la temperatura y la concentración de alimento fueron mayores que en las temperaturas de 23 y 26 °C. El incremento en la temperatura resulta en un aumento en las tasas de filtración

hasta un cierto punto en el cual la filtración comienza a disminuir. Debido a lo anterior, en el segundo experimento en la temperatura de 29 °C los valores en las tasas de filtración fueron menores a las registradas en las temperaturas de 23 y 26 °C, asimismo independientemente de la dieta y la concentración de alimento el tiempo en el cual las tasas de filtración alcanzaron una estabilidad fue mayor que en las otras dos temperaturas. Debido a las tendencias de los resultados antes mencionados y a los datos obtenidos en Cerón-Ortiz (2000) con la misma especie, se confirma que la ración alimenticia óptima en un rango de 20 a 26 °C para semilla de *L. (N.) subnodosus* (con longitudes entre los 3 y 4 mm) es de 200, 000 cél·ml⁻¹.

La producción de pseudoheces por parte de los moluscos resulta de proporcionar a los organismos una concentración de alimento arriba de la ración óptima (Winter, 1973). En el presente trabajo se observó que al proporcionar a *L. (N.) subnodosus* la ración más elevada (400, 000 cél·ml⁻¹) dio como resultado la producción de pseudoheces y en la ración más pequeña (100, 000 cél·ml⁻¹) se obtuvo la ausencia de células microalgales antes de las 24 h indicando quizá una falta de alimento. Resultados similares fueron obtenidos por Cerón-Ortiz (2000) en la misma especie.

Otro de los aspectos por lo cual es importante el conocer la ración alimenticia óptima para cada especie de organismo, es el hecho de que si no se proporciona la cantidad indicada de alimento el crecimiento y algunos aspectos fisiológicos como la reproducción son afectados de gran manera por este factor, dando como consecuencia la sobreestimación de resultados. En el presente trabajo la obtención de la ración óptima para el cultivo de *L. (N.) subnodosus* bajo las condiciones de cultivo mencionadas en las

secciones anteriores nos aseguraron que la falta de alimento no fue un variable que influyó en los resultados de crecimiento.

El efecto de la temperatura y calidad nutricional del alimento además de verse reflejado en las tasas de filtración y el crecimiento de los organismos, puede observarse en el consumo de oxígeno y la excreción amoniacal (Díaz-Iglesias *et al.*, 1996). Se ha observado que cuando un organismo se encuentra en una situación de estrés, ya sea causado por un incremento de temperatura, por el estadio reproductivo o debido a la falta de alimento, las tasas de consumo de oxígeno y de excreción de amonio aumentan o disminuyen de acuerdo al factor que esta causando esta descompensación. Asimismo, se ha observado que el patrón de respuestas metabólicas puede variar entre especies (Mayzaud y Conover, 1988).

El consumo de oxígeno del organismo varía de acuerdo a la actividad fisiológica que se este desarrollando (Mayzaud y Conover, 1988). Haure *et al.* (2003) ha registrado incrementos en el consumo de oxígeno en las ostras *Crassostrea gigas* y *Crassostrea angulata* cuando realizan el proceso de filtración durante la alimentación. De manera similar, en juveniles de langostas *Panulirus argus* se registraron incrementos en el consumo de oxígeno en el periodo de alimentación (Díaz-Iglesias *et al.*, 1996). Asimismo, se conoce que los organismo incrementa su consumo de oxígeno al exponerlos a un aumento de temperatura, lo cual puede ser influido por la temperatura de aclimatación en la que se encuentre el organismo (Quinn, 1994). En el presente estudio tanto en el primer experimento como en el segundo se registro, en general, una tendencia ha disminuir el consumo de oxígeno a través del tiempo de duración del experimento, esto puede estar relacionado con el incremento de la talla del organismo. Zakes *et al.* (2003) han observado

que el consumo de oxígeno por parte de los organismos disminuye conforme aumenta la talla. En peces, lo anterior es relacionado a los cambios fisiológicos que ocurren durante la ontogénesis; así como al desarrollo del músculo en base al peso y a los cambio en el coeficiente de superficie/volumen de los órganos respiratorios (Post y Lee, 1996). Lo anterior puede explicar la tendencia registrada en el consumo de oxígeno por parte de *L. (N.) subnodosus* en este trabajo. Asimismo, es posible que esta relación entre la superficie y el volumen de los órganos respiratorios de los organismos sea la causa de la diferencia obtenida en el consumo de oxígeno entre el primero y segundo experimento, debido al hecho que la duración final de los dos experimentos fue diferente y por lo tanto los resultados de crecimiento entre ambos experimentos también fueron diferentes. En pectínidos el efecto de la talla sobre el consumo de oxígeno también ha sido reportado. Navarro *et al.* (2000) reportaron valores de consumo de oxígeno de $1.5 \text{ mlO}_2 \cdot \text{h}^{-1}$ en organismos de 3 g de peso seco en *Argopecten purpuratus*. Los cuales son mayores a los reportados por Navarro y González (1998) en las mismas especies pero de 1 g de peso seco. Los valores obtenidos en el primero y segundo experimento sobre el consumo de oxígeno por parte de semillas de *L. (N.) subnodosus* fueron menores al $0.002 \text{ mlO}_2 \cdot \text{h}^{-1}$ y a su vez a los obtenidos por los autores antes mencionados. Lo anterior esta relacionado con la talla de los organismos, debido a que el peso seco en el presente trabajo fue aproximadamente de 50 mg. Asimismo, el efecto de la calidad nutricional de la dieta no influyó en el consumo de oxígeno por parte de *L. (N.) subnodosus*; un efecto similar ha sido obtenido en *Argopecten purpuratus* (Díaz y Martínez, 1992; Farías *et al.*, 1997). Es importante tomar en cuenta que las diferencias registradas entre autores acerca del consumo de oxígeno son

debido principalmente a las variaciones de las condiciones del cultivo, a la talla, la reproducción y a la respuesta de las especies a variables como la temperatura y el alimento.

Al igual que el consumo de oxígeno, la excreción de amonio por parte de los organismos es afectada por las condiciones de cultivo principalmente la temperatura y el alimento. El catabolismo de las proteínas lleva a la formación de amonio, compuesto que representa el 60-90% del total de nitrógeno excretado en numerosas especies de bivalvos. La pérdida de energía por parte de organismos en condiciones óptimas de crecimiento es mínima. Sin embargo, se incrementan en gran medida durante los procesos reproductivos o en situaciones de estrés por deficiencias dietéticas mermando con ello al crecimiento (Navarro, 2001). Se ha observado que la producción de amonio depende de consumo de proteínas por parte del organismo y su relación con la etapa de desarrollo en la que se encuentra (Díaz-Iglesias *et al.*, 1996). En bivalvos, los resultados en relación al efecto de la calidad nutricional de las dietas (principalmente del contenido proteico) son controversiales. En *Argpecten purpuratus* no se han registrado diferencias significativas entre la calidad de la dieta y la producción de amonio (Díaz y Martínez, 1992; Farías *et al.*, 1997). En el presente trabajo se obtuvieron resultados similares, donde en general no se registraron diferencias significativas entre dietas sobre la producción de amonio. El efecto de la estación del año y el consumo de proteínas por parte de los organismos a través de ellas está relacionado directamente con la temperatura en las diferentes estaciones. Generalmente en la mayoría de los organismos la excreción de amonio es mayor en primavera-verano, cuando los organismos tienen mayor alimento disponible y son las proteínas el sustrato catabólico principal; inversamente, en el otoño-invierno la excreción de amonio disminuye debido a que el sustrato principal son los lípidos y carbohidratos

(Mayzaud y Conover, 1988). En el presente trabajo tanto en el primer experimento como en el segundo, en general se obtuvo una tendencia similar a la observada con el consumo de oxígeno, donde la excreción de amonio registró una disminución a través del tiempo. Asimismo, se obtuvieron diferencias en la excreción de amonio entre experimentos, similares a las obtenidas por el consumo de oxígeno. Las cuales también pueden ser explicadas por el efecto de la talla del organismo. Lo anterior ha sido mencionado por Zakes *et al.* (2003), quienes obtuvieron disminuciones en la excreción de amonio conforme aumento la talla del organismo.

En general, las diferencias registradas en las distintas semanas de muestreo entre las temperaturas de 23 °C y 26 °C con relación al consumo de oxígeno y la excreción de amonio en el primero y segundo experimento no fueron de forma constante, lo anterior sugiere que las semillas de *L. (N.) subnodosus* pueden ser cultivadas en cualquiera de estas dos temperaturas, ya que el efecto de ambas temperaturas en el consumo de oxígeno y la excreción de amonio será similar. La calidad nutricional de la dieta respecto a la excreción amoniaca indicó en el presente trabajo que el efecto del contenido proteico de la dieta sobre la excreción de amonio no fue significativo, ya que se registraron valores similares de producción de amonio independientemente de la dieta tanto en el primero y segundo experimento. Es sabido que el contenido bioquímico del tejido de los organismos depende de los requerimientos nutricionales según la etapa de desarrollo por la que atraviesan, la cual se relaciona estrechamente con la estación del año. En general, los carbohidratos y los lípidos son la principal fuente energética para la formación de gametos en invierno y las proteínas en el verano debido a su uso en el crecimiento somático de los organismos (Kreeger, 1993; Kreeger *et al.*, 1995). En el presente estudio, el alto contenido de proteínas

en el tejido de *L. (N.) subnodosus* al final de experimento así como los pequeños valores en la producción de amonio indicarían que la utilización de proteínas no fue significativa. Sin embargo, es importante recordar que el proporcionar una dieta con altas concentraciones de proteínas hace posible que el organismo mantenga una cantidad considerada de este elemento a manera de reserva. Asimismo, la escasa información sobre las cantidades de amonio excretadas y la cantidad de oxígeno consumido en escalopas principalmente en esta especie deben de ser tomados en cuenta al momento de comparar resultados. Sin embargo, se puede concluir que el efecto de la temperatura y calidad nutricional de las dietas sobre el consumo de oxígeno y excreción de amonio indican que esta especie es capaz de aclimatar su metabolismo a las diferentes dietas probadas y a las temperaturas de 23 y 26 °C.

Para conocer que tipo de sustrato metabólico es utilizado por el organismo en condiciones óptimas de cultivo o bajo la influencia de factores estresantes, existe una relación entre el consumo de oxígeno y la excreción de amonio por parte de los animales, la cual es conocida como razón atómica O:N (Mayzaud y Conover, 1988; Wang *et al.*, 2003).

La razón atómica nos indica el tipo de sustrato (proteínas, carbohidratos o Lípidos) utilizado por los organismos bajo una situación de estrés. Sin embargo, cuando los organismos se encuentran en condiciones óptimas para su crecimiento, la razón atómica O:N puede también ser un indicativo de la relación entre el organismo y el alimento proporcionado (Conover y Corner, 1968). En situaciones de estrés, valores bajos en la razón atómica O:N indican que los organismos han usado como sustrato principal a las proteínas, mientras altos valores son relacionados a la utilización de lípidos (Ikeda, 1977c; Mayzaud y Conover, 1988). Diferentes valores de O:N han sido sugeridos para el catabolismo de las proteínas como sustrato, como el 7 (Snow y Williams, 1971); el 8

(Conover y Corner, 1968) y el 9.3 (Bayne, 1973a). Las diferencias entre autores antes mencionadas se deben principalmente al método individual a la hora de manejar la composición elemental de la proteína, por lo cual un rango de entre 3 y 16 podría ser el óptimo. Sin embargo, asumiendo que 1g de proteína requiere de 0.94 l de oxígeno en el metabolismo oxidativo y que 1 g de lípido requiere 2.04 l, entonces se ha obtenido que una razón de O:N igual a 24 indica que el sustrato principal son los lípidos (Mayzaud y Conover, 1988).

En el presente experimento se obtuvieron valores menores a los sugeridos por Mayzaud y Conover (1998). Sin embargo, debido a los escasos estudios sobre la razón atómica O:N sobre *L. (N.) subnodosus* no podemos comparar con resultados previos al presente. Sumando además que los realizados hasta el momento son en organismos de tallas superiores a los manejados en el presente estudio. Los valores obtenidos indicarían que los organismos se encontraban en condición estresante para ellos según los valores propuestos por Bayne (1973a). Sin embargo, valores de O:N registrados en *Argopecten purpuratus* por Farías *et al.* (1997) se encuentran también por debajo de estos valores y no son considerados por los autores que los organismos están en situación de estrés, pero al comparar los resultados con el control se puede observar que el mantener los organismos sin alimentos provoca una disminución de más del 50 % del valor de la razón. Navarro y González (1998) concluyeron que una razón de O:N menor a 15 para *A. purpuratus* representa una condición desfavorable. Los diferencias valores de O:N registrados en diversas especies sugieren que junto con la determinación de la O:N es conveniente determinar otros indicadores que reflejen la condición de la especie, tales como el crecimiento potencial o la eficiencia neta de crecimiento, con el fin de poder determinar el

verdadero significado de los valores de la O:N (Navarro, 2001). A pesar de lo anterior, en este trabajo se registraron diferencias significativas entre dietas y temperaturas con respecto a la O:N. Los valores obtenidos en O:N menores a 1.5 indicarían que los organismos se encuentran en estrés y su sustrato principal es la proteína. Sin embargo, debido a que los organismos se encuentran en etapa de crecimiento, es posible que la demanda de los organismos por proteínas y que los mayores crecimientos con dietas altas en este componente indican que los valores de O:N dan referencia a sus requerimientos nutricionales (proteínas) y no por su estrés. Los valores finales de proteínas en el tejido de *L. (N.) subnodosus* al final de experimento indican que las microalgas suplieron la cantidad necesaria de este componente y que su utilización para el crecimiento somático no mermaron las reservas de proteínas. Por lo tanto, reafirma el hecho de que los resultados en la razón O:N son debido a los requerimientos de proteínas y no a una condición de estrés.

VII. CONCLUSIONES

La temperatura y la calidad nutricional de las microalgas usadas en el presente estudio registraron un efecto sobre el crecimiento de semillas de mano de león *L. (N.) subnodosus*.

El contenido bioquímico de las mezclas de microalgas es reflejado en el tejido de semillas de *L. (N.) subnodosus*.

La conjunción de altos contenidos de proteína y ácidos grasos poliinsaturados en la dieta tiene un efecto positivo en el crecimiento de semillas de *L. (Nodipecten.) subnodosus*.

Es necesarios realizar más investigaciones sobre la capacidad de *L. (Nodipecten.) subnodosus* para sintetizar ácidos grasos de más de 20 carbonos a partir de ácidos grasos de 18 carbonos, así como la presencia de las enzimas encargadas de realizar la desaturación y elongación en las cadenas de carbono.

Es necesario incrementar estudios acerca de la influencia del colesterol y los ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares de *Lyropecten* y saber si tienen un efecto positivo en el crecimiento.

El crecimiento y supervivencia de *L. (Nodipecten) subnodosus* son afectada negativamente en altas densidades.

El consumo de O₂ y la excreción de amonio disminuyen conforme se incrementa el peso del organismo.

Los resultados obtenidos en la razón O:N, indican que en etapa de semilla las proteínas son el sustrato metabólico principal usado durante el crecimiento en semillas de *L. (N.) subnodosus*.

LITERATURA CITADA

- Andersen, R.A. 2005. Algal culturing techniques. Pyicological Society of America. Elsevier Academic press. 577 p.
- Angulo-Escarcega, C.A. 2001. Evaluación cuantitativa y cualitativa de las microalgas cultivadas en un laboratorio comercial. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa. Mazatlán, México. 59 pp.
- Albentosa, M., R. Beiras y A. Pérez. 1994a. Determination optimal thermal conditions for growth of clam (*Venerupis pullastra*) seed. Aquaculture, 126:315-328 p.
- Albentosa, M., U. Labarta, A. Pérez-Camacho, M.J. Fernández-Reriz y R. Beiras. 1994b. Fatty acid composition of *Venerupis pullastra* spat fed on different microalgae diets. Comp. Biochem. Physiol. 108A(4):639-648 p.
- Albentosa, M., A. Pérez, U. Labarta y M.J. Fernández. 1996. Evaluation of live microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. Aquaculture, 148:11-23 p.
- Albentosa, M., A.Pérez, U. Labarta y M.J. Fernández. 1997. Evaluation of freeze-dried for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. Aquaculture, 154:305-321 p.
- Araya, P., A. Pozo, M. Avendaño y R. Escribano. 1993. Dinámica de alimentación de individuos *Argopecten purpuratus* L. en condiciones de laboratorio. Rev. Biol. Mar. 28(2):313-329 p.
- Baqueiro, E., J.A. Massó y H. Guajardo. 1982. Distribución y abundancia de moluscos de importancia comercial en Baja California Sur. Serie divulgación Inst. Nal. Pesca, Sria. de Pesca, 11:32 pp.
- Basch, L.V. 1996. Effects of algal and larval densities on development and survival of asteroid larvae. Mar. Biol., 126:693-701 p.
- Bayne, B.L. 1973a. Aspects of the metabolism of *Mytilus edulis* during starvation. Netherlands J. Sea Res. 7:399-410 p.
- Bayne, B.L. 1973b. Physiological changes in *Mytilus edulis* L. induced by temperature and nutritive stress. J. Mar. Biol. 53:39-58 p.
- Bell, J.G. y J.R. Sargent. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. Aquaculture, 218:491-499 p.

- Bligh, E.G. y W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917 p.
- Bougrier, S., P. Geairon, J.M. Deslous, C. Bacher y G. Jonquieres. 1995. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rate of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 134:143-154 p.
- Bougrier, S., A.J.S. Hawkins y M. Heral. 1997. Preingestive selection of different microalgal mixture in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis*, analysed by flow cytometry. *Aquaculture*, 150:123-134 p.
- Brasitus, T.A., N.O. Davison y D. Schachter. 1985. Variations in dietary triacylglycerol saturation alter the lipid composition and fluidity of rat intestinal plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 812 :460-472 p.
- Brown, M.R., S.W. Jeffrey y C.D. Garland. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a Literature review. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Marine Laboratories (CSIRO), Report. 205, 44 pp.
- Brown, M.R., C.D. Garland, S.W. Jeffrey, I.D. Jameson y J.M. Leroi. 1993. The gross and amino acid composition of batch and semi-continuous culture of *Isochrysis* sp. (Clone T.Iso), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *J. of Applied Phycology* 5:285-296.
- Brown, M.R., M.A. McCausland y K. Kowalski. 1998. The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture*, 165:281-293 p.
- Browne, R.K., M. Pomering y A.J. Hamer. 2003. High density effects on the growth, development and survival of *Vitoria aurea* tadpoles. *Aquaculture*, 215:109-121.
- Burgueño-Loaiza, R. 2002. Efecto de la temperatura y de la luz sobre la composición y el valor dietético de la microalga *Isochrysis* "Tahiti" para el cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa. Mazatlán, México. 55pp.
- Caers, M., P. Coutteau y P. Sorgeloos. 1999. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L) spat. *Aquaculture* 170:307-322 p.
- Castagna, M. y J.N. Kraeuter. 1981. Manual for growing the hard clam *Mercenaria*. Special Report in Applied Marine Science and Ocean Engineering, 249:110 pp.

- Cerón-Ortiz, A.N. 2000. Evaluación de tres mezclas bialgales sobre el crecimiento de la almeja mano de león *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus*. Tesis de Maestría en Ciencias. CICESE 99 pp.
- Chisti, Y. 2000. Marine biotechnology – a neglected resource. En: Biotechnology Advances 18. Editorial 18 (ed.). 547-548 p.
- Coman, G.J, P.J. Crocos, N.P. Preston y D. Fielder. 2002. The effects of temperature on the growth, survival and biomass of different families of juvenile *Penaeus japonicus* Bate. Aquaculture, 214:185-199.
- Conover, R.J. y E.D.S Corner. 1968. Respiration and nitrogen excretion by some marine zooplankton in relation to their life cycles. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 48:49-75 p.
- Cole, B.E., J.K. Thompson y J.E. Cloern. 1992. Measurement of filtration rates by infaunal bivalves in a recirculating flume. Mar. Biol. 113:219-225 p.
- Cordero, B. y D. Voltolina. 1994. Growth of *Mytilus galloprovincialis* fed with four microalgae and two feeding regimes. J. World Aquaculture Society. 25 (3):471-474 p.
- Coutteau, P., K. Curé y P. Sorgeloos. 1994. Effect of algal ration on feeding and growth of juvenile manila clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve). J. Shellfish Res., 13 (1):47-55 p.
- Cury, P. y C. Roy. 1989. Optimal environmental window and pelagic fish recruitment success in upwelling areas. J. of Fish. and Aquatic Sciencies. 46:670-679.
- D'Abramo, L.R. y S-S. Sheen. 1993. Polyunsaturated fatty acid nutrition in juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture, 115: 63-83 p.
- De la Roche, J.P., B. Marín, L. Freitas y A. Véles. 2002. Embryonic development and larval and post larval growth pf the tropical scallop *Nodipecten (Lyropecten) nodosus* (L. 1758) (Mollusca:Pectinidae). Aquaculture Research, 33:819-827 p.
- Díaz-Iglesias, E., R.N. de L. Conceicao, R. Brito-Pérez y M. Báez-Hidalgo. 1996. Consumo de oxígeno y excreción de amoniaco de juveniles de langosta *Panulirus argus* (Latreille, 1804) alimentados con dieta natural: incremento de calor aparente y relación O:N. Rev. Invest. Mar., 17(1):51-58 p.
- Díaz, M.A. y G. Martínez. 1992. Efecto de diferentes dietas sobre el balance energético en juveniles de *Argopecten purpuratus* L. Rev. Biol. Mar. Valparaíso, 27(2):163-173 p.
- De Pauw, N. y G. Persoone. 1988. Micro-algae for aquaculture. En: M.A. Borowitzka y L.J. Borowitzka, (eds.). Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, New York. 197-221 p.

- Díaz-Herrera, F., C.E. Pérez, F.J. Luna, G.A. Tapia y V.C. Rosas. 1992. Consumo de oxígeno, excreción de amonio y osmorregulación en juveniles de *Callinectes similis* Williams (Crustacea: Portunidae) expuestos a salinidades fluctuantes. *Ciencias Marinas*. 18 (3):93-104 p.
- Domingues, P., R. Poirier, L. Dickel, E. Almansa, A. Sykes y J.P. Andrade. 2003. Effects of culture density and live prey on growth and survival of juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Aquaculture International*, 11:225-242 p.
- Dubinsky, Z., K. Matsukawa y I. Karube. 1995. Photobiological aspects of algal mass culture. *J. Marine Biotechnology*. 2:61-65 p.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28:350-356 p.
- Dunstan, G.A., J.K. Volkman, S.W. Jeffrey y S.M. Barrett. 1992. Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 2. Lipid classes and fatty acid. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 16:115-134 p.
- Farías, A., I. Uriarte y P. Varas. 1997. Estudio de los requerimientos nutricionales del ostión del norte *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) durante el acondicionamiento reproductivo. *Rev. Biol. Mar. Ocean.* 32(2):127-136 p.
- Fidalgo, J.P., A. Cid, I. López-Muñoz, J. Abalde y C. Herrero. 1994. Growth and biochemical profile of juvenile mussels (*Mytilus galloprovincialis*) fed on different algal diets. *J. Shellfish Res.* 13(1):67-75 p.
- Fidalgo, J.P., A. Cid, E. Torres, A. Sukenik y C. Herrero. 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 166:105-116 p.
- Flores-Vergara, C., Cordero-Esquivel B., Cerón-Ortiz A.N. y Arredondo-Vega B.O. 2004. Combined effects of temperatura and diet on growth and biochemical composition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) spat. *Aquaculture Res.*, 35: 1131-1140 p.
- García-Domínguez, F., P. Castro y E.F. Felix. 1992. Spat settlement and early growth of *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1835) in Laguna Ojo de Liebre, B.C.S., México, 1989-1990. *J. Shellfish Res.* 11 (1):195 p.
- García-Pamánes. 1994. Desarrollo de tecnología para el cultivo integral de la almeja mano de león (*Lyropecten subnodosus*). Instituto de Investigaciones Oceanológicas de Ensenada, B.C., México.

- Ghiretti, F. 1966. Respiration. En: K.M. Wilbur y C.M. Yonge (eds.). Vol. 2. Physiology of Molluscs. 175-203 p.
- González, M.S. 1991. Determinación de la tasa de dilución óptima y de contenido proteico de tres especies de microalgas cultivadas en un sistema semicontinuo. Tesis de Maestría. C.I.C.E.S.E.
- Griffiths, R.J. 1980. Filtration, respiration and assimilation in the black mussel *Choromytilus meridionalis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 3:63-70 p.
- Griffiths, C.L. y R.J. Griffiths. 1987. Bivalvia. En: T.J. Pandian y F.J. Vernberg (eds.). Animal Energetics. Bivalvia through reptilia. Academic Press., San Diego, C.A. 2:1-88 p.
- Guevara-Ponce, E.Y. 2002. Evaluación del efecto de la temperatura y de la iluminación en cultivos semicontinuos de la diatomea *Chaetoceros mulleri* utilizada como alimento para larvas de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa. Mazatlán, México. 57 pp.
- Guillard, R.L. y J.H. Rhyter. 1962. Studies on marine planctonic diatoms I.- *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Grand. Can. J. Micro. 8:229-239 p.
- Harel, M., W. Koven, I. Lein, Y. Bar, P. Behrens, J. Stubblefield, Y. Zohar y A.R. Place. 2002. Advanced DHA, EPA and ARA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. Aquaculture, 213:347-362 p.
- Haure, J., C. Penisson, S. Bougrier y J.P. Baud. 1998. Influence of temperature on clearance and oxygen consumption rates of the flat oyster *Ostrea edulis*: determination of allometric coefficients. Aquaculture, 169:211-224 p.
- Haure, J., A. Huvet, H. Palvadeau, M. Nourry, C. Penisson, J.L.Y. Martin y P. Boudry. 2003. Feeding and respiratory time activities in the cuppe oysters *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* and their hybrids. Aquaculture, 218:539-551 p.
- Hazel, J.R. 1995. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation/. Annu. Rev. Physiol. 57:19-42 p.
- Hoffman, K.H. 1983. Metabolic and enzyme adaptation to temperature and pressure. En: P.W. Hochachka (ed.), The molluska, Academic Press 2:220-256 p.
- Huchette, S. M.H., C.S. Koh y R.W. Day. 2003. Growth of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*) in aquaculture tanks: effects of density and ammonia. Aquaculture, 219:457-470 p.

- Iguchi, K., K. Ogawa, M. Nagae y F. Ito. 2003. The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture*, 220:515-523 p.
- Ikeda, T. 1977. The effect of laboratory conditions on the extrapolation of experimental measurements to the ecology of marine zooplankton. IV. Changes in respiration and excretion rates of boreal zooplankton species maintained under fed and starved conditions. *Mar. Biol.*, 41:241-252 p.
- Jorgensen, C.B., P.S. Larsen y H.U. Riisgaard. 1990. Effects of the temperature on the mussel pump. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 64:89-97 p.
- Keen, A.M. 1971. Sea shells of tropical West American. Marine mollusks from Baja California to Perú. Stanford University Press. Stanford.
- Khérijji, S., M. EL. Cafsi, W. Masmoudi, J.D. Castell y M.S. Romdhane. 2003. Salinity and temperature effects on the lipid composition of mullet sea fry (*Mugil cephalus*, Linne, 1758). *Aquaculture International*, 11:571-582 p.
- King, N.J., W.H. Howell, M. Huber y D.A. Bengtson. 2000. Effects of larval stocking density on laboratory-scale and commercial-scale production of summer flounder *Paralichthys dentatus*. *J. World Aquaculture Society*, 31:436-445 p.
- Kinsella, J.E. 1990. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 52(1):1-28 p.
- Kirby-Smith, W.W. 1970. Growth of the scallops, *Argopecten irradians concentricus* (Say) and *Argopecten gibbus* (Linne), as influenced by food and temperature. Ph.D. Thesis, Duke University, Durham, North Carolina, 126 pp.
- Kreeger, D.A. 1993. Seasonal patterns in utilization of dietary protein by the mussel *Mytilus trossulus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 95:215-232 p.
- Kreeger, D.A., A.J.S. Hawkins, B.L. Bayne y D.M. Lowe. 1995. Seasonal variation in the relative utilization of dietary protein for energy and biosynthesis by the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 126:177-184 p.
- Langton, R.W., J.E. Winter y O.A. Roels. 1977. The effect of ration size on the growth and growth efficiency of the bivalve mollusc *Tapes japonica*. *Aquaculture*. 12:283-292 p.
- López-Sánchez, J.A. 2003 Tasa de filtración y aclaración en la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835) a dos tallas, en función de la temperatura y cantidad de alimento. Tesis de Maestría en Ciencias. CIBNOR, S.C. 85 pp.

- Lora-Vilchis, M.C., M. Robles-Mungaray, N. Doctor y D. Voltolina. 2004. Food value of four microalgae for juveniles of the lion's paw scallop *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1833). *Aquaculture Research*, 35:1086-1091 p.
- Lowry, H.O., N.J. Rosebrough, A. Lewis Farr y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biological Chemistry*, 193:265-275 p.
- Lu, Y.T. y N.J. Blake. 1997. Clearance and ingestion rates of *Isochrysis galbana* by larval and juvenile bay Scallops *Argopecten Irradians concentricus* (Say). *J. Shellfish Res.* 16(1):47-54 p.
- Lu, Y.T., N.J. Blake y J.J. Torres. 1999. Oxygen consumption and ammonia excretion of larvae and juveniles of the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (SAY). *J. Shellfish Res.* 18 (2): 419-423 p.
- Martin. D.W. 1982. Membranas. En: D.W. Martin, V.W. Rodwell y P.A. Mayes (eds.). *Bioquímica de Harper*. 413-427 p.
- Martínez, G., Cristián A. y L. Mettifogo. 2000. Interactive effects of diets and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture* 183:149-159 p.
- Mayzaud, P. y Conover, E.R. 1988. O:N atomic ration as a tool to describe zooplankton metabolism. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 45:289-302 p.
- Mohlenberg, F. y H.U. Riisgard. 1979. Filtration rate, using a new indirect technique in thirteen species of suspensión- feeding bivalves. *Marine Biology* 54:143-147 p.
- Muller-Feuga, A. 2004. Microalgae for Aquaculture. The current global situation and future trends. 352-363 pp. En: A. Richmond (ed.) *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd. 566 p.
- Muller-Feuga, A., J.Moal y R. Kaas. 2003. The microalgae of Aquaculture. 206-252 p. En: J.G. Støttrup y L.A. McEvoy. (eds.). *Live feeds in marine aquaculture*. Blackwell Science Ltd. Berlin Germany. 317 p
- Nakamura, Y., M. Hagino, T. Hiwatari, A. Iilima, K. Kohata y T. Furota. 2002. Growth of the manila clam *Ruditapes philippinarum* in Sanbanse, the shallow coastal area in Tpkyo Bay. *Fisheries Science*, 68:1309-1316 p.
- Navarro, J.M. y J.E. Winter. 1982. Ingestion rate, assimilation efficiency and energy balance in *Mytilus edulis* in relation to body size and different algal concentrations. *Mar. Biol.* 67:255-266 p.

- Navarro, J.M. y C.M. González. 1998. Physiological responses of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* to decreasing salinities. *Aquaculture* 167:315-327 p.
- Navarro, J.M., G.E. Leiva, G. Martínez y C. Aguilera. 2000. Interactive effects of diet and temperatura on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditiong, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 247:67-83 p.
- Navarro, J.M. 2001. Fisiología Energética de Pectínidos Iberoamericanos. En: A.N. Maeda-Martínez (ed.). *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamerica: Ciencia y Acuicultura*. Limusa, Noriega-Editores, México, 3:61-76 p.
- Nikos, L. y I.A.N. Lucas. 2000. The nutritional value of algae growth under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. larvae. *Aquaculture* 182:301-315 p.
- Ortiz-Cuel, G. 1994. Efecto de la ración alimenticia y la densidad de cultivo sobre el desarrollo larval de *Lyropecten subnodosus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California, México. 58 pp.
- Pande, S.V., R. Parvin Khan y T.A. Venkitasubramanian. 1963. Microdetermination of lipid and serum total fatty acid. *Analyt. Biochem.*, 6:415-423 p.
- Parés-Sierra, G. 1996. Efecto del Flujo y concentración de alimento sobre el crecimiento, el peso y la tasa de filtración de escalopas juveniles (*Lyropecten subnodosus*). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California, Baja California, México.
- Parker-Barnes, J.M., T. Das, E Bobik, A.E. Leonard, J.M. Thurmond, L.-T. Chaung, Y.-S. Huang y P. Mukerji. 2000. Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *PNAS*, 97(15):8284-8289 p.
- Pérez-Martínez, T. 2002. Efectos de la temperatura y de la iluminación en cultivos de *Chaetoeros calcitrans*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa. Mazatlán, México. 45 pp.
- Phatarpekar, P.V., R.A. Screepada, C. Pednekar y C.T. Achuthankutty. 2000. A comparative study on growth performance and biochemical composition of mixed culture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* with monocultures. *Aquaculture*, 181:141-155 p.
- Post, J.R. y J.A. Lee. 1996. Metabolic ontogeny of teleost fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53 :910-923 p.
- Quinn, J.M., G.L. Steele, C.W. Hickey y M.L. Vickers. 1994. Upper thermal tolerances of twelve New Zealand stream invertebrate species. *J. Mar. Freshwat. Res.* 28 :391-397 p.

- Racotta, I.S., J.L. Ramírez, A.M. Ibarra, M.C. Rodríguez-Jaramillo, D. Carreño y E. Palacios. 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. Aquaculture, 217 :335-349 p.
- Rangel, D.C. 1990. El cultivo de moluscos marinos en México. En: G. De la Lanza-Espino y J.L. Arredondo-Figueroa (eds.). La acuicultura en México: de los conceptos a la producción. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 107-138 p.
- Renaud, S.M., L.V. Thinh y D. L. Parry. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. Aquaculture 170: 147-159 p.
- Reyes, C.F. 1986. Preliminary results on spat collection and grown of the catarina scallop, *Argopecten circularis*, in Bacochibampo Bay, Guaymas, Sonora, México. En: F. Williams. (ed.) Proc. XXXVII Ann. Rep. Gulf Carib. Fish. Inst. 37: 201-208 p.
- Reyes S.C. 1990. El cultivo de pectínidos en México. Serie Científica, U.A.B.C.S., México, 1 (No. Esp. 1 AMAC): 25-29 p.
- Reyes-Zamorano, D.R. 2002. Influencia de la temperatura y de la intensidad de luz sobre la composición y el valor dietético de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* para la cría de larvas de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa. Mazatlán, México. 59 pp.
- Riisgard, H.U. y A. Randlov. 1981. Energy budget, growth and filtration rates in *Mytilus edulis* at different algal concentrations. Marine Biology 61:227-234 p.
- Riisgard, H.U. 1991. Filtration rate and growth in the blue mussel, *Mytilus edulis* Linneaus, 1758: Dependence on algal concentration. J. Shelfish Res. 10(1):29-35 p.
- Rodier, J. 1978. Análisis de las aguas: aguas naturales, aguas residuales, aguas del mar. Omega. Barcelona. 138-140 p.
- Ruiz, C.A. y C. Cáceres. 1991. Experimental spat collection of scallops *Argopecten circularis* (Sowerby, 1985) and *Pecten vogdesi* (Arnold, 1906) on a filament substrate in Falsa Bay, B.C.S. México. En: S. E. Shumway y P.A. Sandifer (eds.). World Aquaculture Workshops, 1:21-26 p.
- Sanina, L. V. 1976. Rate and intensity of filtration in some caspian sea bivalve mollusk. Oceanology (U.S.S.R.) 15:496-498 p.
- Sargent, J.R., R.J. Henderson y D.R. Tocher. 1989. The lipidis. In. Halver, J.E. (Ed.), Fish Nutrition, 2nd Academis Press, San Diego, CA,. 153-218 p.

- Sargent, J.R., J.G. Bell, M.V. Bell, R.J. Henderson y D.R. Tocher. 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Ichthyol*, 11:183-198 p.
- Sargent, J.R., D.R. Tocher y J.G. Bell. 2002. The lipidis. En. J. E. Halver y R.W. Hardy, (eds.). *Fish Nutrition*, Elsevier, USA. 181-257 p.
- Sato, N. y N. Murata. 1988. Membrane lipids. *Methods and Enzimology*. 167:251-259 p.
- Schurink, C.V.E. y C.L. Griffiths. 1992. Physiological energetics of four south african mussel species in relation to body size, ration and temperature. *Comp. Biochem. Physiol.* 101A (4):779-789 p.
- Shelef, G. y C.J. Soeder (eds). 1980. *Algal biomass. Production and use*. Elsevier-North Holland Biomedical Press. Amsterdam. 852 pp.
- Show, N.B. y LeB P.J. Williams. 1971. A simple method to determine the O:N ratio of small marine animals. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 51:105-109 p.
- Sicard, M.T., A.N. Maeda-Martínez, P. Ormart, T. Reynosos-Granados y L. Carvalho. 1999. Optimum temperatura for growth in the catarina scallop (*Argopecten ventricosus-circularis*, Sowerby II, 1842). *J. Shellfish Res.* 18:385-392 p.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343. En: J. R. Stein (ed.). *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Southgate, P.C.; A.C. Beer, P.F. Duncan y R. Tamburri. 1998. Assessment of the nutritional value of three species of tropical microalgae, dried *Tetraselmis* and a yeasbased diet for larvae of the blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.). *Aquaculture*, 162:247-257 p.
- Sprung, M. y U. Rose. 1988. Influence of food size and quantity on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha*. *Oecologia* 77:526-532 p.
- Steffani, C.N. y G.M Branch. 2003. Growth rate, condition, and shell shape of *Mytilus galloprovincialis*: responses to wavw exposure. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 246:197-209 p.
- Stern, S., Borut, A. y Cohen, D. 1984. The effect of satinity and ion composition on oxygen consumption and nitrogen excretion of *Macrobrachium rosenbergii*. *Com. Bioch. Phys.*, 79A: 271-274 p.
- Sukenik A. y R. Wahnnon. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 97:64-72 p.

- Sukenik, A., O. Zmora y Y. Carmeli. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture*, 117:313-326 p.
- Sukenik, A., H. Takahashi y S. Makady. 1994. Dietary lipids from marine unicellular algae enhance the amount of liver and blood omega-3 fatty acids in rats. *Ann. Nutr. Metab.*, 38:85-96 p.
- Tomaselli L. 2004. The microalgal cell. 3-19 pp. En: A. Richmond (ed.) *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd. 566 p.
- Thompson, P.A., D.J.S. Montagnes, B.A. Shaw y P.J. Harrison. 1994. The influence of three algal filtrates on the grazing rate of larval oysters (*Crassostrea gigas*), determined by fluorescent microspheres. *Aquaculture*, 119:237-247 p.
- Thompson, K.R., L.A. Muzinic, T.D. Christian y C.D. Webster. 2003. Effect on growth, survival, and fatty acid composition of Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* fed practical diets with and without supplemental lecithin and/or cholesterol. *Journal World Aquaculture Society*, 34(1): 1-10 p.
- Tonon, T., D. Harvey, T.R. Larson y I.A. Graham. 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry*, 61:15-24 p.
- Trujillo-Valle, M.L. y D. Voltolina. 1994. Cultivos de microalgas para la acuicultura. *Serie Científica, U.A.B.C.S. No. Especial 2(1):73-85*.
- Ulrik, H. 1991. Filtration rate and growth in the blue mussel, *Mytilus edulis* L., 1758: Dependence on algal concentration. *J. Shellfish Res.*, 10:29-35 p.
- Urban, E.R.Jr., G.D. Pruder y C.J. Langdon. 1983. Effect of ration on growth and growth efficiency of juveniles of *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Shellfish Res.* 3 (1):51-57 p.
- Uriarte, I. y A. Farías. 1999. The effect of dietary protein content on growth and biochemical composition of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) postlarvae and spat. *Aquaculture*, 180:119-127 p.
- Volkman, J.K., G. A. Dunstan, S.M. Barrett, P.D. Nichols y S.W. Jeffrey. 1992. Essential polyunsaturated fatty acid of microalgae used as feedstocks in aquaculture. En: G. L. Allan y W. Dall (eds.), *Proc. Aquaculture Nutrition Workshop*, Salamander Bay, 15-17 April 1991. NSW Fisheries, Brackish Water Fish Culture Research Station, Salamander Bay, Australia, pp. 180-186 p.

- Wang, A.-L., W.-N. Wang, Y. Wang, L.-X. Shang, Y. Liu y R.Y. Sun. 2003. Effect of dietary vitamin C supplementation on the oxygen consumption, ammonia-N excretion and Na⁺/K⁺ ATPase of *Macrobrachium nipponense* exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*, 220:833-841 p.
- Ward, J.E., H.K. Cassel y B.A. MacDonald. 1992. Chemoreception in the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). I. Stimulatory effect of phytoplankton metabolites on clearance and ingestion rates. *J. Exp. Mar. Biol. and Ecol.*, 163:235-250 p.
- Webb, K.L. y F.L. Chu. 1982. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. En: G.D. Pruder, C. Langdon y D. Conklin (eds.): *Biochemical and physiological Approaches to Shellfish Nutrition*. Wold. Mari. Soc. Spec. Publ. 2, Baton Rouse, Lousiana. 272-291 p.
- Widdows, J. 1978a. Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol.* 58:109-124 p.
- Widdows, J. 1978b. Physiological indices of stress in *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 58:125-142 p.
- Wikfors, G. 1986. Alterin growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture*, 59:1-14 p.
- Winter, J.E. 1973. The filtration rate of *Mytilus edulis* and its dependence on algal concentration, measured by a continuos automatic recording apparatus. *Mar. Biol.* 22:317-328 p.
- Won, J.G.S. y D.N. Orth. 1994. Role of lipoxxygenase metabolites of arachidonic acid in the regulation of adrenocorticotropin secretion by perfused rat anterior pituitary cells. *Endocrinology*, 135: 1496-1503 p.
- Yantian, T. Lu. y N.J. Blake. 1996. Optimum concentration of *Isochrysis galbana* for growth of larvae and juvenile bay scallops *Argopecten irradians concentricus* (Say). *J. Shellfish Res.* 15(3):635-643 p.
- Zakes, Z., K. Demska-Zakes y K. Kata. 2003. Rates of oxygen consumption and ammonia excretion of juvenile Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. *Aquaculture International*, 11:277-288 p.
- Zmora, O. y A. Richmond. 2004. Microalgae for aquaculture. Microalgae production for aquaculture. 365-391 pp. En: A. Richmond (ed.) *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd. 566 p.