

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE  
EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

**EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE  
PRESERVACIÓN DE DIETAS DE MICROALGAS Y  
SU EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *MYTILUS  
GALLOPROVINCIALIS* LAMARCK**

TESIS  
DOCTORADO EN CIENCIAS

**BEATRIZ CORDERO ESQUIVEL**

Ensenada, Baja California, México, junio de 1994.

**RESUMEN** de la tesis de la M. en C. Beatriz Cordero Esquivel presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** en **OCEANOGRAFIA** con opción en **ECOLOGIA MARINA**. Ensenada, Baja California, México. Junio de 1994.

EVALUACION DE DIFERENTES METODOS DE PRESERVACION DE DIETAS  
DE MICROALGAS Y SU EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO  
DE *Mytilus galloprovincialis* Lamarck.

Resumen aprobado por:

Se ensayaron tres formas de preservación de las microalgas *Chaetoceros* sp. y *Phaeodactylum tricornutum*: secadas a 30 °C, congeladas a -20 °C y liofilizadas. Estas dietas se almacenaron por un período de 60 días antes de utilizarlas como alimento para *Mytilus galloprovincialis*. Los incrementos en el crecimiento de la concha y del tejido de los mejillones alimentados con estas microalgas preservadas resultaron ser significativamente inferiores a los registrados en organismos alimentados con microalgas frescas. Como dieta, *Chaetoceros* en forma fresca resultó mejor que *Phaeodactylum*.

Los métodos de preservación por desecación y liofilización causaron cambios en la composición proximal de las microalgas, sobre todo en la pérdida de la fracción lipídica. Con el método de preservación por congelación los cambios bioquímicos que se produjeron fueron menores en *Chaetoceros* sp., sin embargo, en *Phaeodactylum tricornutum* las alteraciones bioquímicas cuantitativas de las proteínas fueron notables. En general estas técnicas de preservación no afectaron los perfiles de aminoácidos y de ácidos grasos de ambas microalgas.

Para mejorar estos resultados se ensayó el efecto de dos agentes crioprotectores (glicerol y dimetil-sulfóxido: DMS) sobre la viabilidad de las diatomeas *Chaetoceros* y *Phaeodactylum* sometidos a los procesos de congelación y liofilización. Después de una semana de almacenamiento la sobrevivencia de *Chaetoceros* resultó en entre el 90 y el 99%. En tiempos de almacenamiento más prolongados se observaron resultados diferentes: después de 15 días los mejores fueron con el crioprotector DMS y después de 30 días la mejor sobrevivencia se obtuvo con el glicerol al 5 y 10%. El efecto del almacenamiento de *Phaeodactylum* en presencia de crioprotectores por un período superior a una semana denota una baja sobrevivencia.

La eficiencia de absorción de *Mytilus galloprovincialis* de las microalgas preservadas y frescas fue alta (entre 84.7 y 96%); *Chaetoceros* en forma fresca y secada al aire fue asimilada con una eficiencia mayor que las microalgas liofilizadas y congeladas, mientras que la asimilación con *Phaeodactylum* no fue afectada debido al método de preservación.

La absorción de las proteínas, los carbohidratos y los lípidos de ambas microalgas fue alta (entre 97 y 99.8%) lo cual refleja la eficiencia de las enzimas digestivas de *M. galloprovincialis*. Con la asimilación también fue incorporada la materia inorgánica contenida en el alimento, que es muy alta (de 92.34 a 99.57%). Por lo cual, es necesario revisar el índice de asimilación descrito por Conover que se utiliza ampliamente en literatura, el cual está basado en la suposición que la materia inorgánica no es asimilada por los organismos.

La energía asimilada por *Mytilus galloprovincialis* fue más alta con *Phaeodactylum* y con *Chaetoceros* en forma fresca (3755.28 y 2610.96 J/día respectivamente).

Los organismos alimentados con las microalgas preservadas se midieron al final del bioensayo. Los incrementos en el eje de crecimiento máximo fueron mayores con *Phaeodactylum* (1.41%) que con *Chaetoceros* (1.02%). Sin embargo, cuando se les alimentó con microalgas frescas, los incrementos resultaron superiores. La composición proximal del tejido de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con microalgas frescas y preservadas fue similar; lo mismo se observó para el perfil de los ácidos grasos.





CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE  
EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA

DIVISION DE OCEANOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA

**EVALUACION DE DIFERENTES METODOS DE PRESERVACION  
DE DIETAS DE MICROALGAS Y SU EFECTO SOBRE EL  
CRECIMIENTO DE *Mytilus galloprovincialis* Lamarck.**

TESIS

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

Presenta:

**BEATRIZ CORDERO ESQUIVEL**

Ensenada, Baja California, Junio de 1994.

## DEDICATORIA

A mis padres:  
Efraín (a su memoria)  
y Ma. Marcos con  
profundo amor.

A mi pequeño hijo  
Francisco, mi vida,  
porque es mi estímulo  
para seguir adelante

A Francisco,  
con amor.

## AGRADECIMIENTOS

Una mención especial a mi Director de Tesis, Dr. Domenico Voltolina, por su invaluable ayuda durante las múltiples horas dedicadas en todas las fases de ésta tesis. Por su fé en mi como profesionista y por compartirme un poco de su gran experiencia.

Al Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez, por su constante apoyo y tiempo dedicado durante el desarrollo de esta tesis y por las acertadas correcciones y sugerencias hechas al manuscrito. Mi sincero agradecimiento.

Al Dr. Fernando Díaz Herrera, por su contínuo interés y apoyo en este trabajo por sus observaciones y sugerencias, las cuales fueron de gran importancia.

Dr. Jaime Fárber Lorda y Dr. Mario Martínez, por sus observaciones y críticas para el mejoramiento de este trabajo.

A la Dra. Czesia Nalewajko, por su constante apoyo desde el inicio de mis estudios de doctorado como miembro de mi Comité de Tesis y por aceptarme como su estudiante durante mi estancia en su laboratorio en la Universidad de Toronto, Scarborough Campus, Canadá.

A la Dra. Silvia Ibarra y M. en C. Miriam Poumián del Dpto. de Ecología por su ayuda y disponibilidad en el uso del liofilizador.

Al M. en C. José Antonio López Elías, por su ayuda en los análisis bioquímicos realizados al inicio de este trabajo y por su gran amistad.

A Francisco Correa, por su apoyo absoluto, porque siempre estuvo cuando lo necesité, por allanar el camino.

En forma especial a mi hijo Francisco, por existir, porque a pesar de ser tan pequeño supo entender mis largos períodos de ausencia.

A los técnicos del Departamento de Acuicultura, Biol. Norberto Flores, por su ayuda durante el trabajo de campo y de laboratorio; al Ocean. Eduardo Morales y Francisco Valenzuela por el apoyo recibido.

A mis amigos, Roxana Rico, Ma. Irene González, Enrique Olivares y Saúl González por las experiencias que compartimos durante aquellas prolongadas horas en el laboratorio.

A Karla López, por su ayuda en el formato de este trabajo, por estar siempre dispuesta a colaborar y por su amistad.

A Ma. Elena Corona, por su profesionalismo, por su respuesta siempre amable a los muchos favores que le solicité.

Al Oc. Jesús García Esquivel y Jesús Barajas de la Secretaría de Pesca y al Oc. Luis García Pámanes del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California por haber proporcionado los mejillones utilizados en los bioensayos de esta tesis.

A José Ma. Domínguez del Departamento de Dibujo, de la División de Oceanología por la elaboración de las figuras.

Especialmente a todo el personal de la Estancia Infantil del CICESE, a la Sra. Ana López Vaccaro, por aceptar en este Centro a Francisco y por ocupar en él aquellos espacios tan importantes en su vida.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por el apoyo brindado para mi formación académica y por la ayuda económica recibida.

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

	PAGINA
I.- INTRODUCCION .....	1
I.1.- ANTECEDENTES .....	3
I.2.- OBJETIVOS .....	17
II.- MATERIALES Y METODOS .....	18
II.1. Selección de especies de microalgas y métodos de cultivo .....	18
II.2. Métodos de colecta y acondicionamiento de los organismos en el laboratorio .....	
II.3. Bioensayo de alimentación de <i>Mytilus galloprovincialis</i> con microalgas frescas .....	20
II.4. Cosecha y métodos de preservación de microalgas.....	23
II.5. Composición bioquímica de microalgas preservadas .....	25
II.6. Bioensayo de alimentación de <i>Mytilus galloprovincialis</i> con microalgas preservadas.....	26
II.7. Viabilidad de microalgas preservadas .....	27
II.8. Bioensayo de eficiencia de asimilación de <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	28
II.9. Análisis estadístico .....	31

CONTENIDO (Continuación)	PAGINA
III.- RESULTADOS.....	32
III.1. Selección y cultivo de microalgas.....	32
III.2. Bioensayo de alimentación de <i>Mytilus galloprovincialis</i> con microalgas frescas. ....	35
III.3. Bioensayo de alimentación de <i>Mytilus galloprovincialis</i> con microalgas preservadas .....	41
III.4. Composición bioquímica de microalgas preservadas. ....	48
III.5. Viabilidad de microalgas preservadas.....	49
III.6. Bioensayo de eficiencia de absorción de <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	53
IV.- DISCUSION .....	64
IV.1. Bioensayo de alimentación de <i>Mytilus galloprovincialis</i> con microalgas frescas .....	64
IV.2. Bioensayo de alimentación de <i>Mytilus galloprovincialis</i> con microalgas preservadas .....	68
IV.3 Viabilidad de microalgas preservadas.....	71
IV.4 Bioensayo de eficiencia de absorción de <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	73
V.- CONCLUSIONES .....	80
LITERATURA CITADA.....	82
ANEXOS:	
1. Growth of <i>Modiolus capax</i> (Conrad) (Mollusca:Bivalvia) with two diets and two feeding regimes. Revista de Investigaciones Marinas. 1994. 15(2):147-150.	

## CONTENIDO (Continuación)

2. The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques.  
Revista: Comp. Biochem. Physiol. 1993.  
105B: 369-373.
3. Growth of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. fed with four microalgae and two feeding regimes. Revista: Journal of the World Aquaculture Society (Aceptada).

FECHA DE INGRESO

OCT 13 1995

BIBLIOTECA CICESE

<u>FIGURA</u>	<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<u>PAGINA</u>
1	Ubicación de los sitios de colecta de los organismos <i>Mytilus galloprovincialis</i> . 1: Bahía de San Quintín, ensayos de alimentación con microalgas frescas y preservadas. 2: Estero de Punta Banda, ensayo de eficiencia de asimilación.	22
2	Esquema de los acuarios (a) y sistema (b) utilizados durante los bioensayos de alimentación de <i>Mytilus galloprovincialis</i> . 1.- Acuarios divididos en secciones. 2.- Sistema de aireación. 3.- Rejillas con malla tipo mosquitero. 4.- Recipiente de suministro de alimento. 5.- Bomba peristáltica.	25
3	Producción de biomasa en ( $\log_2$ de la densidad óptica) de <i>Chaetoceros</i> sp. (a), <i>Isochrysis</i> sp. (b), <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (c) y <i>Tetraselmis</i> sp. (d) cultivadas en sistema semicontínuo.	36
4	Producción de biomasa (en $\log_2$ de la densidad óptica) de <i>Skeletonema menzeli</i> en cultivo terminal (batch).	37
5	Índice de condición inicial (▨), final (■) y razón de conversión (▤) del alimento de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con <i>Chaetoceros</i> sp. (CH), <i>Isochrysis</i> sp. (I), <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (PH) y <i>Tetraselmis</i> sp. (T).	43
6	Eficiencia de asimilación (%) de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con <i>Chaetoceros</i> sp. (Ch) y <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (Ph) en diferentes formas de preservación. F, frescas; S, secas; L, liofilizadas; C, congeladas.	59

<u>TABLA</u>	<u>LISTA DE TABLAS</u>	<u>PAGINA</u>
I	Composición proximal promedio de las cuatro microalgas usadas en el experimento de alimentación de <i>Mytilus galloprovincialis</i> . Las fracciones orgánicas fueron recalculadas como porcentajes del total de los contenidos orgánicos (González-Medina, 1991; López-Elías y Voltolina, 1993).	34
II	Datos generales promedios (entre paréntesis errores estándar) de los incrementos en el eje de crecimiento máximo (E.C.M.), el alto y el ancho) de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con cuatro microalgas y dos modos de alimentación. c) alimentación continua, d) alimentación dividida, x) promedio entre las dos formas de alimentación.	36
III	Análisis de varianza de dos vías del incremento en el eje de crecimiento máximo de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con cuatro microalgas y dos formas de alimentación.	37
IV	Análisis de varianza de dos vías del incremento en alto de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con cuatro microalgas y dos formas de alimentación.	37
V	Análisis de varianza de una vía (Kruskal Wallis) del incremento en ancho de la concha de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con cuatro microalgas.	38
VI	Datos generales promedios (entre paréntesis errores estándar) de los valores de crecimiento de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con cuatro microalgas y dos formas de alimentación. c) alimentación continua, d) alimentación dividida, x) promedio entre las dos formas de alimentación.	38
VII	Análisis de varianza de una vía y comparaciones múltiples (Método de Student-Newman-Keuls) de los incrementos en peso seco total, peso seco orgánico del tejido, peso seco de la concha e índice de condición de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con cuatro microalgas.	39

<u>TABLA</u>	<u>LISTA DE TABLAS</u> (continuación)	<u>PAGINA</u>
VIII	Datos generales promedios (entre paréntesis errores estándar) del crecimiento en el eje de crecimiento máximo (ECM), alto y ancho de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con microalgas frescas o preservadas con tres métodos diferentes.	42
IX	Análisis de varianza de una vía (Kruskal Wallis) y comparaciones múltiples (método de Dunn) de los incrementos obtenidos en el eje de crecimiento máximo (ECM), alto y ancho de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con <i>Chaetoceros</i> y <i>Phaeodactylum</i> frescas y preservadas.	43
X	Datos generales (promedios y errores estándar) del crecimiento en peso seco total, peso seco orgánico del tejido y peso seco de la concha de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con microalgas frescas y preservadas.	45
XI	Análisis de varianza de una vía (Kruskal Wallis) y comparaciones múltiples (método de Dunn) de los incrementos obtenidos en peso seco total, peso seco orgánico del tejido y peso seco de la concha de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con <i>Chaetoceros</i> y <i>Phaeodactylum</i> frescas y preservadas.	46
XII	Índice de condición (promedios y errores estándar) inicial y final de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con microalgas frescas y preservadas y resultado de las comparaciones múltiples (método de Dunn $\alpha=0.05$ ) para el índice de condición final.	47
XIII	Sobrevivencia de <i>Chaetoceros</i> sp. congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con diferentes porcentajes de crioprotector (Glicerol y DMS) y a diferentes tiempos de preservación. <sup>2,3</sup> = días de duración de la fase de inducción.	50
XIV	Sobrevivencia de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con diferentes porcentajes de crioprotector (Glicerol y DMS) y a diferentes tiempos de preservación. <sup>2,3,4,5</sup> = días de duración de la fase de inducción.	50
XV	Sobrevivencia de <i>Chaetoceros</i> sp. congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y liofilizada, con diferentes porcentajes de crioprotector (Glicerol y DMS) y a diferentes tiempos de preservación.	52

<u>TABLA</u>	<u>LISTA DE TABLAS</u> (continuación)	<u>PAGINA</u>
XVI	Sobrevivencia de <i>Phaeodactylum tricornerutum</i> congelada a -20 °C y liofilizada, con diferentes porcentajes de crioprotector (Glicerol y DMS) y a diferentes tiempos de preservación.	52
XVII	Porcentaje de alimento no ingerido por <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con <i>Chaetoceros</i> y <i>Phaeodactylum</i> en forma fresca y con diferentes métodos de preservación.	53
XVIII	Promedios, errores estándar y límites de confianza de la eficiencia de asimilación (método de Conover, 1966) de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con microalgas frescas y preservadas por diferentes métodos.	54
XIX	Análisis de varianza de una vía (Kruskal Wallis $\alpha= 0.05$ ) y comparaciones múltiples (método de Dunn) de la eficiencia de asimilación (método de Conover, 1966) de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con <i>Chaetoceros</i> y con <i>Phaeodactylum</i> en diferentes formas de preservación.	55
XX	Porcentaje de proteínas, carbohidratos y lípidos ingeridos, desechados (en heces) y asimilados por <i>Mytilus galloprovincialis</i> durante su alimentación por cinco días cada vez con la microalga <i>Chaetoceros</i> sp. en forma fresca y preservada.	57
XXI	Porcentaje de proteínas, carbohidratos y lípidos ingeridos, desechados (en heces) y asimilados por <i>Mytilus galloprovincialis</i> durante su alimentación por cinco días cada vez con la microalga <i>Phaeodactylum tricornerutum</i> en forma fresca y preservada.	58
XXII	Porcentajes de absorción de material inorgánico por <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con las microalgas <i>Chaetoceros</i> y <i>Phaeodactylum</i> en forma fresca y preservada.	59
XXIII	Energía (en Joules. día <sup>-1</sup> ) ingerida, perdida (como heces) y asimilada por <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado durante cinco días con <i>Chaetoceros</i> y <i>Phaeodactylum</i> en forma fresca y preservada.	59

<u>TABLA</u>	<u>LISTA DE TABLAS</u> (continuación)	<u>PAGINA</u>
XXIV	Promedio inicial y final de la longitud (ECM) de <i>Mytilus galloprovincialis</i> e incremento en mm y en % después de 17 días de alimentación con microalgas preservadas (secas, liofilizadas y congeladas, consecutivamente).	61
XXV	Composición proximal (promedios y errores estándar) de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con <i>Chaetoceros</i> y <i>Phaeodactylum tricornutum</i> frescas (F) y preservadas (P). Datos calculados en base al peso seco total de la muestra.	62
XXVI	Composición proximal de <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Phaeodactylum tricornutum</i> frescas (F) y preservadas (P). Datos expresados como porcentajes del total de la fracción orgánica.	62
XXVII	Composición y porcentajes de ácidos grasos mayores en <i>Mytilus galloprovincialis</i> alimentado con las microalgas <i>Chaetoceros</i> sp. y <i>Phaeodactylum tricornutum</i> en forma fresca (F) y preservada (P). Las concentraciones están dadas en base al porcentaje del total de ácidos grasos.	63

# EVALUACION DE DIFERENTES METODOS DE PRESERVACION DE DIETAS DE MICROALGAS Y SU EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Mytilus galloprovincialis* Lamarck.

## I INTRODUCCION

Las microalgas constituyen la fuente primaria de alimento para la mayoría de los organismos acuáticos durante por lo menos una parte de su ciclo de vida. Se han descrito cerca de 30,000 especies de microalgas (Metting y Pyne, 1986) y aproximadamente el 0.3 % han sido estudiadas extensivamente como posible fuente de alimento en la acuicultura (Bonotto, 1988). Aisladas en diferentes partes del mundo las microalgas se mantienen en cultivos intensivos después de haber sido seleccionadas por características específicas como tamaño y forma, velocidad de reproducción y en general por su alta producción de biomasa (Hortsman, 1985).

La mayoría de las especies de microalgas cultivadas son marinas. Las más frecuentemente utilizadas en operaciones comerciales son las diatomeas *Skeletonema costatum* Cleve, *Thalassiosira pseudonana* Hasle y Heimdal, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, *Chaetoceros muelleri* Lemmerman, las flageladas *Isochrysis galbana* Parke, *Pavlova lutheri* (Droop) Green, *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher, *Dunaliella* spp. y la clorococal *Chlorella* spp. (De Pauw y Persoone, 1988).

Otros usos de las microalgas varían desde la producción de varios compuestos químicos como lípidos, glicerol, polisacáridos, pigmentos naturales, sustancias aromáticas, vitaminas, aminoácidos, antibióticos, agentes antifungales y enzimas. Se han descrito varios sistemas de tratamiento de aguas residuales que utilizan las microalgas para la retención de nutrientes y también de compuestos tóxicos, como metales pesados y pesticidas (Nonomura, 1988;

Oswald, 1988).

Con pocas excepciones, como la producción de *Dunaliella* para la extracción de  $\beta$  caroteno y de *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Spirulina* que se comercializan como complementos dietéticos con alto valor agregado, los costos de producción no son todavía competitivos en el mercado. La excepción es la producción de microalgas para la acuicultura, porque la menor escala de los sistemas de producción permite un mayor control sobre la calidad del agua y además porque las microalgas son el punto biológico de arranque del flujo de energía a través de las cadenas alimenticias acuáticas más importantes; por este motivo su producción intensiva es una parte integral de muchos establecimientos que se dedican al cultivo de organismos filtradores (De Pauw y Persoone, 1988).

Para este tipo de uso los costos de producción son inferiores, ya que no incluyen los pasos de concentración y de procesamiento de la biomasa, que es transformada directamente por los consumidores en un producto con un alto valor comercial.

El desarrollo de la actividad acuicultural requiere tecnologías modernas que aumentan el costo de producción de las microalgas debido a la necesidad de emplear mano de obra calificada e instrumentación más sofisticada y costosa. De este mismo desarrollo ha surgido el imperativo de optimizar las técnicas de producción masiva de microalgas en sistemas artificiales. Para estos fines hay que considerar las especies de microalgas cultivadas y los objetivos específicos de cada sistema productivo (Hortsmann, 1985).

## L1. ANTECEDENTES

El cultivo de microalgas es parte integral de la biotecnología del cultivo de moluscos marinos, crustáceos y peces, ya que en la acuicultura es necesario tener una gran biomasa de microalgas disponible como una fuente de alimento para el desarrollo normal y el crecimiento de las especies cultivadas (Herrero *et al.*, 1991).

Una de las mayores dificultades en el desarrollo de sistemas de cultivo comercial de moluscos y crustáceos, es la dependencia de estos sistemas de su capacidad de producción de microalgas como alimento (Chu *et al.*, 1982), que algunos definen como el "cuello de botella" de la actividad acuicultural (Persoone y Claus, 1980; Sommer *et al.*, 1990; Coutteau y Sorgeloos, 1992).

Esto ha promovido una línea de investigación para encontrar soluciones al uso de las microalgas vivas, tales como dietas microencapsuladas, levaduras y pastas de algas preservadas. Sin embargo, la aceptación o el rechazo de estos productos por los operadores de granjas están escasamente documentados (Coutteau y Sorgeloos, 1992) y de todas formas, a pesar de los extensivos esfuerzos de investigación en dietas artificiales, éstas raramente son aplicadas a los procesos rutinarios de producción de semilla de bivalvos.

Algunos experimentos sobre el uso de dietas artificiales se han realizado con crustáceos; Jones *et al.* (1974) ensayaron como dieta artificial para *Artemia* una serie de alimentos microencapsulados preparados con una modificación del método de Chang *et al.* (1966). Los resultados demostraron menor crecimiento y sobrevivencia que los alcanzados con la microalga *Isochrysis galbana* que se utilizó como control. Resultados similares, también con

*Artemia*, fueron encontrados por Jones *et al.* (1975), Jones y Gabbott (1976) y Galgani (1988), quienes obtuvieron mejores crecimientos de larvas de peneidos con una dieta de microalgas que con una dieta artificial.

Epifanio (1979) comparó dietas formuladas con varias proporciones de la diatomea *Thalassiosira pseudonana* y de la levadura *Candida utilis* como alimento para cuatro especies de juveniles de moluscos bivalvos y encontró que el crecimiento de *Argopecten irradians*, *Mercenaria mercenaria* y *Mytilus edulis* alimentados con dietas que contenían más del 50% de levadura fue comparable al de los controles (100% microalgas); sin embargo, el crecimiento del tejido de *Crassostrea virginica* decreció con la cantidad de levadura en la dieta lo cual demuestra, según el autor, una fisiología digestiva diferente en esta especie.

Langdon (1982) observó un crecimiento muy bajo en las larvas de *Crassostrea gigas* alimentadas con dietas artificiales y menciona como posibles causas de esto que la dieta fue deficiente en algunos micronutrientes esenciales, o que su forma de presentación fue insatisfactoria para ser utilizada eficientemente por las larvas.

Aunado a los resultados ineficientes en el uso de dietas artificiales, un problema adicional de las dietas encapsuladas es que las paredes de las microcápsulas son permeables a moléculas pequeñas (Gabbott *et al.*, 1975) y a vitaminas y otros nutrientes solubles en agua que no pueden, por lo tanto, ser encapsuladas usando las mezclas normales de proteína-nylon, a través de las cuales los nutrientes migran rápidamente hacia el exterior. Además, los lípidos tienden a ser refractarios a los procesos de encapsulación (Langdon, 1982).

Estos resultados explican el motivo por el cual, a pesar de todos los esfuerzos para reemplazar las microalgas por alimento inerte, los acuicultores aún dependen de la producción

de microalgas como alimento para los organismos filtroalimentadores (Winter, 1974; Gabbott *et al.*, 1975; De Pauw y Persoone, 1988).

Como una alternativa a esta problemática, en los últimos años se han investigado varias técnicas de preservación por congelación o secado de microalgas. De esta forma se obtendría un producto con las mismas ventajas de facilidad de distribución y de almacenamiento por largos períodos de tiempo que ofrecen las dietas artificiales, con la superioridad adicional que el alimento proporcionado constituye la dieta natural de los organismos cultivados (Laing *et al.*, 1990).

Se han usado cultivos concentrados y congelados de microalgas como un complemento dietético en la alimentación de organismos con microalgas vivas (Sommer *et al.*, 1990) y también los concentrados de microalgas liofilizados, secados con calor (spray-dried) o simplemente refrigerados han sido sugeridos por muchos autores para alimentar a moluscos y crustáceos (Brown, 1972; Laing *et al.*, 1990; Nell y O'Connor, 1991; Laing y Millican, 1992).

Las pruebas de alimentación con microalgas procesadas se han enfocado a utilizar microalgas secadas con calor o liofilizadas, pero los resultados han sido variables. Hidu y Ukeles (1962) describieron las primeras investigaciones en este campo, en las cuales ensayaron tres especies de microalgas preservadas en forma seca y administradas a larvas de *Mercenaria mercenaria*. Estas microalgas fueron *Dunaliella euchlora*, *Isochrysis galbana* (liofilizadas) y *Scenedesmus obliquus* (secada con calor). Según estos autores, los resultados de crecimiento y de sobrevivencia de las larvas fueron comparables a los observados cuando estas mismas microalgas se usaron en forma fresca.

En otros ensayos, las microalgas *Nannochloris* sp. y *Tetraselmis suecica* secadas con calor han sustentado un crecimiento igual o mayor que sus contrapartes vivas en los moluscos bivalvos *Tapes philippinarum*, *T. decussata*, *Mercenaria mercenaria*, *Crassostrea gigas* y *Ostrea edulis*, lo cual demostraría que los bivalvos juveniles son capaces de sostener su crecimiento con una dieta de microalgas secas (Laing *et al.*, 1990; Laing y Gil-Verdugo, 1991)

Brown (1972) hizo estudios similares con *Skeletonema* y *Thalassiosira* en forma congelada y liofilizada con las cuales alimento a *Penaeus aztecus*, pero ninguna de las formas de presentación dió resultados comparables a los obtenidos con las diatomeas vivas a iguales concentraciones. Sin embargo, Millamena *et al.* (1990) hicieron ensayos con otra especie de camarón (*Penaeus monodon*), que alimentaron con las microalgas *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis chui* e *Isochrysis galbana* secadas al sol. Los resultados de crecimiento y sobrevivencia con *C. calcitrans* y *T. chui* fueron comparables a los obtenidos con el control (microalgas frescas) y los organismos alimentados con *I. galbana* tuvieron una sobrevivencia inferior a la obtenida con las demás dietas.

La mayor preocupación en todos estos estudios, es el hecho que la composición bioquímica de las microalgas podría ser alterada por las técnicas de preservación y almacenaje, lo cual podría afectar la sobrevivencia y el crecimiento de los organismos alimentados con ellas.

Hasta la fecha, la única manera de obtener cultivos masivos de algas marinas unicelulares como alimento para organismos es la obtención de la especie deseada, en general de una colección en donde las diferentes cepas se mantienen por largos períodos de tiempo. Una alternativa sería la preservación de biomasa de microalgas en estado viable en

condiciones industriales (Aizdaicher y Silkin, 1983).

El mantenimiento de algas en colecciones es un proceso laborioso el cual implica frecuentes transferencias manuales de un cultivo a un medio con nutrientes frescos (Antia, 1977; Box, 1988).

La preservación de cepas de microalgas por largos períodos es reconocida como un medio para mantener la integridad del cultivo original; las principales ventajas de mantenerlos en estado seco o congelado incluye: 1) una gran reducción del tiempo, del equipo y del espacio requeridos para mantener las colecciones stock (madre) de microalgas; 2) la estabilidad genética de las descendencias preservadas por largos períodos y 3) en el caso de los cultivos secos almacenados al vacío no se requiere refrigeración durante el almacenamiento. La habilidad de los cultivos secos de sobrevivir a la temperatura ambiente por mucho tiempo, facilitaría además su distribución a otros laboratorios (Holm-Hansen, 1973; Saks, 1978).

Sin embargo, durante el congelado y el liofilizado de organismos hay muchos factores físicos y químicos que pueden causar daños celulares. Estudios sobre diversas células microbianas han demostrado que el mismo procedimiento experimental no es satisfactorio para todas las especies. Por lo tanto, para asegurar la viabilidad de las células, las condiciones óptimas necesarias durante el procedimiento de liofilizado y/o congelado se determinan empíricamente (Tsuru, 1973).

Algunos autores han descrito procedimientos satisfactorios para la criopreservación de microalgas de agua dulce (Tsuru, 1973; Takano *et al.*, 1973; Holm-Hansen, 1973; Morris, 1976a, 1976b); sin embargo, las descripciones de métodos para congelar o para liofilizar

especies marinas son muy limitadas. Se ha visto que métodos adecuados para congelar bacterias, algas azul-verdes y algas de agua dulce no dan resultados satisfactorios cuando se aplican directamente a las microalgas marinas, debido a las complejas interacciones entre el enfriamiento, la formación de cristales, la saturación de la sal, la desnaturalización de las proteínas y la solubilización de las lipoproteínas (Ben-Amotz y Gilboa, 1980).

Se ha observado por Withers (1985), que para proteger a las microalgas contra los procesos de congelación se pueden utilizar agentes protectores (crioprotectores) antes del superenfriado, ya que éstos tienen propiedades coligativas y mantienen el agua en el estado líquido al formar enlaces de hidrógeno que previenen la difusión de moléculas de agua y la formación de un frente del hielo. De esta forma los procesos de cristalización no cambian la naturaleza de la sustancia orgánica, al modificar su contenido original de agua (Lepesteur *et al.*, 1993).

Aparte de los problemas técnicos y económicos involucrados en la producción masiva de microalgas, el mayor problema en la acuicultura es el relacionado con el valor dietético de las mismas (De Pauw *et al.*, 1984). Aunque generalmente se acepta que los moluscos bivalvos son dependientes del fitoplancton como su principal fuente de alimento (De Pauw, 1981; Webb y Chu, 1982), sólo se han definido algunos requerimientos nutricionales de unas pocas especies de interés comercial. Además los resultados indican que no se puede seguir un criterio general para los consumidores de microalgas (De Pauw y Persoone, 1988). Las razones para esto son relacionadas a diferencias en el tamaño, en la digestibilidad y particularmente en el valor nutritivo de las microalgas (Brown *et al.*, 1989).

Muchos estudios han comparado y mejorado el valor alimenticio de algunas especies de microalgas, principalmente en lo referente a diferencias entre fases de crecimiento (Davis

y Guillard, 1958; Loosanoff y Murray, 1974; Flaak y Epifanio, 1978; Langdon y Waldock, 1981; Ukeles *et al.*, 1984; Enright *et al.*, 1986a; Helm y Laing, 1987; Ukeles y Wikfors, 1988), sin embargo, la relación entre su composición química y el valor alimenticio de un alga aún no ha sido totalmente explicada (Epifanio, 1979; Brown *et al.*, 1989).

Algunos trabajos se han enfocado a identificar los componentes particulares de la dieta que son esenciales para el crecimiento de larvas, juveniles y adultos de bivalvos (Flaak y Epifanio, 1978; Webb y Chu, 1982; Whyte *et al.*, 1989). Varios de estos estudios comprueban la factibilidad de manipular la composición bioquímica de las microalgas variando las condiciones del cultivo, por ejemplo cultivando las microalgas con luz de diferente composición espectral, variando la concentración de nutrientes, cosechando la microalgas en las fases exponencial o estacionaria (Flaak y Epifanio, 1978; Wikfors, 1986; Whyte, 1987; Goldenhuys *et al.*, 1988; Herrero *et al.*, 1991), pero los efectos pueden variar de una especie a otra y aún en la misma especie, con ligeros cambios en las condiciones de cultivo (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1994).

También se han documentado cambios en la composición de los ácidos grasos de las microalgas cuando los nutrientes son limitantes o cuando hay variaciones de temperatura, de intensidad de luz o de la duración de los ciclos de luz-obscuridad (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Mortensen *et al.*, 1988). Se ha observado además, que las microalgas en la fase estacionaria acumulan lípidos cuando se agotan los nutrientes del medio de cultivo (Webb y Chu, 1982); también, el contenido de lípidos en las diatomeas se incrementa cuando los silicatos son limitantes (Enright *et al.*, 1986b), esto puede ser acompañado por un ligero incremento en los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (Mortensen *et al.*, 1988).

La posibilidad de modificar la composición bioquímica de las microalgas permite

estudiar en forma indirecta los requerimientos nutricionales de los bivalvos. Una vez que éstos sean conocidos se puede variar las condiciones de cultivo de las microalgas para optimizar la concentración de los nutrientes deseados (Enright *et al.*, 1986b; Volkman *et al.*, 1992).

Existen evidencias basadas sobre datos de crecimiento de varios invertebrados que comprueban que la calidad de los lípidos, más que su cantidad, es de primordial importancia para determinar el valor alimenticio de las microalgas.

Webb y Chu (1982) revisaron el papel de algunos constituyentes bioquímicos del fitoplancton utilizado como alimento para larvas y semilla del ostión y concluyeron que las familias de los ácidos grasos insaturados en posición w3 y w6 (ácidos grasos que tienen un doble enlace en el carbono 3 y 6 respectivamente) son esenciales para el crecimiento y el desarrollo de las larvas. También se comprobó que una deficiencia de algunos ácidos grasos del grupo w3 es el causante mayor del poco valor nutritivo de especies particulares de algas (Helm y Laing, 1987; De Pauw y Persoone, 1988; Napolitano, 1990).

Comúnmente se observa que el crecimiento de los ostiones juveniles se retarda si los ácidos grasos 20:5w3 y 22:6w3 no están presentes en las microalgas (Langdon y Waldock, 1981; Enright *et al.*, 1986a). Sin embargo, Waldock y Holland (1984) han reportado buen crecimiento de juveniles de *Crassostrea gigas* con dietas algales que son deficientes en el ácido graso 22:6w3 y estudios adicionales han demostrado que ostiones juveniles pueden elongar y desaturar ácidos grasos dietéticos, aunque las tasas de bioconversión son probablemente demasiado lentas para que el organismo pueda alcanzar el crecimiento óptimo.

En otra comparación de la calidad alimenticia de especies de microalgas usadas para

la alimentación de juveniles de *Ostrea edulis*, Enright *et al.* (1986a) concluyeron que la mejor dieta fue la diatomea *Chaetoceros muelleri*, quizás porque su contenido del ácido graso 22:6w3 es superior que en la mayoría de las otras diatomeas (Enright *et al.*, 1986b).

En Australia, las microalgas *Chaetoceros calcitrans* y *Chaetoceros muelleri* son ampliamente usadas como alimento para bivalvos y larvas de camarones. La composición de ácidos grasos de las dos especies de microalgas son muy similares, pero *C. calcitrans* contiene una proporción más alta de los ácidos grasos 16:3w4 y 20:5w3 (Volkman *et al.*, 1989), lo cual puede explicar las mayores tasas de crecimiento larval cuando esta especie se usa como alimento (Waldock y Nascimento, 1979).

En consecuencia de lo anterior, las implicaciones de la calidad del alimento sobre el crecimiento y sobrevivencia de los organismos son de particular interés para la industria acuicultural.

La cantidad de un alimento que un organismo requiere para su máximo crecimiento es obviamente fundamental en el desarrollo de cualquier sistema de cultivo. En el caso de los bivalvos hay numerosos estudios sobre las tasas de filtración de partículas en suspensión, pero poco de este conocimiento ha servido para obtener una estimación del tamaño óptimo de la ración (Winter, 1978., Epifanio, 1982). La cantidad de energía disponible para el crecimiento o el metabolismo está en función de la ración absorbida más que de la tasa de ingestión.

Se ha sugerido que la ración absorbida está en función no sólo de la naturaleza y cantidad del alimento, sino también de su disponibilidad temporal, en particular cuando la ingestión es continua o intermitente. Por este motivo, la ración consumida depende de la concentración

del alimento y del comportamiento de alimentación de los organismos (Newell, 1982).

La mayoría de los zoólogos han aceptado que los procesos de alimentación y digestión en moluscos bivalvos son continuos. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que éstos pueden ser discontinuos en un número de especies, incluyendo *Lasaea rubra* (McQuiston, 1969), *Dreissena polymorpha*, *Cardium edule* (Morton, 1970, 1973), *Ostrea edulis* (Mathers, 1972; Langton y Gabbott, 1974), *Crassostrea gigas* (Morton, 1977) y *Mytilus edulis* (Langton, 1975). Estos animales exhiben un ritmo de alimentación y de digestión, probablemente como consecuencia de la disponibilidad de alimento en su medio natural (Tenore y Dunstan, 1973; Ukeles *et al.*, 1984). Las interrupciones en los ciclos de alimentación causados por la acción mareal podrían generar este ritmo (McHenery *et al.*, 1983) y tener como resultado una alta eficiencia de utilización del alimento, cuando éste está disponible por cortos períodos de tiempo (Mathers, 1972; Thompson y Bayne, 1972).

De lo anterior, se puede concluir que la alimentación no es universalmente continua o de tasa constante. Por lo tanto, en el diseño de regímenes de alimentación para bivalvos cultivados, cada especie debe ser estudiada individualmente para optimizar la utilización del alimento, proporcionándolo solamente cuando los animales están en una condición receptiva (Reid, 1982).

Otro factor importante para entender la bioenergética de los moluscos bivalvos además de la importancia que tiene la cantidad de alimento ingerido, es la eficiencia con la cual la energía asimilada es usada para el crecimiento (Langton *et al.*, 1977; Widdows *et al.*, 1977; Newell, 1982).

A pesar de su importancia en el entendimiento de la dinámica de las cadenas alimenticias

de comunidades bénticas y en el desarrollo de sistemas de maricultura controlada, son pocos los estudios que han considerado este problema.

En el caso del mejillón *Mytilus edulis*, Thompson y Bayne (1974) y Bayne *et al.* (1976) presentaron un modelo que relaciona la eficiencia bruta de crecimiento ( $K_1$ ) y el tamaño de la ración, del cual resulta que esta relación varía de un valor negativo, cuando los animales son alimentados con raciones bajas y crece marcadamente con un pequeño incremento en el tamaño de la ración hasta que se alcanza el nivel de ración óptima;  $K_1$  finalmente decrece casi linealmente con cualquier incremento adicional de la ración.

Este modelo fue confirmado empíricamente para *Mytilus edulis* por Winter y Langton (1976), quienes encontraron que la eficiencia bruta de crecimiento se incrementa de un valor negativo hasta un máximo con un incremento en la ración ingerida y concluyeron que el valor máximo para  $K_1$  corresponde al nivel de ración óptimo, ya que un aumento adicional en la disponibilidad del alimento resultó en la producción de pseudoheces y se redujo la actividad de filtroalimentación.

Resultados similares se encontraron con el mitflido *Modiolus capax*: se observó que este organismo puede filtrar diariamente raciones de hasta el 4% de su peso seco en microalgas y que cantidades mayores propiciaban la producción de pseudoheces. Además, con raciones muy altas (8%), los mejillones tendían a cerrarse y dejaban de filtrar; el crecimiento de estos organismos, alimentados en forma continua o con raciones proporcionadas en forma discreta, con las microalgas *Chaetoceros* sp. y *Pavlova lutheri*, indica que no hubo diferencias significativas debido a la forma de alimentación (Cordero-Esquivel y Voltolina, 1994) (Anexo 1).

En los últimos años, los mejillones han adquirido una importancia que sobrepasa su significancia económica como una fuente de alimento, ya que estos organismos han sido una fuente importante de material experimental para ecólogos, genetistas, bioquímicos y ecofisiólogos (Bayne, 1991).

La producción mundial de mejillones dentro de los programas de acuicultura ha entrado en una fase estática, por lo cual se requiere encontrar nuevos sitios para cultivarlos e incrementar la eficiencia de los programas actuales (Bayne, 1991). *Mytilus galloprovincialis* y *M. californianus* son dos especies que existen en las costas de Baja California. El Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California, inició en 1985 el primer cultivo a escala comercial piloto de la especie *M. galloprovincialis* (García-Pámanes y García-Pámanes, 1987). Estos autores mencionan que aunque hasta esa fecha el abasto de semilla había sido adecuado, éste pudiera limitar el crecimiento de la actividad en el futuro, por lo que sería conveniente impulsar la adaptación de las técnicas existentes para su producción en criaderos, lo cual sentaría una sólida base para su expansión.

Rangel-Dávalos (1990) menciona dentro de los estudios de prioridad para la maricultura, el desarrollo de biotecnologías de producción de semilla de moluscos en condiciones controladas. Una de las posibles alternativas de estudio sería, además, optimizar la obtención de semilla proporcionando alimentos adecuados producidos a bajo costo, mejorando las técnicas de producción de microalgas principalmente, lo cual reduciría en gran medida uno de los problemas a los que se enfrentan los acuicultores que dependen de la disponibilidad de alimento vivo.

El género *Mytilus* es uno de los más cosmopolitas de todos los géneros marinos, ocurre en habitat oceánicos y estuarinos, tanto en zonas intermareales como submareales y ocupa

una gran diversidad de substratos. La posición taxonómica de formas de mitilidos genética y morfológicamente distinguibles ha sido el objeto de considerables debates por muchos años. Por ejemplo, algunos autores (Gosling, 1984; Johannesson *et al.*, 1990) han sugerido que los miembros del complejo *Mytilus edulis* son ecotipos o variedades, mientras otros (McDonald y Koehn, 1988; McDonald *et al.*, 1991) recomiendan el reconocimiento de los miembros del complejo *Mytilus edulis* como especies separadas. Cualquier debate acerca del nivel taxonómico de especies depende del concepto de especie que se utilice. Inicialmente, la taxonomía de este género se basa solamente en las características morfológicas y casi exclusivamente sobre caracteres de la concha. El ambiente heterogéneo que influye en la morfología de la concha, combinado con lo que ahora se reconoce como una interacción sinérgica compleja de varios factores ambientales en algunas especies, produjo una confusión en la taxonomía de este género (Koehn, 1991).

*Mytilus galloprovincialis* (el mejillón mediterráneo) fue descrito inicialmente por Lamarck en 1819. Es una especie de aguas cálidas que ocurre en el Mar Mediterráneo y a lo largo de la costa atlántica de Europa, tan lejos como el noroeste de Irlanda y suroeste de Inglaterra. *M. galloprovincialis* también ha sido reportado desde la costa oeste de Norteamérica (McDonald y Koehn, 1988) hasta el oeste de Australia; Sarver y Foltz (1993) mencionan que fue introducido en Japón, Hong Kong, Sudamérica y Sur de California. Su adaptación fisiológica a aguas cálidas lo distingue del mejillón azul de aguas frías, *Mytilus edulis*.

Históricamente, la mayoría de los autores ha preferido considerar a *M. galloprovincialis* como una subespecie o raza de *M. edulis*. Sin embargo, estudios electroforéticos demuestran que *M. edulis* y *M. galloprovincialis* son especies distintas porque cada una mantiene un conjunto distinto de alelos con notable frecuencia de alelos homogéneos a través de grandes

distancias geográficas (Koehn, 1991; Gardner, 1992).

Por otro lado, los resultados de investigaciones recientes hechas en fragmentos de DNA mitocondrial (Skibinski *et al.*, 1983; Edwards y Skibinski, 1987) y las diferencias que han sido reportadas en el tamaño y la estructura del espermatozoide de estos mejillones indican una distancia genética suficiente para considerar *M. edulis* y *M. galloprovincialis* como especies separadas (Beaumont *et al.*, 1989). Con base en los antecedentes acerca de las especies presentes en nuestros lugares de colecta y gracias a la identificación directa de algunos especímenes que se enviaron al Dr. Raymond Seed (Universidad de Gales, Bangor, Reino Unido), se concluye que la especie usada en el presente estudio es *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, que guarda la siguiente posición sistemática (Keen, 1971).

CLASE:	PELECYPODA
SUBCLASE:	POLYSYRINGIA
ORDEN:	MYTILOIDA
SUPERFAMILIA:	MYTILACEA
FAMILIA:	MYTILIDAE
GENERO:	<i>Mytilus</i> (Linnaeus, 1758)
ESPECIE	<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819

## I.2. OBJETIVOS

1. Seleccionar especies de microalgas susceptibles de cultivo masivo con técnicas poco complejas (semi contínuos) y con buena producción de biomasa, basándose en datos de literatura, en los resultados de laboratorio y en su composición proximal.
  
- 2.Determinar la técnica de alimentación (contínua o dividida) adecuada para *Mytilus galloprovincialis*.
  
- 3.Conocer la calidad alimenticia de las microalgas frescas y seleccionar las más adecuadas como dieta para *Mytilus galloprovincialis*.
  
- 4.Determinar la mejor técnica de preservación de estas microalgas con base en:
  - a)El crecimiento de *Mytilus galloprovincialis*
  - b)Los cambios bioquímicos en las microalgas
  - c)La viabilidad de las microalgas
  - d)La eficiencia de absorción

## II. MATERIALES Y METODOS

### II.1 Selección de especies de microalgas y métodos de cultivo.

Se consideraron inicialmente seis cepas de microalgas de uso común o potencial en acuicultura, que se encuentran en la colección del CICESE. Estas fueron *Chaetoceros* sp. (clone CH-X-1), *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (PH-T-1), *Tetraselmis* sp. (TE-X-1), *Isochrysis* sp. (IS-X-1), *Skeletonema menzelii* (SK-M-3) y *Nannochloris* sp. (NA-X-1). Algunas de éstas han sido aisladas localmente y para la mayoría se conocen sus respuestas a medios simplificados en cultivos terminales ("batch") (González-Leonardo, 1990; Trujillo-Valle, 1993).

Para el mantenimiento de las cepas y de los inóculos se siguieron los métodos convencionales descritos por Guillard (1983). En todos los casos el medio de cultivo empleado fue la formulación "f", sin silicatos para *Tetraselmis* e *Isochrysis* (Guillard y Rhyter, 1962). El agua de mar utilizada se esterilizó según el método de Hemerick (1973) y las soluciones "stock" se esterilizaron por separado en autoclave para evitar la formación de precipitados (Provasoli *et al.*, 1957).

Los cultivos se mantuvieron en condiciones aproximadamente estables de salinidad (de 32 a 33 ‰), a temperatura de 20 a 22 °C. La iluminación fue continua con una irradiancia de aproximadamente 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , proporcionada por dos lámparas fluorescentes de luz fría y dos de luz de día. El pH se mantuvo entre 7.5 y 8.2 por inyección continua de CO<sub>2</sub>.

Cuando en los inóculos se obtuvo la densidad de microalgas deseada, éstos se transfirieron a carboys de 20 l, y se siguió la técnica de cultivo semicontinuo (Vonshak,

1986), con diluciones diarias que variaron entre el 30 y el 75% según las características de crecimiento de cada cepa. Con base en los resultados obtenidos se seleccionaron las primeras cuatro especies de las seis mencionadas inicialmente, que fueron utilizadas para los bioensayos de alimentación con dietas frescas.

La concentración celular de los cultivos semicontínuos usados para los bioensayos fue medida diariamente al tiempo de la cosecha, por conteos con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad.

Para obtener el peso seco total y orgánico de cada especie ensayada, se filtraron periódicamente 100 ml de cultivo a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C) de 4.7 cm de diámetro, previamente quemados. Las muestras se secaron en una estufa de convección a 60 °C por 8 horas y se pesaron en una balanza analítica. Posteriormente, se incineraron a 490 °C por 12 horas y se pesaron para obtener el contenido de cenizas y, por diferencia, el peso seco libre de cenizas (peso seco orgánico) (Sorokin, 1973).

La composición proximal de cada especie fue obtenida en experimentos de crecimiento llevados a cabo en paralelo (González-Medina, 1991; López-Elías y Voltolina, 1993); las proteínas fueron determinadas con el método de Lowry *et al.* (1951) modificado por Farber-Lorda (1986), los carbohidratos fueron analizados según el método colorimétrico con fenol-acido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), en muestras que fueron inicialmente hidrolizadas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M por 2 horas en baño maría (Whyte, 1987). Los lípidos fueron determinados con el método colorimétrico de Pande *et al.* (1963), después de la extracción por el método de Bligh y Dyer (1959).

## II.2. Métodos de colecta y acondicionamiento de los organismos en el laboratorio.

Por motivos logísticos, se hicieron dos bioensayos sucesivos, cada vez con dos especies de microalgas. Para ésto, dos lotes de juveniles (20 a 30 mm de longitud) de *Mytilus galloprovincialis* fueron colectados en la Bahía de San Quintín (Fig. 1) y transportados al laboratorio en recipientes con hielo para disminuir su metabolismo; una vez en el laboratorio, se limpió la parte externa de las valvas y los organismos se colocaron en estanques de fibra de vidrio de 500 l para su acondicionamiento durante dos semanas. Durante este período la alimentación fue *ad libitum* con una mezcla en partes iguales de las dos microalgas usadas posteriormente para los experimentos. La temperatura del agua se mantuvo entre 18 y 22 °C, con un promedio de 20 °C. Los cambios de agua y el lavado del estanque se hicieron diariamente.

## II.3. Bioensayo de alimentación de *Mytilus galloprovincialis* con microalgas frescas.

Después de 15 días de acondicionamiento, 13 grupos de 15 organismos cada uno, fueron seleccionados al azar y colocados en acuarios de 15 l, después de comprobar la homogeneidad de sus tamaños por medio de un análisis de varianza. Antes de iniciar la fase experimental de crecimiento, los organismos permanecieron durante 48 horas sin alimentar para limpiar totalmente su tracto digestivo.

Uno de los grupos fue sacrificado inmediatamente antes de comenzar con el experimento, para conocer los parámetros biométricos iniciales. Para cada uno de los dos lotes se obtuvieron las tres dimensiones de la concha (longitud o eje de crecimiento máximo, alto y ancho) por medio de un calibrador vernier con precisión de 0.1 mm y los pesos secos totales de carne y concha y el peso orgánico de la carne con el mismo método gravimétrico

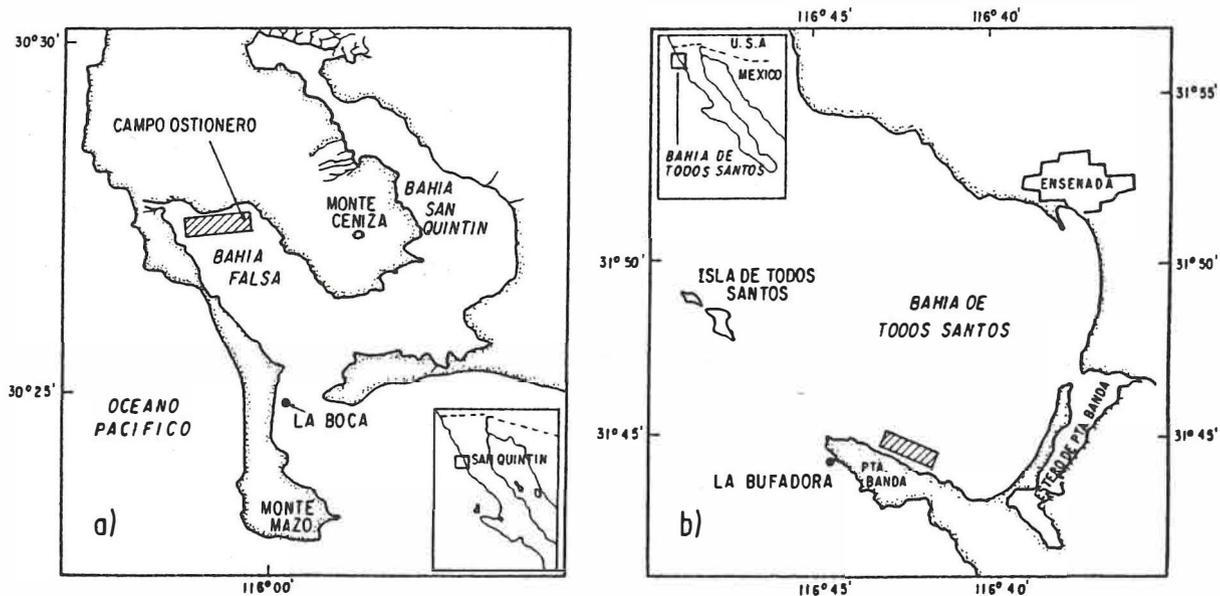


Figura 1. Ubicación de los sitios de colecta. 1: Bahía San Quintín, ensayos de alimentación con microalgas frescas y preservadas. 2: Estero Punta Banda, ensayo de eficiencia de asimilación.

detallado anteriormente para microalgas, pero con tiempos de secado más largos hasta obtener el peso seco constante. El peso húmedo no fue considerado debido a la elevada variabilidad obtenida en experimentos previos.

La ración diaria de alimento se investigó con experimentos preliminares en los cuales se suministraron dos veces al día, durante algunos días, volúmenes de cultivo de microalgas equivalentes al 2, 3 y 4 % del peso seco total de los organismos, por un total diario de 4, 6 y 8 % respectivamente. La primera cantidad fue consumida dentro de las primeras tres horas y el 8% causó la producción de pseudoheces por parte de los organismos; por lo tanto para los experimentos subsecuentes se seleccionó la ración intermedia, con la cual no se observó la producción de pseudoheces.

Los organismos fueron alimentados durante 31 días con las microalgas correspondientes; para cada microalga, los organismos de tres acuarios recibieron la ración en forma dividida en dos alicuotas iguales, una en la mañana y la otra en la tarde. Los otros tres grupos de organismos fueron alimentados con la misma cantidad de la microalga, pero proporcionada continuamente, durante 24 horas, por medio de una bomba peristáltica multicanal (Fig. 2).

Las condiciones experimentales fueron: temperatura  $21 \pm 1$  °C, pH de  $7.9 \pm 0.1$ , oxígeno 100 % de saturación. Los acuarios se limpiaron diariamente y el agua se cambió con la misma frecuencia.

Al final del experimento, los organismos se dejaron sin alimentar por 48 horas y se volvieron a medir la concha, el peso seco total y orgánico del tejido y el peso seco de la concha, los cuales fueron obtenidos como se describió anteriormente.

El índice de condición fue calculado con la ecuación  $(PSOT/PSC) \times 1000$ , donde PSOT = peso seco orgánico del tejido y PSC = peso seco de la concha (Lucas y Beninger, 1985).

Las razones de conversión del alimento (RCA) fueron obtenidas con la fórmula de Sedgwick (1980):  $RCA = \text{peso seco total del alimento proporcionado} / \text{peso total ganado}$ , pero usando los pesos secos totales y orgánicos de la carne en vez de los pesos húmedos.

#### II.4. Cosecha y métodos de preservación de microalgas.

Con base en los resultados obtenidos con los bioensayos de alimentación con microalgas frescas, se seleccionaron para los bioensayos de alimentación con microalgas preservadas las cepas *Chaetoceros* sp. y *Phaeodactylum tricorutum*.

La biomasa de *Chaetoceros* y *Phaeodactylum* fue producida en cultivos semicontínuos de 15 l mantenidos estables por medio de diluciones diarias del 50 y del 75 % respectivamente. Las condiciones de cultivo fueron como se describió anteriormente.

Las producciones diarias fueron concentradas y centrifugadas a 2000 r.p.m. por 15 minutos y el concentrado fue dividido en tres volúmenes iguales, que se preservaron con tres diferentes métodos: 1) preservación por secado, la cual se hizo en una estufa de convección a 30 °C; 2) por congelación lenta a -20 °C y 3) por liofilización, por medio de un liofilizador Labconco, después de congelar a -20 °C.

Las microalgas liofilizadas y las secadas en estufa fueron almacenadas en bolsas de plástico con cierre hermético que contenían sílica gel y las congeladas fueron mantenidas en recipientes de vidrio y refrigeradas a -20 °C por un período de 60 días.

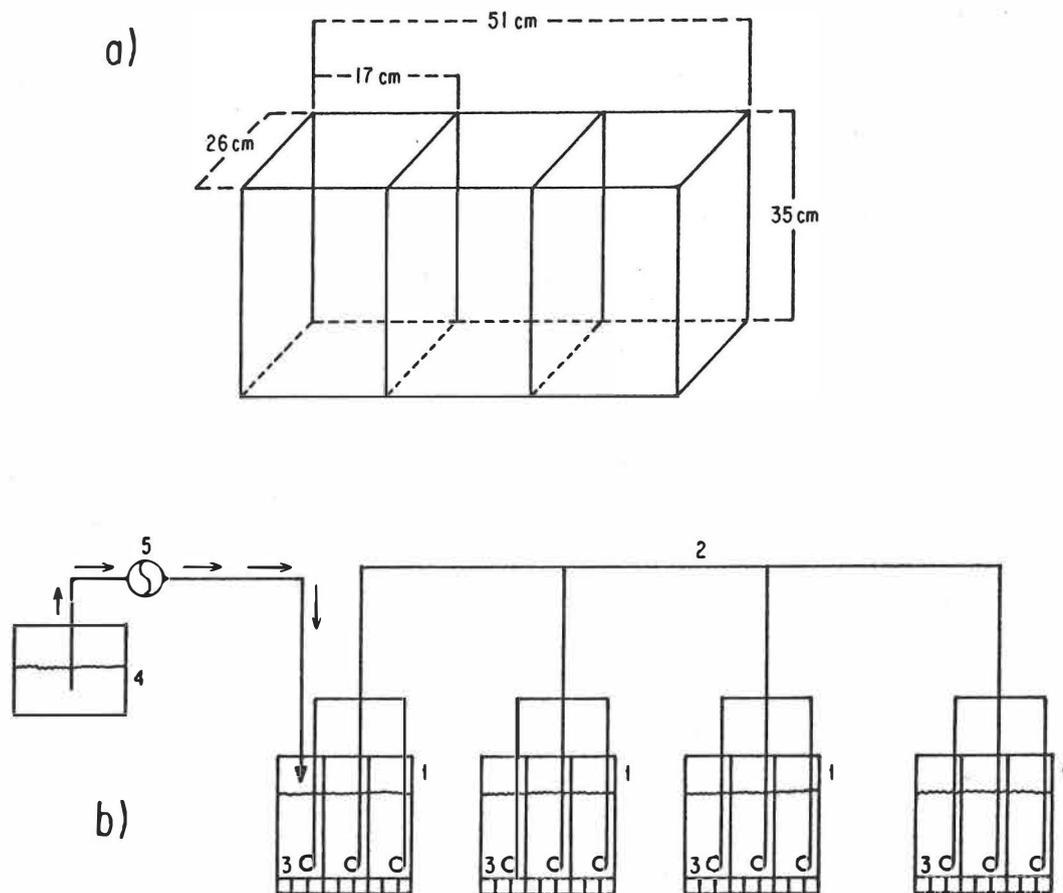


Figura 2. Esquema de los acuarios (a) y sistema (b) utilizados durante los bioensayos de alimentación de *Mytilus galloprovincialis*. 1.- Acuarios divididos en secciones. 2.- Sistema de aireación. 3.- Rejillas con malla tipo mosquitero. 4.- Recipiente de suministro del alimento. 5.- Bomba peristáltica.

Los pesos secos total y libre de cenizas fueron determinados como en Sorokin (1973). Las muestras fueron secadas a peso constante en una estufa de convección a 60 °C y calcinadas en una mufla a 470 °C.

## **II.5. Composición bioquímica de microalgas preservadas.**

Los análisis proximales fueron realizados por triplicado en muestras frescas, recién preservadas y después de dos meses de almacenamiento. Las técnicas empleadas fueron las descritas anteriormente.

Los perfiles de aminoácidos y de ácidos grasos fueron realizados solamente en las muestras liofilizadas y secas, recién preservadas y después de dos meses de almacenadas para ácidos grasos, y sólo después de dos meses de preservación para los aminoácidos.

Las concentraciones de ácidos grasos fueron obtenidas por cromatografía de gases acorde a AOAC (1980) y los aminoácidos con un analizador de aminoácidos Dionex D5-50 con amortiguadores de citrato de litio, en el Laboratorio Michelson de Los Angeles, California, E.U.A.

No fue posible realizar los perfiles de aminoácidos y de ácidos grasos en muestras frescas o congeladas, ya que las técnicas empleadas para estos análisis requieren de biomasa seca.

## II.6. Bioensayo de alimentación de *Mytilus galloprovincialis* con microalgas preservadas.

Las microalgas preservadas usadas en este bioensayo permanecieron almacenadas, como se describió anteriormente, por un período de 60 días antes de administrarlas a los organismos para observar eventuales diferencias en el crecimiento de los mejillones debido al tiempo de preservación de las microalgas.

La selección de los organismos de *Mytilus galloprovincialis* y la obtención de los parámetros biométricos iniciales fue como en el caso del ensayo con microalgas frescas pero, debido al diferente período de colecta, se emplearon organismos de entre 40 y 50 mm de longitud.

Diariamente, antes de la alimentación de los mejillones, la ración correspondiente (6 % del peso seco de mejillones) de las microalgas preservadas (peso calculado en base al peso seco orgánico inicial, sin considerar eventuales pérdidas debidas a disolución de compuestos orgánicos) tanto de *Chaetoceros* como de *Phaeodactylum* fueron resuspendidas en 300 ml de agua de mar por medio de un agitador magnético, durante 4 horas.

Debido a los resultados del primer ensayo, las dos microalgas en forma preservada (secas, liofilizadas y congeladas) y fresca (control) fueron proporcionadas diariamente en dos alicuotas, como se describió anteriormente.

Los mejillones estuvieron en estas condiciones de alimentación por un período de 31 días, después de lo cual se procedió a sacrificarlos para obtener los parámetros finales de crecimiento, tanto de concha como de tejido y se calculó el índice de condición con la metodología ya mencionada.

## II.7. Viabilidad de microalgas preservadas.

Los concentrados de muestras de *Chaetoceros* sp. y *Phaeodactylum tricornutum* centrifugadas a 2,000 r.p.m. por 15 min. en botellas de plástico de 500 ml fueron divididos en alicuotas de 15 ml y tratados con los siguientes procedimientos: a) unas muestras se colocaron en tubos de ensayo y se pusieron en refrigeración a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su congelado lento; b) otras se congelaron rápidamente con una mezcla de hielo seco y acetona y con nitrógeno líquido y se almacenaron en un congelador a  $-60^{\circ}\text{C}$ ; c) algunas de estas muestras se liofilizaron en un liofilizador Labconco y se almacenaron en un desecador con sílica gel para evitar que absorbieran humedad.

Para comprobar la sobrevivencia de las microalgas a estos tratamientos, las muestras se descongelaron en agua corriente, las células se inocularon por triplicado en tubos de ensayo con medio "f" y se midió diariamente la densidad óptica durante 7 días; como control se usaron microalgas centrifugadas pero sin congelar ni liofilizar.

Sólo se observó crecimiento en el control (microalgas centrifugadas). En vista de esto, se procedió a utilizar los criopreservadores glicerol y DMS (dimetil sulfóxido) a las concentraciones del 1, 5 y 10 % (v/v), que fueron agregados a los tubos con microalgas recién centrifugadas, que después se colocaron en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Esta misma metodología se utilizó con microalgas mantenidas en cultivo terminal ("batch") y cosechadas en la fase estacionaria, con el propósito de inducir la formación de un mayor porcentaje de formas de resistencia, que logran resistir los diferentes tratamientos de preservación.

Se seleccionaron muestras de los diversos métodos de preservación a diferentes tiempos de almacenamiento (7, 15 y 30 días), para observar la sobrevivencia de las microalgas. Para ésto, las muestras fueron inoculadas en tubos de ensayo con medio nuevo con una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$  y en vista de que se observó una concentración relativamente alta de bacterias en los cultivos madre, éstos fueron centrifugados a 1000 r.p.m. para eliminarlas. El concentrado se diluyó en una serie de tubos para iniciar con densidades de  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^4$  cél.  $\text{ml}^{-1}$ . El porcentaje de sobrevivencia se evaluó en base a presencia o ausencia de crecimiento en las diferentes diluciones.

## II.8. Bioensayo de eficiencia de absorción de *Mytilus galloprovincialis*.

Para el ensayo de eficiencia de absorción los mejillones se colectaron en las instalaciones de una compañía comercial ubicada en la boca del Estero de Punta Banda (Fig. 1).

Los organismos se acondicionaron en el laboratorio por un período de 15 días, durante el cual fueron alimentados *ad libitum* con una mezcla de las microalgas *Chaetoceros* y *Phaeodactylum*. Después de este período, los mejillones se dejaron sin alimentar durante 48 horas para que limpiaran totalmente el tracto digestivo y se seleccionaron al azar grupos de 15 organismos (entre 29 y 32 mm de longitud). Cada grupo se colocó en una caja de acrílico de 3000 ml, que se llenó con agua de mar previamente esterilizada por medio de rayos ultravioleta.

En un ensayo preliminar, se observó que cuando se administraba una cantidad de alimento equivalente al 3% del peso de los mejillones los organismos no la consumían en su totalidad en el período programado de cinco horas. Además, en el caso de las microalgas

preservadas mucho alimento tendía a precipitar al fondo de las cámaras y dejaba de estar disponible. Por estas razones se decidió proporcionar el 1.5 % de alimento, cantidad que era consumida en un período de tres horas, lo cual dió oportunidad de coleccionar las heces producidas a las cinco horas.

Los ensayos de eficiencia de absorción se realizaron probando las dos microalgas (en forma separada), en una forma de preservación cada vez.

Se administró *Chaetoceros* en una forma de preservación a tres cámaras, con 15 organismos cada una y a otras tres cámaras se administró *Phaeodactylum* en la misma forma. Antes de la alimentación, las microalgas preservadas se homogeneizaban en recipientes con agua de mar durante dos horas, por medio de un agitador magnético.

Las heces producidas y el alimento sobrante se retiraron por medio de un sifón, cinco horas después de haber suministrado el alimento. Las heces se tamizaron con dos tamices de luz de malla de 40 y 120  $\mu\text{m}$  y se lavaron con formiato de amonio para eliminar las sales. Al día siguiente se volvieron a coleccionar las heces producidas durante la noche y se lavaron de la misma manera. Posteriormente se metieron en una estufa a 30 °C por 12 horas y finalmente se almacenaron en un desecador para los subsecuentes análisis bioquímicos.

El alimento sobrante se filtró a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 4.5 cm de diámetro, previamente quemados y pesados y se secó a 60 °C por seis horas para obtener el peso seco; después de esto, las muestras se incineraron en una mufla a 470 °C para obtener las cenizas, y por diferencia el peso seco orgánico.

Cada día durante la mañana, después de coleccionar las últimas heces producidas, se

limpiaron las cámaras, se llenaron nuevamente con agua y se administró a los organismos su nueva ración. Esta rutina se siguió durante 5 días para cada microalga y para cada método de preservación (secas, liofilizadas y congeladas).

Al finalizar el ensayo con un tipo de alimento, los organismos se dejaron sin alimentar durante 48 horas, antes de iniciar con otro tipo de dieta. Los mismos organismos recibieron estos regimenes de alimentación un total de 21 días y la prueba con microalgas frescas se hizo por separado, con diferentes organismos.

Al final del ensayo los mejillones se sacrificaron, se obtuvieron sus datos biométricos finales y se separó el tejido de la concha. La carne se molió en una licuadora comercial y posteriormente se liofilizó. Con el tejido homogeneizado se realizaron análisis bioquímicos proximales y muestras adicionales se enviaron a un laboratorio para su análisis de ácidos grasos. No fue posible analizar su contenido de aminoácidos, ya que para este análisis se requiere una cantidad de muestra mayor de la que se dispuso.

El total de heces producidas durante cada día resultó demasiado bajo para poder realizar los análisis de calidad de biomasa en forma individual. Por este motivo, todas las heces producidas en cada acuario con cada tipo de dieta se juntaron, se tomaron submuestras para realizar los análisis proximales y el resto se utilizó para conocer el peso seco total y orgánico.

Con los datos de heces y de alimento sobrante se calculó la eficiencia de absorción (E.A.) de *Mytilus galloprovincialis* por medio de la siguiente fórmula:  $\% E.A. = [(F-E)/(1-E) \times F] \times 100$ , donde F= Razón entre peso orgánico seco y peso seco total del alimento, E= Razón entre peso orgánico seco y peso seco total de las heces (Conover, 1966).

## **II.9. Análisis estadístico.**

Se hicieron pruebas de homogeneidad de varianzas y de normalidad de los residuos con cada serie de datos generados. Los datos de crecimiento con cuatro microalgas fueron analizados con un análisis de varianza de dos vías para examinar el efecto de las microalgas y del régimen de alimentación y los que no resultaron normales se analizaron con el método de Kruskal-Wallis. Los datos de las microalgas preservadas fueron procesados por medio de análisis de varianza no paramétrico de una vía (Kruskal Wallis) al igual que para los datos generados en los ensayos de eficiencia de asimilación. Se hicieron además las comparaciones múltiples con el método LSD para los datos que resultaron normales y con el método de Student-Newman-Keuls y de Dunn para los datos no normales (Sokal y Rohlf, 1981). Esto se hizo por medio de los paquetes estadísticos Statgrafics y Sigma Stat. En todos los casos el límite de aceptación fue  $\alpha=0.05$ .

### III. RESULTADOS

#### III.1. Selección y cultivo de microalgas.

De las seis microalgas ensayadas originalmente, sólo cuatro fueron capaces de mantenerse en cultivo semicontínuo; estas fueron: *Chaetoceros*, *Isochrysis*, *Phaeodactylum* y *Tetraselmis*, con diluciones diarias de 50, 30, 75 y 30% respectivamente (Fig. 3). En el caso de *Skeletonema*, se ensayaron varias diluciones (desde 25 hasta 70%) pero sin resultados satisfactorios ya que los cultivos después de su dilución tardaban en recuperar su nivel inicial y hasta los mantenidos sin dilución tuvieron un crecimiento irregular (Fig. 4). La microalga *Nannochloris* solamente se mantuvo en matraces fembach, en los cuales las células tendían a adherirse a las paredes del recipiente. Por este motivo se decidió que esta especie y *Skeletonema* no eran adecuadas para el cultivo y probablemente tampoco como alimento para *Mytilus galloprovincialis*, por lo cual no fueron utilizadas para los bioensayos de alimentación.

La composición proximal de las cuatro primeras especies (Tabla I) se obtuvo de resultados generados en nuestro laboratorio en experimentos llevados a cabo poco antes o en paralelo con el presente trabajo, en iguales condiciones de cultivo (González-Medina, 1991; López-Elías y Voltolina, 1993).

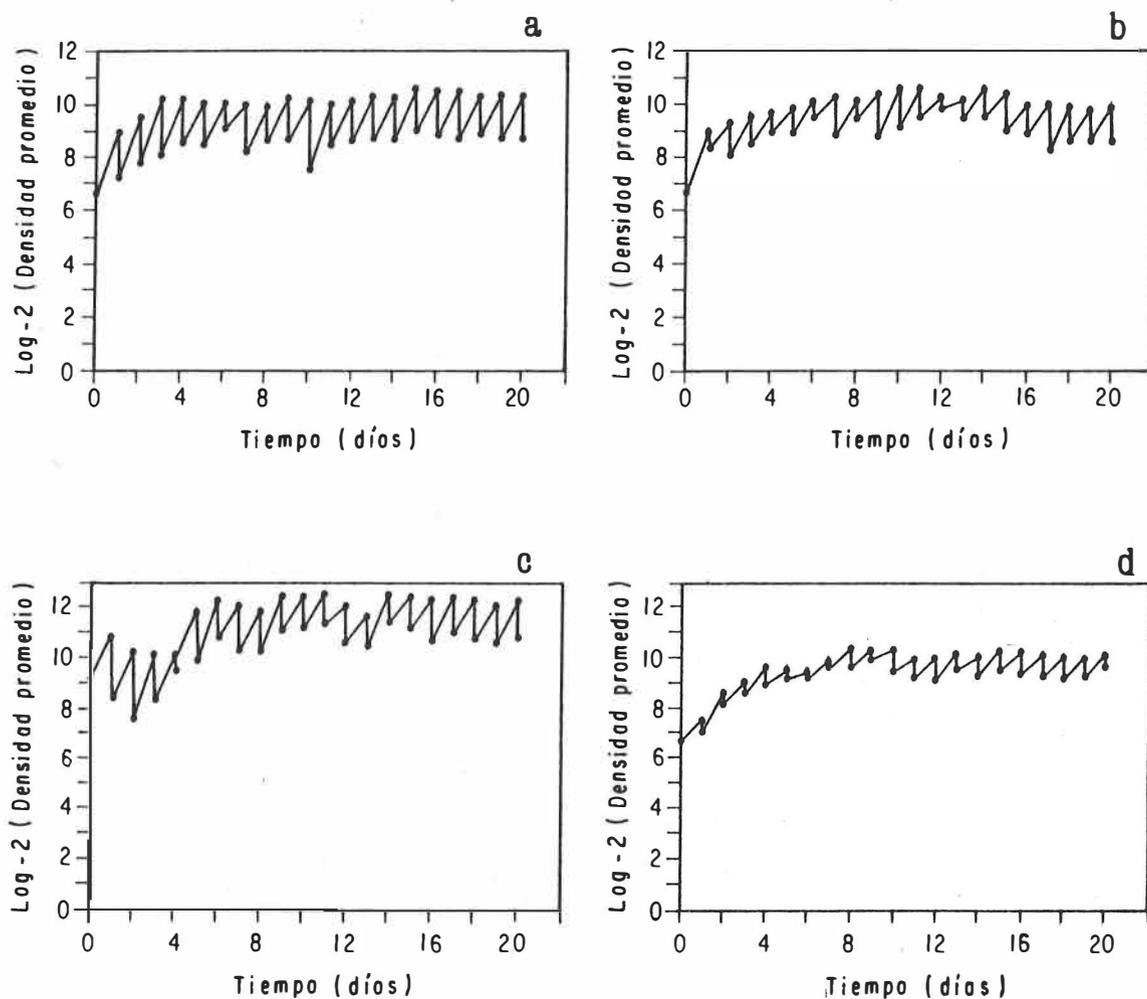


Figura 3. Producción de biomasa (en  $\log_2$  de la densidad óptica) de *Chaetoceros* sp. (a), *Isochrysis* sp. (b) *Phaeodactylum tricornutum* (c) y *Tetraselmis suecica* (d) cultivadas en sistema semicontínuo.

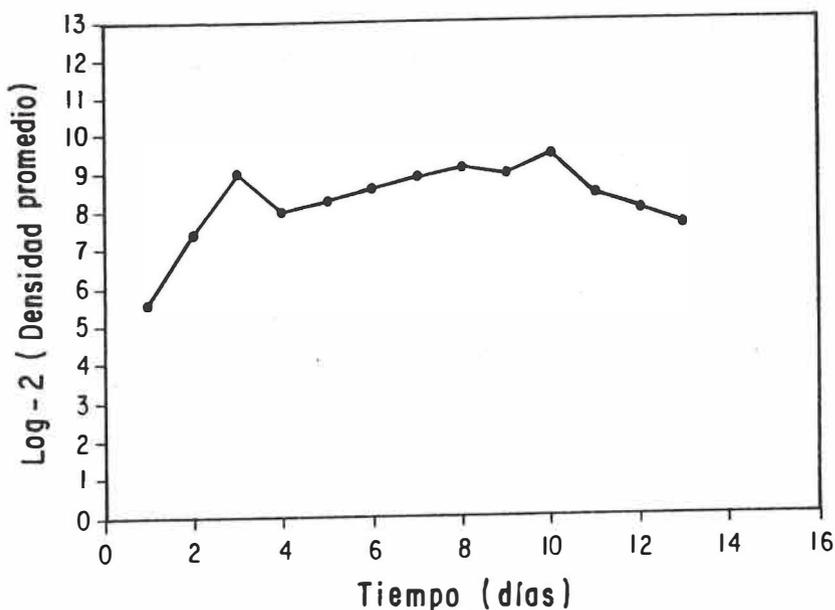


Figura 4. Producción de biomasa (en  $\log_2$  de la densidad óptica) de *Skeletonema menzeli* en cultivo terminal (batch).

Tabla I. Composición proximal promedio de las cuatro microalgas usadas en el experimento de alimentación de *Mytilus galloprovincialis*. Las fracciones orgánicas fueron recalculadas como porcentajes del total de los contenidos orgánicos (González-Medina, 1991; López-Elías y Voltolina, 1993).

	<i>Chaetoceros</i>	<i>Isochrysis</i>	<i>Phaeodactylum</i>	<i>Tetraselmis</i>
PROTEINAS	60.3	65.4	59.1	68.9
CARBOHIDRATOS	16.0	12.3	16.7	14.0
LIPIDOS	23.7	22.3	24.2	17.1
CENIZAS	18.6	7.2	16.8	17.1

### III.2. Bioensayo de alimentación de *Mytilus galloprovincialis* con microalgas frescas.

Los incrementos medios de los tres ejes de crecimiento de *Mytilus galloprovincialis* variaron entre aproximadamente el 6.5 y el 11.5% de las dimensiones iniciales, sin que hubiera diferencias importantes entre dietas y forma de alimentación, mientras que los incrementos en peso demuestran que *Chaetoceros* es una dieta superior a las demás microalgas y que *Tetraselmis* es inferior a *Phaeodactylum* e *Isochrysis*. Estas diferencias, como se mencionó, no son evidentes cuando se consideran los incrementos en los tres ejes de crecimiento longitudinal de la concha, con la posible excepción del alto (Tablas II a V), aunque las pruebas a posteriori no lograron evidenciar las diferencias indicadas por la prueba de análisis de varianza de dos vías. Por otro lado, los incrementos en los pesos de la carne y de la concha, los valores de los índices de condición y las razones de conversión del alimento concurren en indicar la superioridad de *Chaetoceros* y que *Isochrysis* y *Phaeodactylum* no difieren significativamente en su calidad dietética para *Mytilus galloprovincialis* (Tablas VI a X y Fig. 5).

Por estos motivos, los siguientes experimentos se llevaron a cabo con *Chaetoceros* sp. y con *Phaeodactylum tricornutum* que, igualmente eficiente como dieta que la flagelada *Isochrysis* sp., presenta varias ventajas sobre ésta, ya que puede ser cultivada con métodos y medios sencillos sin alterar su composición (López-Eliás y Voltolina, 1993) y que permite cosechas diarias de hasta el 70% del volumen total de cultivo, lo cual disminuye considerablemente los costos de su producción.

Tabla II. Datos generales promedios (entre paréntesis errores estándar ) de los incrementos en el eje de crecimiento máximo (E.C.M.), el alto y el ancho de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con cuatro microalgas y dos formas de alimentación. c) alimentación continua, d) alimentación dividida, x) promedio entre las dos formas de alimentación.

Microalga	E.C.M.		Alto		Ancho	
	Incremento mm	%	Incremento mm	%	Incremento mm	%
<i>Chaetoceros</i> (c)	2.50 (0.25)	9.76	1.42 (0.18)	9.37	1.00 (0.11)	11.57
<i>Chaetoceros</i> (d)	1.81 (0.22)	6.96	1.06 (0.15)	7.08	0.79 (0.09)	9.10
<i>Chaetoceros</i> (x)	2.06 (0.17)	8.20	1.24 (0.12)	8.24	0.89 (0.07)	10.28
<i>Isochrysis</i> (c)	2.10 (0.31)	8.10	1.29 (0.19)	8.59	0.78 (0.11)	8.98
<i>Isochrysis</i> (d)	1.94 (0.27)	7.51	0.96 (0.17)	6.31	0.76 (0.11)	8.87
<i>Isochrysis</i> (x)	2.03 (0.21)	7.80	1.13 (0.13)	7.48	0.77 (0.08)	8.90
<i>Phaeodactylum</i> (c)	2.40 (0.28)	9.40	1.41 (0.15)	9.52	0.88 (0.12)	9.50
<i>Phaeodactylum</i> (d)	2.00 (0.24)	8.00	1.01 (0.16)	6.96	0.74 (0.12)	8.30
<i>Phaeodactylum</i> (x)	2.20 (0.18)	8.70	1.21 (0.11)	8.25	0.81 (0.08)	8.90
<i>Tetraselmis</i> (c)	2.00 (0.34)	8.16	0.86 (0.16)	5.92	0.77 (0.14)	8.97
<i>Tetraselmis</i> (d)	2.08 (0.32)	8.56	0.78 (0.19)	5.32	0.89 (0.24)	10.18
<i>Tetraselmis</i> (x)	2.04 (0.23)	8.36	0.82 (0.12)	5.62	0.83 (0.13)	9.58

Tabla III. Análisis de varianza de dos vías del incremento en el eje de crecimiento máximo de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con cuatro microalgas y dos formas de alimentación.

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	S
Efectos principales	9.6866743	4	2.4216686	0.657	0.6223
Microalga	1.0998419	3	0.3666140	0.099	0.9603
Tipo de Alimentación	8.5797901	1	8.5797901	2.328	0.1280
Interacción de factores	9.4034462	3	3.1344821	0.850	0.4671
Residual	1290.0549	350	3.685712		
Total (Corregido)	1309.1451	357			

Tabla IV. Análisis de varianza de dos vías del incremento en alto de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con cuatro microalgas y dos formas de alimentación.

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	S
Efectos principales	17.532356	4	4.3830891	3.251	0.0123
Microalga	10.080466	3	3.3601552	2.492	0.0600
Tipo de Alimentación	7.532916	1	7.5329164	5.587	0.0186
Interacción de factores	1.4033279	3	0.4677760	0.347	0.7914
Residual	471.94181	350	1.3484052		
Total (Corregido)	490.87749	357			

Tabla V. Análisis de varianza de una vía (Kruskal Wallis) del incremento en ancho de la concha de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con cuatro microalgas.

	RANGO PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
<i>Chaetoceros</i>	190.76	*
<i>Isochrysis</i>	176.53	*
<i>Phaeodactylum</i>	175.91	*
<i>Tetraselmis</i>	173.10	*

Tabla VI. Datos generales promedios (entre paréntesis errores estándar) de los valores de crecimiento de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con cuatro microalgas y dos formas de alimentación. c) alimentación continua, d) alimentación dividida, x) promedio entre las dos formas de alimentación.

Microalga	Peso Seco Total del tejido		Peso Seco Orgánico del tejido		Peso Seco de la concha	
	Incremento mg	%	Incremento mg	%	Incremento mg	%
<i>Chaetoceros</i> (c)	46.59 (2.9)	96.3	29.94 (1.9)	81.0	242.02 (20.6)	51.0
<i>Chaetoceros</i> (d)	38.82 (2.6)	80.2	25.67 (1.7)	69.5	203.48 (16.3)	42.9
<i>Chaetoceros</i> (x)	42.70 (2.0)	88.3	27.80 (1.3)	75.2	222.75 (13.2)	47.0
<i>Isochrysis</i> (c)	35.77 (3.2)	73.9	21.71 (1.9)	58.7	223.48 (23.5)	47.1
<i>Isochrysis</i> (d)	36.11 (3.0)	74.6	21.01 (1.9)	56.8	192.59 (19.7)	40.6
<i>Isochrysis</i> (x)	35.94 (2.2)	74.3	21.36 (1.3)	57.8	208.04 (15.3)	43.8
<i>Phaeodactylum</i> (c)	35.38 (3.7)	61.9	25.50 (2.6)	68.7	268.17 (21.7)	53.2
<i>Phaeodactylum</i> (d)	22.95 (4.6)	40.2	19.51 (2.4)	52.6	191.12 (17.7)	37.9
<i>Phaeodactylum</i> (x)	29.17 (3.0)	51.0	22.50 (1.8)	60.7	229.64 (14.5)	45.6
<i>Tetraselmis</i> (c)	24.32 (4.8)	42.6	10.48 (2.2)	28.3	145.01 (23.5)	28.8
<i>Tetraselmis</i> (d)	26.24 (3.8)	45.9	13.72 (2.6)	37.0	164.31 (26.6)	32.6
<i>Tetraselmis</i> (x)	25.28 (3.0)	44.2	12.10 (1.7)	32.6	154.66 (17.7)	30.7

Tabla VII. Análisis de varianza de una vía (Kruskal Wallis) y comparaciones múltiples (método de Student-Newman-Keuls) de los incrementos obtenidos en peso seco total, peso seco orgánico del tejido y peso seco de la concha e índice de condición final de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con cuatro microalgas.

	RANGO	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS			
<b>PESO SECO TOTAL</b>						
<i>Chaetoceros</i>		225.74	*			
<i>Isochrysis</i>		197.38	*	*		
<i>Phaeodactylum</i>		155.14		*	*	
<i>Tetraselmis</i>		143.72				*
<b>PESO SECO ORGANICO</b>						
<i>Chaetoceros</i>		229.92	*			
<i>Isochrysis</i>		188.20		*		
<i>Phaeodactylum</i>		186.28	*	*		
<i>Tetraselmis</i>		117.60				*
<b>P. S. DE LA CONCHA</b>						
<i>Chaetoceros</i>		195.81	*			
<i>Isochrysis</i>		184.57	*			
<i>Phaeodactylum</i>		199.17	*			
<i>Tetraselmis</i>		142.44				*
<b>INDICE DE CONDICION</b>						
<i>Chaetoceros</i>		249.57	*			
<i>Isochrysis</i>		197.93		*		
<i>Phaeodactylum</i>		162.38			*	
<i>Tetraselmis</i>		112.11				*

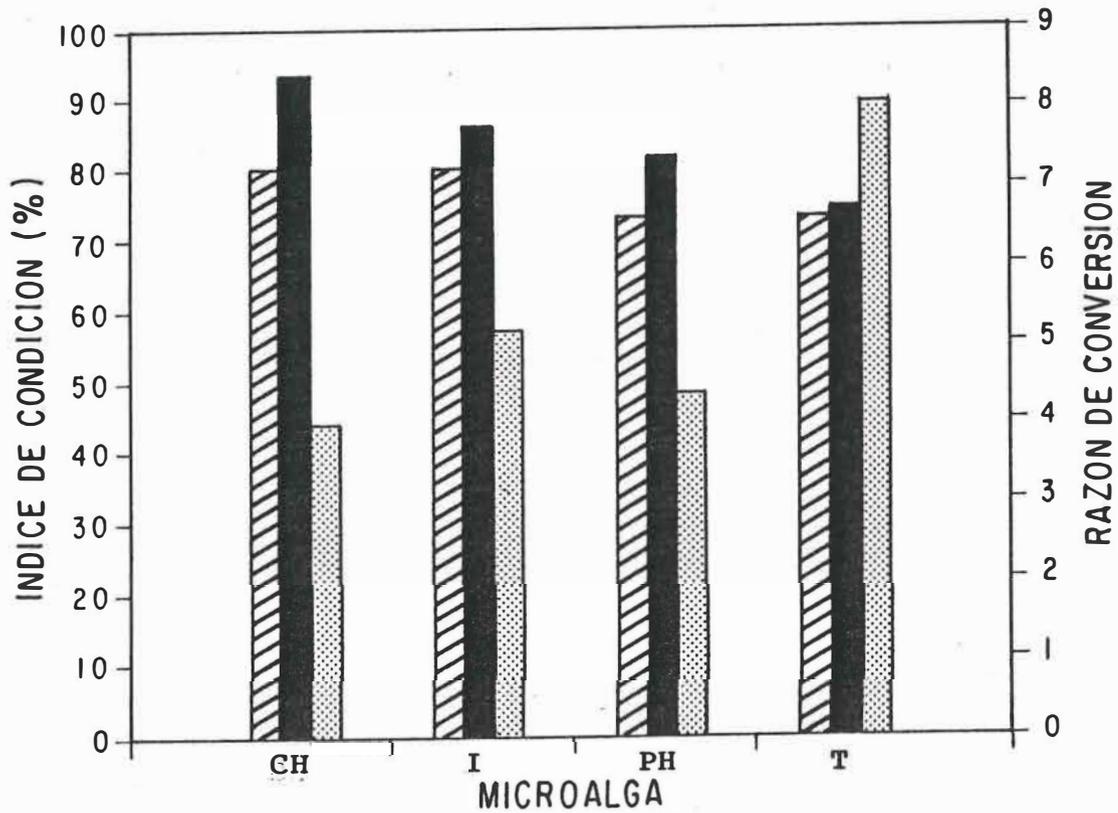


Figura 5. Índice de condición inicial (▨), final (■) y razón de conversión del alimento (▩) de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con *Chaetoceros* sp. (CH), *Isochrysis* sp. (I), *Phaeodactylum tricornutum* (PH) y *Tetraselmis* sp. (T).

### III.3. Bioensayo de alimentación de *Mytilus galloprovincialis* con microalgas preservadas.

Los incrementos en los tres ejes de crecimiento de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con microalgas preservadas resultaron en todos los casos inferiores a los registrados en organismos alimentados con microalgas frescas (Tabla VIII).

En el caso del eje de crecimiento máximo, los incrementos con alimento preservado fueron de cerca de 0.2 mm y de entre 0.11 y 0.20 mm, para *Chaetoceros* y *Phaeodactylum* respectivamente. Con las mismas microalgas, suministradas en forma fresca, los organismos resultaron ser 1.7 y 0.8 mm más largos que al inicio del experimento, en el caso de *Chaetoceros* y de *Phaeodactylum* respectivamente. En este ensayo, a diferencia del primero, la superioridad dietética de la primera de estas microalgas pudo ser evidenciada también con los incrementos longitudinales ya que *M. galloprovincialis* alimentado con *P. tricornutum* incrementó sus dimensiones, por lo que se refiere al eje de crecimiento máximo (ECM), de aproximadamente 0.8 mm, el 50% menos que con *Chaetoceros*.

Consideraciones semejantes se pueden hacer para el alto y el ancho de los mejillones: con las microalgas preservadas se obtuvieron resultados constantemente inferiores en estas mediciones, aunque las diferencias fueron menos importantes que para el ECM con la misma microalga suministrada en forma fresca y no hubo diferencias en los incrementos de los organismos cuando se les alimentó con *Chaetoceros* y con *Phaeodactylum* preservada con la misma técnica. El análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba a posteriori de Dunn (Tabla IX) confirman que las dietas frescas fueron mejores que las preservadas y evidencia además diferencias significativas en los incrementos de *M. galloprovincialis* con los alimentos preservados. En los casos de los incrementos en ancho

Tabla VIII. Datos generales promedios (entre paréntesis los errores estándar) del crecimiento en el eje de crecimiento máximo (ECM), alto y ancho de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con microalgas frescas o preservadas con tres métodos diferentes.

Microalga	ECM		Alto		Ancho	
	Incremento mm	%	Incremento mm	%	Incremento mm	%
<i>Chaetoceros</i>						
SECAS	0.20 (0.05)	0.64	0.17 (0.05)	1.0	0.26 (0.05)	2.4
LIOFILIZAS	0.18 (0.03)	0.58	0.40 (0.12)	2.3	0.23 (0.04)	2.2
CONGELADAS	0.18 (0.03)	0.59	0.32 (0.07)	2.0	0.33 (0.03)	3.2
FRESCAS	1.70 (0.15)	5.42	1.19 (0.17)	6.6	0.93 (0.10)	8.6
<i>Phaeodactylum</i>						
SECAS	0.11 (0.01)	0.36	0.24 (0.04)	1.4	0.19 (0.02)	2.0
LIOFILIZADAS	0.15 (0.01)	0.50	0.33 (0.05)	2.0	0.16 (0.01)	1.5
CONGELADAS	0.21 (0.02)	0.67	0.22 (0.04)	1.2	0.30 (0.05)	2.8
FRESCAS	0.76 (0.10)	2.50	0.53 (0.05)	3.0	0.48 (0.06)	4.5

Tabla IX. Análisis de varianza de una vía (Kruskal Wallis) y comparaciones múltiples (método de Dunn) de los incrementos obtenidos en el eje de crecimiento máximo (ECM), alto y ancho de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con *Chaetoceros* y *Phaeodactylum* frescas y preservadas.

	RANGO	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS			
<b>ECM</b>						
<i>Chaetoceros</i>						
SECAS		85.422	*			
LIOFILIZADAS		83.359	*			
CONGELADAS		93.156		*		
FRESCAS		228.906			*	
<i>Phaeodactylum</i>						
SECAS		67.016	*			
LIOFILIZADAS		68.848	*			
CONGELADAS		108.848		*		
FRESCAS		194.545			*	
<b>ALTO</b>						
<i>Chaetoceros</i>						
SECAS		69.656				
LIOFILIZADAS		96.734	*			
CONGELADAS		106.344	*			
FRESCAS		199.234			*	
<i>Phaeodactylum</i>						
SECAS		96.629	*			
LIOFILIZADAS		118.167		*		
CONGELADAS		86.424	*			
FRESCAS		169.212			*	
<b>ANCHO</b>						
<i>Chaetoceros</i>						
SECAS		87.469	*			
LIOFILIZADAS		89.359	*			
CONGELADAS		130.313		*		
FRESCAS		207.281			*	
<i>Phaeodactylum</i>						
SECAS		73.903				
LIOFILIZADAS		55.818	*			
CONGELADAS		98.288		*		
FRESCAS		160.652			*	

y en el eje de crecimiento máximo (ECM), las microalgas preservadas por congelación dieron resultados superiores que con las liofilizadas y las secadas al aire. Para el alto de los organismos, las microalgas liofilizadas resultaron iguales y hasta superiores a las congeladas. En todos los casos, las secadas al aire dieron los incrementos menores.

También se obtuvieron diferencias para los aumentos de peso seco total y orgánico de los mejillones, que fueron significativamente mayores cuando se alimentó con las microalgas frescas. Como en los casos anteriores, los incrementos de los organismos fueron entre el 40 y el 50 % superiores con *Chaetoceros* que con *Phaeodactylum*. Sin embargo, *Phaeodactylum* en forma congelada (que reporta incrementos de *M. galloprovincialis* de 38.0 y 37.31 % en peso seco total y orgánico del tejido respectivamente) resultó significativamente mejor que *Chaetoceros* preservada en la misma forma (con 25.1 y 21.54 % de incremento en los mismos parámetros). Las microalgas en forma seca y liofilizada reportaron bajos incrementos pero, como para las congeladas, *Phaeodactylum* proporcionó valores relativamente más altos (Tablas X y XI).

Por lo que se refiere a los aumentos promedio del peso de la concha, éstos variaron entre aproximadamente 150 y 200 mg por individuo, con la excepción de los organismos alimentados con *Chaetoceros* fresca (459.4 mg) (Tablas X y XI).

Los valores iniciales del índice de condición resultaron ser muy bajos (45.2 y 52.9 para los organismos alimentados con *Chaetoceros* y con *Phaeodactylum* respectivamente) y los valores finales confirman los resultados expuestos con anterioridad: las dietas secas y liofilizadas no causaron una recuperación de los organismos, que de hecho en ambos casos se calcularon valores del índice de condición ligeramente inferiores al inicial. Con las dietas congeladas, los índices resultaron un 8 y un 5% mayores de los iniciales, para *Chaetoceros*

Tabla X. Datos generales promedios (entre paréntesis los errores estándar) del crecimiento en peso seco total, peso seco orgánico del tejido y peso seco de la concha de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con microalgas frescas y preservadas.

Microalga	Peso Seco Total del tejido		Peso Seco Orgánico del tejido		Peso Seco de la concha	
	Incremento mg	%	Incremento mg	%	Incremento mg	%
<i>Chaetoceros</i>						
SECAS	4.96 (0.42)	6.2	0.02 (0.0)	0.04	242.2 (75.4)	28.31
LIOFILIZADAS	5.70 (0.53)	7.1	2.9 (0.2)	6.41	227.9 (74.0)	26.64
CONGELADAS	20.15 (1.45)	25.1	9.74 (0.7)	21.54	189.6 (68.8)	22.18
FRESCAS	83.90 (4.6)	104.6	65.29 (3.8)	144.40	459.4 (71.2)	53.71
<i>Phaeodactylum</i>						
SECAS	15.03 (1.05)	18.8	4.42 (0.3)	9.78	136.8 (55.4)	16.00
LIOFILIZADAS	14.85 (1.13)	18.5	5.76 (0.4)	12.74	164.5 (75.9)	19.23
CONGELADAS	30.49 (1.71)	38.0	16.87 (1.0)	37.31	250.8 (65.7)	29.32
FRESCAS	48.17 (2.60)	60.1	32.51 (2.1)	71.90	208.0 (65.1)	24.31

Tabla XI. Análisis de varianza de una vía (Kruskal Wallis) y comparaciones múltiples (método de Dunn) de los incrementos obtenidos en peso seco total, peso seco orgánico del tejido y peso seco de la concha de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con *Chaetoceros* y *Phaeodactylum* frescas y preservadas.

	RANGO PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS		
<b>PESO SECO TOTAL</b>				
<i>Chaetoceros</i>				
SECAS	90.629	*		
LIOFILIZADAS	95.469	*		
CONGELADAS	118.719		*	
FRESCAS	203.438			*
<i>Phaeodactylum</i>				
SECAS	110.823	*		
LIOFILIZADAS	109.879	*		
CONGELADAS	136.758		*	
FRESCAS	163.667			*
<b>PESO SECO ORGANICO</b>				
<i>Chaetoceros</i>				
SECAS	86.709	*		
LIOFILIZADAS	95.781	*		
CONGELADAS	115.250		*	
FRESCAS	220.094			*
<i>Phaeodactylum</i>				
SECAS	101.323	*		
LIOFILIZADAS	102.394	*		
CONGELADAS	137.091		*	
FRESCAS	170.455			*
<b>P. S. DE LA CONCHA</b>				
<i>Chaetoceros</i>				
SECAS	129.156	*		
LIOFILIZADAS	127.906	*		
CONGELADAS	122.781	*		
FRESCAS	169.547	*		
<i>Phaeodactylum</i>				
SECAS	112.677	*		
LIOFILIZADAS	114.727	*		
CONGELADAS	134.136	*		
FRESCAS	125.000	*		

y *Phaeodactylum* respectivamente. Una vez más, los mejores resultados fueron con las dietas frescas y nuevamente se pudo confirmar la superioridad de *Chaetoceros* sobre *Phaeodactylum* ya que a pesar del menor valor inicial del índice de condición, los datos finales resultaron significativamente superiores a todos los demás en el caso de *M. galloprovincialis* alimentado con *Chaetoceros* usada en forma fresca (Tabla XII).

Tabla XII. Índice de condición promedios (errores estándar en paréntesis) inicial y final de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con microalgas frescas y preservadas y resultado de las comparaciones múltiples (método de Dunn  $\alpha=0.05$ ) para el índice de condición final.

	Inicial	Final	Grupos homogéneos
<i>Chaetoceros</i>			
SECAS	45.21 (0.83)	42.90 (3.1)	a
LIOFILIZAS	45.21 (0.83)	44.42 (2.3)	a
CONGELADAS	45.21 (0.83)	53.20 (2.1)	c
FRESCAS	45.21 (0.83)	84.20 (2.3)	f
<i>Phaeodactylum</i>			
SECAS	52.86 (0.92)	50.03 (1.8)	b
LIOFILIZADAS	52.86 (0.92)	50.40 (2.1)	b
CONGELADAS	52.86 (0.92)	57.30 (2.0)	d
FRESCAS	52.86 (0.92)	76.50 (3.9)	e

#### III.4. Composición bioquímica de microalgas preservadas.

Los métodos de preservación por desecación (al aire y por liofilización) causan pérdidas importantes, sobre todo en la fracción lipídica. Esta pérdida, muy evidente en el material inmediatamente después de ambos procesos de secado, tiene como resultado un incremento de las concentraciones relativas de las demás fracciones orgánicas y, en parte por lo menos, del contenido de cenizas, que resulta ser más que el doble del presente en las microalgas frescas o preservadas por congelación (Anexo 2).

El almacenamiento produce cambios adicionales, evidentes sobre todo en la fracción proteínica. En el caso de la preservación y almacenamiento por congelación, los cambios producidos son menos importantes, sobre todo en el caso de *Chaetoceros*, mientras que para *Phaeodactylum* se notó un cambio relativamente mayor, más evidente para las proteínas que para las demás fracciones.

En cuanto a la composición bioquímica, los perfiles de aminoácidos y de ácidos grasos no se ven afectados por las varias técnicas de preservación utilizadas. El almacenamiento, por otro lado, resulta en un aumento de los porcentajes de insaturación de los ácidos grasos, que pudiera ser importante desde el punto de vista dietético, sobre todo por lo que se refiere a los ácidos grasos insaturados de cadena larga, 18:2 y 18:3.

Por otra parte, las pérdidas de cantidades relativamente importantes de las fracciones proteínica y lipídica tienen como consecuencia diferencias cuantitativas, aunque no cualitativas, sobre la disponibilidad de varios compuestos (aminoácidos y ácidos grasos) que pudieran ser dietéticamente importantes.

### III.5. Viabilidad de microalgas preservadas.

Las microalgas usadas como control (cultivos frescos concentrados por centrifugación a 2,000 r.p.m. y reinoculados en medio fresco) resultaron viables, indicando que este tratamiento no causa daños celulares que impidan o retarden los procesos de reproducción.

En cuanto a las microalgas preservadas con las diferentes técnicas, las pruebas preliminares de sobrevivencia resultaron todas negativas. Con las secadas al aire a baja temperatura, se observó que siete días después del inóculo la pigmentación decrecía y los cloroplastos habían perdido su forma normal.

En el caso de microalgas congeladas sin agentes protectores, las técnicas de congelación rápida, con nitrógeno líquido y lenta a  $-20^{\circ}\text{C}$ , también resultaron en la pérdida total de la viabilidad.

El uso de los crioprotectores en combinación con la técnica de congelación lenta y almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , daó los mejores resultados, aunque éstos también son solo parcialmente alentadores. Después de una semana de almacenamiento, la mayoría de las diluciones inferiores demostraron crecimiento, con una duración muy baja de la fase de inducción. Con la excepción de la concentración más baja (1%) de dimetil sulfóxido (DMS), la sobrevivencia resultó en todos los casos de entre el 99 y el 90% para *Chaetoceros* y ligeramente inferior para *Phaeodactylum* y los mejores resultados fueron los obtenidos con la concentración intermedia (5%) de glicerol y con DMS al 1%.

Con tiempos más largos de almacenamiento los resultados fueron erráticos: después de 15 días, los mejores resultados fueron con el criopreservante DMS y opuestos después de 30 días (mejor sobrevivencia en glicerol al 5 y 10% para *Chaetoceros*) (Tabla XIII). Para *Phaeodactylum* la sobrevivencia al almacenamiento por un período superior a una semana fue baja en todos los casos (Tabla XIV).

Tabla XIII. Sobrevivencia de *Chaetoceros* sp. congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  con diferentes porcentajes de crioprotector (Glicerol y Dimetil Sulfóxido) y a diferentes tiempos de preservación. <sup>2,3</sup> = días de duración de la fase de inducción; += crecimiento; -= no crecimiento.

GLICEROL												
%	7 DIAS				15 DIAS				30 DIAS			
	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$
1	+	+++ <sup>2</sup>	+++	---	-	---	---	---	-	---	---	---
5	+	+++ <sup>2</sup>	+++	---	-	---	---	---	+	+++ <sup>2</sup>	+++	---
10	+	+++ <sup>2</sup>	++-	+--	+	+--	---	---	+	+++ <sup>2</sup>	+--	---
DMS												
1	+	+++ <sup>2</sup>	---	---	+	+-- <sup>3</sup>	---	---	-	---	---	---
5	+	+++ <sup>2</sup>	++-	+--	+	+++ <sup>2</sup>	---	---	+	---	---	---
10	+	+++ <sup>2</sup>	+++	+--	+	+++ <sup>2</sup>	---	---	+	---	---	---

Tabla XIV. Sobrevivencia de *Phaeodactylum tricornutum* congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  con diferentes porcentajes de crioprotector (Glicerol y Dimetil Sulfóxido) y a diferentes tiempos de preservación. <sup>2,3,4,5</sup> = días de duración de la fase de inducción; += crecimiento; -= no crecimiento.

GLICEROL												
%	7 DIAS				15 DIAS				30 DIAS			
	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$
1	+	+--	---	---	+	+-- <sup>4</sup>	---	---	+	---	---	---
5	+	+++	+++	+++	-	---	---	---	+	---	---	---
10	+	+++	++-	+--	-	---	---	---	+	+++ <sup>2</sup>	---	---
DMS												
1	+	+++ <sup>2</sup>	+++	+++	+	---	---	---	+	---	---	---
5	+	+-- <sup>2</sup>	+--	---	-	---	---	---	+	---	---	---
10	+	+++ <sup>2</sup>	---	---	-	---	---	---	+	---	---	---

En el caso de las microalgas liofilizadas, a pesar del uso del criopreservador las sobrevivencias fueron constantemente bajas (Tablas XV y XVI). En este caso no se comprobó la viabilidad a los siete días de almacenamiento. Después de 15 y de 30 días, solamente se encontró sobrevivencia en algunas de las muestras con concentración de  $1 \times 10^7$ , demostrándose de esta forma una menor resistencia de ambas microalgas al proceso de liofilización. Esto probablemente se debe a la acción combinada del proceso de congelación, cuyos efectos negativos en términos de sobrevivencia ya se mencionaron y del secado al vacío que, por causar cambios iniciales tan importantes en la composición proximal de las microalgas preservadas con este proceso, pudiera ser considerado como perjudicial para los efectos de viabilidad de estos organismos.

Algunas de las discrepancias mencionadas pudieran de hecho ser debidas a la necesidad de centrifugar nuevamente algunos cultivos, a causa de la importante carga bacteriana notada en varias diluciones. Este tratamiento pudiera haber afectado la sobrevivencia de las microalgas así tratadas en el momento de inducción, cuando probablemente eran más sensibles a cualquier tipo de manipuleo. Por otro lado, los resultados indican claramente que hay una mayor resistencia de ambas microalgas al proceso de congelación, que de todas formas no resulta en porcentajes de sobrevivencia suficientes como para poder contemplar esta técnica como adecuada para los fines prácticos congruentes con actividades comerciales.

Los cultivos mantenidos en forma terminal no tuvieron, después del inicio de la fase estacionaria, un incremento importante de las formas de resistencia cuya formación se intentó inducir manteniendo cultivos estáticos durante dos a tres semanas. El porcentaje de las formas de resistencia, constantemente cerca del 10% del total de células, no ofrecería de hecho mejores garantías de sobrevivencia de las obtenidas con los cultivos semicontínuos. Esta línea de investigación fue por lo tanto abandonada, aunque pudiera ser susceptible de investigación adicional, para la preservación de cepas viables.

Tabla XV. Sobrevivencia de *Chaetoceros* sp. congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  y liofilizadas, con diferentes porcentajes de crioprotector (Glicerol y Dimetil Sulfóxido) y a diferentes tiempos de preservación; += crecimiento; -= no crecimiento.

GLICEROL								
%	15 DIAS				30 DIAS			
	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$
1	+	---	---	---	-	---	---	---
5	+	---	---	---	-	---	---	---
10	+	---	---	---	+	---	---	---
DMS								
1	+	---	---	---	-	---	---	---
5	+	---	---	---	+	---	---	---
10	+	---	---	---	-	---	---	---

Tabla XVI. Sobrevivencia de *Phaeodactylum tricornutum* congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  y liofilizadas, con diferentes porcentajes de crioprotector (Glicerol y Dimetil Sulfóxido) y a diferentes tiempos de preservación; += crecimiento; -= no crecimiento.

GLICEROL								
%	15 DIAS				30 DIAS			
	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$
1	+	---	---	---	+	---	---	---
5	+	---	---	---	+	---	---	---
10	-	---	---	---	-	---	---	---
DMS								
1	+	---	---	---	-	---	---	---
5	+	---	---	---	-	---	---	---
10	-	---	---	---	-	---	---	---

### III.6. Bioensayo de eficiencia de absorción de *Mytilus galloprovincialis*.

La cantidad del alimento proporcionado que no fue ingerido por *Mytilus galloprovincialis* resultó mayor con las microalgas preservadas en forma seca. En el caso de las congeladas, el porcentaje de la ración no ingerido resultó notablemente inferior, cercano a lo que se obtuvo con las raciones suministradas en forma fresca para *Chaetoceros*, e intermedio entre los valores obtenidos con microalgas frescas y los ya mencionados para las presentaciones en seco en el caso de *Phaeodactylum* (Tabla XVII).

Tabla XVII. Porcentaje de alimento no ingerido por *Mytilus galloprovincialis* alimentado con *Chaetoceros* y *Phaeodactylum* en forma fresca y con diferentes métodos de preservación.

	<i>Chaetoceros</i>	<i>Phaeodactylum</i>
FRESCAS	5.34	2.30
SECAS	15.30	14.55
LIOFILIZADAS	11.26	13.48
CONGELADAS	4.60	7.50

La fracción ingerida fue bien asimilada en todos los casos: utilizando la fórmula de Conover (1966), los resultados de este ensayo indican que *M. galloprovincialis* puede asimilar ambas microalgas con una eficiencia muy elevada, con valores promedio que varían entre el 84.7 y el 96% (Tabla XVIII).

El análisis exploratorio de Tukey y la prueba no paramétrica de comparaciones múltiples de Dunn (Fig. 6 y Tabla XIX) indican que existen algunas diferencias significativas entre microalgas y entre los métodos de preservación. En el caso de *Chaetoceros*, la dieta fresca y la secada al aire fueron asimiladas con una eficiencia mayor que las liofilizadas y congeladas, mientras que para *Phaeodactylum* ninguno de los métodos de preservación perjudicó la absorción de parte de *M. galloprovincialis*. De hecho, la dieta fresca de esta microalga fue asimilada con menor eficiencia.

Tabla XVIII. Promedios, errores estándar y límites de confianza de la eficiencia de absorción (método de Conover, 1966) de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con microalgas frescas y preservadas por diferentes métodos.

	PROMEDIO (%)	ERROR ESTANDAR	LIMITES DE CONFIANZA
<b><i>Chaetoceros</i></b>			
FRESCAS	95.48	0.50	94.89 - 96.07
SECAS	94.50	0.28	93.95 - 95.06
LIOFILIZADAS	87.14	0.33	86.56 - 87.71
CONGELADAS	84.70	0.12	84.13 - 85.27
<b><i>Phaeodactylum</i></b>			
FRESCAS	91.61	0.15	91.02 - 92.20
SECAS	96.01	0.19	95.44 - 96.58
LIOFILIZADAS	93.86	0.35	93.29 - 94.44
CONGELADAS	93.69	0.23	93.07 - 94.31

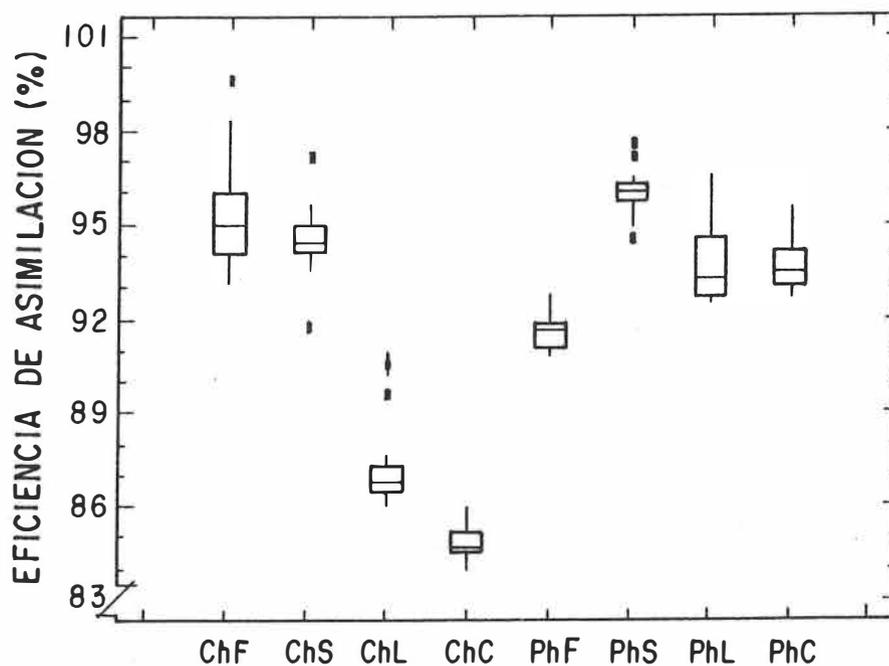


Figura 6. Eficiencia de absorción (%) de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con *Chaetoceros* sp. (Ch) y *Phaeodactylum tricornutum* (Ph) en diferentes formas de preservación. F, frescas; S, secas; L, liofilizadas; C, congeladas.

Tabla XIX. Análisis de varianza de una vía (Kruskal Wallis  $\alpha= 0.05$ ) y comparaciones múltiples (método de Dunn) de la eficiencia de absorción (método de Conover, 1966) de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con *Chaetoceros* y con *Phaeodactylum* en diferentes formas de preservación.

	RANGO PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
<i>Chaetoceros</i>		
FRESCAS	89.071	*
SECAS	81.600	*
LIOFILIZADAS	23.000	* *
CONGELADAS	8.000	*
<i>Phaeodactylum</i>		
FRESCAS	38.133	* *
SECAS	102.067	*
LIOFILIZADAS	67.600	* *
CONGELADAS	65.384	* *

Entre las microalgas frescas, *Chaetoceros* resultó significativamente superior a *Phaeodactylum*. Entre las dietas preservadas, *Chaetoceros* en forma seca fue asimilada con la misma eficiencia que las tres formas de presentación de *Phaeodactylum*, mientras que los valores más bajos de asimilación fueron los observados con *Chaetoceros* congelado y liofilizado.

La absorción de las diferentes fracciones orgánicas con ambas microalgas fue alta en todos los casos, con mínimos y máximos que varían aproximadamente entre 97 y casi 100% para las proteínas y valores aproximadamente iguales a éstos para los otros componentes orgánicos (Tablas XX y XXI).

Debido a la baja cantidad de heces producidas diariamente por los organismos, fue necesario combinar todas las colectas diarias para poder llevar a cabo los análisis químicos, por lo cual no fue posible analizar los resultados estadísticamente. Por otro lado, la falta de discrepancias entre los datos obtenidos para cada dieta y cada tipo de compuestos parece evidencia suficiente de que no hubo diferencias en la digestibilidad de las varias fracciones orgánicas, como consecuencia del método de preservación.

La absorción de la materia inorgánica del alimento por *M. galloprovincialis* fue alta (del 92.34 al 99.57%) y no se observaron tendencias dependiendo del tipo de preservación. La fracción inorgánica de *Phaeodactylum* fue aparentemente absorbida con una eficiencia ligeramente mayor (Tabla XXII).

La energía ingerida, perdida como heces y asimilada por *Mytilus galloprovincialis* cuando se alimentó con *Chaetoceros* y *Phaeodactylum* en forma fresca y preservada se dan en la tabla XXIII y se expresan en base a la cantidad total de alimento orgánico ingerida cada día.

La energía asimilada fue más alta con *Phaeodactylum* en forma fresca (3755.28 J), seguida por *Chaetoceros* también en forma fresca (2610.96 J); con las diferentes formas de preservación de las microalgas, la energía asimilada fue menos del 50% que con las microalgas frescas y el valor más bajo fue el obtenido con *Phaeodactylum* liofilizada (987.91 J).

Tabla XX. Porcentaje de proteínas, carbohidratos y lípidos ingeridos, desechados (en heces) y asimilados por *Mytilus galloprovincialis* durante su alimentación por cinco días cada vez con la microalga *Chaetoceros* sp. en forma fresca y preservada.

<i>Chaetoceros</i> FRESCAS				
COMPONENTE	INGERIDO	HECES	ASIMILADO	% ASIMILADO
SUST. ORGANICA	100.00	1.226	98.77	98.77
PROTEINAS	59.53	0.719	58.81	98.79
CARBOHIDRATOS	19.13	0.170	18.96	99.11
LIPIDOS	21.33	0.337	20.99	98.41
<i>Chaetoceros</i> SECAS				
COMPONENTE	INGERIDO	HECES	ASIMILADO	% ASIMILADO
SUST. ORGANICA	100.00	1.703	98.30	98.30
PROTEINAS	53.37	0.935	52.43	98.24
CARBOHIDRATOS	12.28	0.185	12.09	98.45
LIPIDOS	34.35	0.582	33.77	98.31
<i>Chaetoceros</i> LIOFILIZADAS				
COMPONENTE	INGERIDO	HECES	ASIMILADO	% ASIMILADO
SUST. ORGANICA	100.00	2.539	97.46	97.46
PROTEINAS	55.86	1.519	54.34	97.28
CARBOHIDRATOS	14.90	0.353	14.55	97.65
LIPIDOS	29.23	0.667	28.56	97.71
<i>Chaetoceros</i> CONGELADAS				
COMPONENTE	INGERIDO	HECES	ASIMILADO	% ASIMILADO
SUST. ORGANICA	100.00	2.001	98.00	98.00
PROTEINAS	56.86	1.202	55.66	97.89
CARBOHIDRATOS	20.54	0.296	20.24	98.54
LIPIDOS	22.59	0.502	22.09	97.79

Tabla XXI. Porcentaje de proteínas, carbohidratos y lípidos ingeridos, desechados (en heces) y asimilados por *Mytilus galloprovincialis* durante su alimentación por cinco días cada vez con la microalga *Phaeodactylum tricornutum* en forma fresca y preservada.

<i>Phaeodactylum</i> FRESCAS				
COMPONENTE	INGERIDO	HECES	ASIMILADO	% ASIMILADO
SUST. ORGANICA	100.00	0.225	99.77	99.77
PROTEINAS	48.42	0.112	48.31	99.75
CARBOHIDRATOS	17.04	0.031	17.01	99.82
LIPIDOS	35.53	0.081	35.45	99.78
<i>Phaeodactylum</i> SECAS				
COMPONENTE	INGERIDO	HECES	ASIMILADO	% ASIMILADO
SUST. ORGANICA	100.00	1.062	98.94	98.94
PROTEINAS	50.34	0.524	49.82	98.97
CARBOHIDRATOS	15.17	0.160	15.01	98.94
LIPIDOS	34.48	0.379	34.10	98.90
<i>Phaeodactylum</i> LIOFILIZADAS				
COMPONENTE	INGERIDO	HECES	ASIMILADO	% ASIMILADO
SUST. ORGANICA	100.00	1.99	98.01	98.01
PROTEINAS	55.23	1.12	54.11	97.97
CARBOHIDRATOS	12.66	0.37	12.29	97.07
LIPIDOS	31.30	0.50	30.80	98.40
<i>Phaeodactylum</i> CONGELADAS				
COMPONENTE	INGERIDO	HECES	ASIMILADO	% ASIMILADO
SUST. ORGANICA	100.00	1.958	98.04	98.04
PROTEINAS	42.27	1.105	41.16	97.37
CARBOHIDRATOS	20.05	0.338	19.71	98.30
LIPIDOS	37.62	0.514	37.11	98.63

Tabla XXII. Porcentajes de absorción de material inorgánico por *Mytilus galloprovincialis* alimentado con las microalgas *Chaetoceros* y *Phaeodactylum* en forma fresca y preservada.

	HECES	ASIMILADO
<b><i>Chaetoceros</i></b>		
FRESCAS	7.66	92.34
SECAS	2.94	97.06
LIOFILIZADAS	4.04	95.95
CONGELADAS	3.20	96.80
<b><i>Phaeodactylum</i></b>		
FRESCAS	0.431	99.57
SECAS	1.826	98.17
LIOFILIZADAS	2.96	97.04
CONGELADAS	2.89	97.11

Tabla XXIII. Energía (en Joules/día) ingerida, perdida (como heces) y asimilada por *Mytilus galloprovincialis* alimentado con *Chaetoceros* y *Phaeodactylum* en forma fresca y preservada.

	INGERIDA	HECES	ASIMILADA
<b><i>Chaetoceros</i></b>			
FRESCAS	2644.80	34.08	2610.96
SECAS	1251.31	21.40	1229.97
LIOFILIZADAS	1118.29	27.96	1090.34
CONGELADAS	1755.92	36.20	1719.90
<b><i>Phaeodactylum</i></b>			
FRESCAS	3763.77	8.59	3755.28
SECAS	1186.77	12.70	1174.12
LIOFILIZADAS	1006.90	18.99	987.91
CONGELADAS	1431.66	26.38	1405.32

La energía perdida en heces fue mínima, aunque se observan valores relativamente mayores con *Chaetoceros*. A pesar de que con *Phaeodactylum* en forma fresca la energía ingerida fue la más alta (3763.77 J), la energía perdida en heces fue la más baja (8.59 J).

Al final del ensayo, los organismos alimentados en forma consecutiva con la misma microalga preservada con las tres técnicas, se midieron y los incrementos en el eje de crecimiento máximo se dan en la tabla XXIV. En promedio resultó mejor *Phaeodactylum*, con el cual se obtuvo un porcentaje de incremento mayor (1.41%) que con *Chaetoceros* (1.02%).

La composición proximal del tejido de *M. galloprovincialis* al final del ensayo se muestra en las tablas XXV y XXVI. Los porcentajes de proteínas fueron ligeramente más altos con *Chaetoceros* en forma fresca (60.5) que preservada. Con *Phaeodactylum* el contenido de proteínas fue algo inferior, entre 55.4 y 56.7 para preservadas y frescas respectivamente.

Los porcentajes de carbohidratos de los mejillones fueron relativamente más altos con *Phaeodactylum* en forma preservada (26.8) que con las frescas, mientras que con *Chaetoceros* los porcentajes fueron mayores con la dieta fresca (25.0), comparado con 23.18% para las preservadas.

En el caso de los lípidos, los valores más altos fueron los encontrados con *Chaetoceros* preservada (18.30%) y el más bajo fue con la misma microalga suministrada en forma fresca (14.50%). En *Phaeodactylum* aparentemente no hubo diferencias: con las frescas el porcentaje fue de 17.53 y para las preservadas se obtuvo 17.85%.

En la tabla XXVII se observan la composición y el porcentaje de los ácidos grasos de *M. galloprovincialis* alimentado con las diferentes dietas. Los más abundantes fueron el ácido palmitoléico (16:1), el ácido palmítico (16:0), el ácido 22:0 y el ácido mirístico (14:0); se observan algunas diferencias entre las dietas: en el caso del ácido palmitoléico, los mayores porcentajes corresponden a *Chaetoceros* y *Phaeodactylum* en forma fresca (30.9 y 25.3% respectivamente) y los menores para las microalgas preservadas (27.0 para *Chaetoceros* y 21.8% para *Phaeodactylum*).

Tabla XXIV. Promedio inicial y final del Alto (E.C.M.) de *Mytilus galloprovincialis* (entre paréntesis errores estándar) y el incremento en mm y en % después de 21 días de alimentación con la alternancia de microalgas preservadas (secas, liofilizadas y congeladas).

DIETA	REPETICIONES	E.C.M.		INCREMENTOS	
		INICIAL mm	FINAL mm	mm	%
<i>Chaetoceros</i> sp.	1	31.30 (0.20)	31.62 (0.26)	0.31	1.00
	2	30.98 (0.17)	31.10 (0.18)	0.12	0.38
	3	30.69 (0.16)	31.20 (0.17)	0.51	1.63
	x	30.99 (0.10)	31.31 (0.14)	0.32	1.02
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1	30.69 (0.16)	31.14 (0.18)	0.45	1.44
	2	30.83 (0.15)	31.20 (0.19)	0.37	1.18
	3	31.00 (0.14)	31.52 (0.20)	0.52	1.65
	x	30.85 (0.09)	31.29 (0.11)	0.44	1.41

Tabla XXV. Composición proximal promedio (entre paréntesis errores estándar) de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con *Chaetoceros* sp. y *Phaeodactylum tricornutum* frescas (F) y preservadas (P). Datos calculados en base al peso seco total de la muestra.

COMPONENTE	<i>Chaetoceros</i> sp.		<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	
	F	P	F	P
PROTEINAS	38.58 (0.05)	35.18 (0.38)	33.00 (0.25)	31.00 (0.20)
CARBOHIDRATOS	15.93 (0.28)	13.94 (0.49)	15.00 (0.52)	15.00 (0.50)
LIPIDOS	9.25 (0.26)	11.00 (0.28)	10.21 (0.28)	10.00 (0.31)
CENIZAS	31.00 (0.24)	28.00 (0.22)	30.00 (0.24)	28.00 (0.23)
TOTAL	94.76	88.12	88.21	84.00

Tabla XXVI. Composición proximal de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con *Chaetoceros* sp. y *Phaeodactylum tricornutum* frescas (F) y preservadas (P). Datos expresados como porcentajes del total de la fracción orgánica.

COMPONENTE	<i>Chaetoceros</i> sp.		<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	
	F	P	F	P
PROTEINAS	60.50	58.52	56.69	55.35
CARBOHIDRATOS	25.00	23.18	25.76	26.78
LIPIDOS	14.50	18.30	17.53	17.85
TOTAL	100.00	99.99	99.98	99.98

Tabla XXVII. Composición y porcentajes de ácidos grasos mayores en *Mytilus galloprovincialis* alimentado con las microalgas *Chaetoceros* sp. y *Phaeodactylum tricornutum* en forma fresca (F) y preservada (P). Las concentraciones están dadas en base al porcentaje del total de ácidos grasos.

Acido graso	<i>Chaetoceros</i>		<i>Phaeodactylum</i>	
	F	P	F	P
14:0	12.4	12.0	8.4	9.6
16:0	23.7	27.0	26.0	29.6
16:1	30.9	27.0	25.3	21.8
18:0	3.0	4.2	3.5	4.8
18:1	9.7	9.3	10.0	10.3
18:2	3.6	3.4	3.7	4.0
18:3	1.1	1.5	1.3	2.0
20:0	0.1	0.1	0.1	0.1
22:0	15.6	15.6	21.8	17.9
22:1	0.1	0.1	0.1	0.1
24:0	0.1	0.1	0.1	0.1
Saturados	39.1	43.2	37.8	43.9
Monoinsaturados	56.2	52.0	57.2	50.1
Poliinsaturados	4.7	4.8	5.0	6.0

Una tendencia contraria se observó con el ácido palmítico, para el cual los mayores porcentajes se obtuvieron cuando se alimentó con las microalgas preservadas (27.0 y 29.6% para *Chaetoceros* y *Phaeodactylum* respectivamente). En el caso del ácido mirístico no se observa diferencia entre *Chaetoceros* en forma fresca y preservada. Con *Phaeodactylum* el porcentaje es ligeramente mayor en los mejillones alimentados con microalgas preservadas (9.6%) que con las frescas (8.4%).

En general, los porcentajes de los ácidos grasos saturados fueron mayores en los organismos alimentados con las microalgas preservadas: 43.2 y 43.9% para *Chaetoceros* y *Phaeodactylum* respectivamente, comparado con 39.1 y 37.8 con las microalgas frescas. Para los ácidos grasos monoinsaturados las dietas frescas resultaron en porcentajes relativamente más altos (56.2 y 57.2% en *Chaetoceros* y *Phaeodactylum* respectivamente). Los poliinsaturados fueron bajos: de 4.7 a 4.8% con *Chaetoceros* fresca y preservada y de 5.0 a 6.0% para *Phaeodactylum*.

## IV. DISCUSION

### IV.1. Bioensayo de alimentación de *Mytilus galloprovincialis* con microalgas frescas.

La tasa de crecimiento medida directamente en condiciones controladas es quizá la medición biológica más relevante de la actividad y eficiencia de alimentación de un consumidor y ha sido usada para calcular la calidad alimenticia de diferentes dietas para una variedad de organismos marinos (Palmer, 1983).

El valor dietético de los artículos alimenticios es por otro lado difícil de calcular a partir de sus características intrínsecas, porque pueden variar el tiempo necesario para que sean consumidos y asimilados y la cantidad de energía utilizable en forma efectiva. En consecuencia, mediciones del valor alimenticio de un artículo dietético basadas en consideraciones acerca de su tamaño, de su contenido calórico o en varias otras que se han usado con esta finalidad pueden no reflejar su valor para los consumidores (Brown *et al.*, 1989).

No existen muchos ejemplos en literatura concernientes a la evaluación de estrategias de alimentación de organismos cultivados. Langton y Mckay (1976) obtuvieron altas tasas de crecimiento de juveniles de *Crassostrea gigas* alimentados en forma discontinua con una mezcla de diferentes microalgas, que atribuyen a la alta cantidad de alimento ingerido y también a una mejor eficiencia de asimilación, aunque mencionan que es difícil identificar a un solo factor como el responsable del incremento en crecimiento. Concluyen que las condiciones óptimas para el crecimiento son determinadas no sólo por la densidad de los organismos y la cantidad total de alimento disponible, sino que también dependen de la forma

en que el alimento es presentado.

En esta investigación, no hubo diferencias que pudieran atribuirse al régimen de alimentación probablemente porque, al dividir la ración diaria en dos alícuotas, las concentraciones celulares iniciales se mantuvieron dentro de los valores óptimos para su asimilación. Para muchos moluscos la asimilación depende de la concentración de partículas y tiende a ser inferior con altas densidades de alimento (Widdows y Bayne, 1971; Widdows, 1978). Sin embargo, para algunas especies, las actividades de alimentación y de asimilación son independientes de la disponibilidad del alimento, por lo menos mientras ésta permanece dentro de un intervalo de valores óptimos, cuya amplitud depende de las especies y de las condiciones del ambiente (Rico-Mora, 1987; Del Río-Portilla *et al.*, 1992).

Observaciones de laboratorio (Winter y Langton, 1975) y de campo (Pieters *et al.*, 1980) sugieren que el tamaño de la ración de alimento es el factor más importante en determinar la tasa de crecimiento en mitflidos, por lo cual es necesario encontrar la concentración adecuada de alimento para cada organismo.

Winter y Langton (1975) demostraron que para *Mytilus edulis* el crecimiento (medido como un incremento en el peso seco de la carne) es una función directa de la cantidad de alimento ingerido hasta un nivel óptimo; cuando este óptimo es excedido hay un rápido decremento en la cantidad de alimento asimilado (Thompson y Bayne, 1974). Además, cuando la densidad es demasiado alta, el alimento no es ingerido sino que los organismos eliminan el exceso de partículas a través de la producción de pseudoheces.

Foster-Smith (1975a) encontró una reducción en la tasa de filtración de *Cerastoderma edule* y *Venerupis pullastra* cuando organismos de estas especies se alimentaron a

concentraciones mayores de  $200 \times 10^3$  cel.  $\text{ml}^{-1}$  hasta que a concentraciones de aproximadamente  $800-850 \times 10^3$  cel.  $\text{ml}^{-1}$  la reducción de esta tasa fue cerca del 90%. Para *Mytilus edulis* la tasa de ingestión fue mayor a una concentración de entre  $500-700 \times 10^3$  cel.  $\text{ml}^{-1}$ , lo cual indica que esta especie es más eficiente que las anteriores con altas concentraciones de partículas en suspensión (Thompson y Bayne, 1972).

En esta investigación, cuando se alimentó con una concentración equivalente al 8% del peso seco del mejillón (correspondiente a  $950 \times 10^3$  cel.  $\text{ml}^{-1}$ ) hubo producción de pseudoheces, lo cual indica que con esta concentración se alcanza el punto de saciedad de los organismos, pero cuando se alimentó con el 6% ( $700 \times 10^3$  cel.  $\text{ml}^{-1}$ ) no se notó la presencia de pseudoheces, lo cual indica que la concentración óptima de alimento para esta especie es cercana a este valor.

Es probable, como ha sido demostrado con otros moluscos (Tenore y Dunstan, 1973; Foster-Smith, 1975b; Smaal, 1991), que *Mytilus galloprovincialis* se pueda alimentar con el 50% más de microalgas, de lo que resulta en la producción de pseudoheces cuando las microalgas se suministran en una única ración. Aunque en este trabajo no se intentó tomar ventaja del hecho que *Mytilus galloprovincialis*, y *Mytilus edulis*, se alimentan continuamente (Riisgard y Mohlenberg, 1979), creemos que sería posible alimentarlo con raciones mayores suministradas en forma continua. Esto pudiera resultar en un crecimiento aún mejor, aunque *Modiolus capax* en esta forma de alimentación no resultó en un mayor crecimiento (Cordero-Esquivel y Voltolina, 1994).

Concerniente a la calidad intrínseca del alimento, *Tetraselmis* e *Isochrysis* son ligeramente más ricos en proteínas, los lípidos son más bajos en *Tetraselmis* e *Isochrysis* tiene el menor contenido de cenizas. Aunque las diferencias no son grandes, los resultados

demuestran que *Chaetoceros* fue la mejor fuente de alimento a pesar de tener el contenido de cenizas más alto. *Isochrysis* es considerada de excelente valor nutritivo para muchos filtroalimentadores (Ewart y Epifanio, 1981; Sukenik y Wahnon, 1991), pero frecuentemente su cultivo a gran escala tiene algunos problemas técnicos (Coeroli *et al.*, 1984). En este caso, su uso no ofrece ninguna ventaja sobre *Phaeodactylum* y fue en efecto menos exitoso que *Chaetoceros* sp., ambos con menos demandas y más fáciles de mantener en cultivo. *Phaeodactylum*, que en general no es considerado como una buena fuente de alimento (Davis y Guillard, 1958; Epifanio *et al.*, 1981), ha sido usada satisfactoriamente para el crecimiento de larvas de ostiones (Wilson, 1978) y para alimentar juveniles de algunos bivalvos (Foster-Smith, 1975b), lo cual coincide con estos resultados.

El caso de *Tetraselmis* debe ser considerado en forma especial. En teoría, esta especie es de alta calidad, ya que la razón contenido de proteínas/volumen celular es alta comparada al de muchas otras especies usadas en acuicultura. Sin embargo, su valor como alimento es bajo, posiblemente por la presencia de una pared celular rígida, lo cual podría hacer difícil su digestión (Brown *et al.* 1989; Laing *et al.*, 1990). Esto ha sido recientemente demostrado también con el mitílido *Modiolus capax* por Rico-Mora (1987), quien obtuvo con una cepa semejante eficiencias de asimilación cercanas al 50%, que confirma nuestros resultados.

Otra consideración es el hecho que, aunque varias especies del género *Tetraselmis* tienen altos niveles de carbohidratos (Romberger y Epifanio, 1981), se ha demostrado que no contienen el ácido graso 22:6w3 (Langdon y Waldock, 1981), cuya ausencia en la dieta ha sido mencionada como un factor limitante para el crecimiento de juveniles de *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis* y *Crassostrea virginica* (Epifanio, 1979; Enright, *et al.* 1986a y 1986b).

En relación a la razón de conversión del alimento, los valores más bajos, que indican

una mejor transformación del alimento en tejidos, se obtuvieron con *Chaetoceros* y *Phaeodactylum*. Según Calow (1977), la eficiencia de conversión es independiente de la cantidad de alimento y depende de su calidad, que es determinada por las proporciones de los componentes bioquímicos. *Chaetoceros* y *Phaeodactylum* contienen más carbohidratos y lípidos que *Isochrysis* y *Tetraselmis*, lo cual puede explicar su éxito como alimentos e indicaría que estas fracciones son dietéticamente importantes para *Mytilus galloprovincialis* ya que, cuando la composición de la dieta es compatible con los requerimientos del organismo, la energía utilizada en su conversión es menor (Scott, 1980).

#### **IV.2. Bioensayo de alimentación de *Mytilus galloprovincialis* con microalgas preservadas.**

Se han reportado resultados diferentes sobre el efecto que tienen las microalgas preservadas como alimento de organismos filtradores. Esto puede deberse en parte a los métodos de procesamiento, los cuales determinan el tamaño de las partículas, la integridad de la pared celular y la estabilidad de los nutrientes.

Cuando los mejillones se alimentaron con microalgas preservadas los resultados no fueron relevantes, en comparación con su contraparte en forma fresca. Esto parece ser que se debe, por lo menos en parte, a que cuando se utilizan dietas inertes éstas tienden a aglutinarse, lo cual dificulta su permanencia en suspensión (Masson, 1977; Coutteau y Sorgeloos, 1992). En este ensayo, a pesar de haber homogeneizado las microalgas por un tiempo razonable (cuatro horas), éstas tendieron a precipitarse al fondo de los acuarios, lo cual las hacía inaccesibles a los organismos, a pesar del suplemento de aireación que se utilizó para mantener en suspensión al menos gran parte de ellas.

Otro punto que hay que tener en cuenta es la integridad física de los alimentos no vivos, una vez que hayan sido suspendidos en agua. Como se mencionó anteriormente, muchos alimentos artificiales no retienen los nutrientes solubles ni aún por el período necesarios para ser filtrados por los organismos que se alimentan de ellos (Goldblatt *et al.*, 1980). Este problema puede ser frecuentemente resuelto implementando un programa de alimentación múltiple, con pequeñas cantidades en el transcurso del día en vez de una o dos raciones en un día (Biedenbach *et al.*, 1990).

Curatolo *et al.* (1993) reportan que reemplazos del 100 hasta el 40% de microalgas vivas con microalgas secas (*Tetraselmis suecica* secada con calor) no produjeron resultados satisfactorios sobre el crecimiento de larvas de *Tapes philippinarum* y mencionan que, aparte de la depositación del producto seco, la contaminación bacteriana, resultó en elevadas mortalidades y tasas de crecimiento negativas.

Aunque los incrementos en peso fueron bajos, los resultados que se obtuvieron con *Mytilus galloprovincialis* indican que es posible utilizar las microalgas preservadas en sustitución o como complemento del alimento vivo, ya que al menos no se obtuvieron mortalidades en ninguno de los casos donde se usaron. Además los índices de condición no cambiaron en forma significativa, indicando que las raciones de microalgas preservadas fueron por lo menos suficientes para cubrir las necesidades metabólicas de los organismos.

Una de las posibles maneras de mejorar la calidad de las microalgas preservadas como alimento para organismos filtradores pudiera ser su enriquecimiento, aumentando el contenido de proteínas y lípidos. También se podría usar una mayor cantidad de microalgas secas y liofilizadas, posiblemente proporcionada en pequeñas raciones o en forma continua, ya que mucho alimento es perdido por precipitación al fondo de los acuarios. La inclusión

de bajos suplementos de microalgas frescas o de otras especies de microalgas preservadas de composición bioquímica diferente, o quizás una mezcla de las usadas en este trabajo, pudieran ser otros métodos para reducir la dependencia total de las microalgas frescas en los regímenes de alimentación de los organismos filtradores (Biedenbach *et al.*, 1990).

Además, la ganancia relativamente importante en peso seco de la concha, que fue aproximadamente el 50% de la que se obtuvo con la dieta fresca de *Chaetoceros* y cerca del 100% en el caso de *Phaeodactylum*, indica que las dietas preservadas fueron por lo menos parcialmente efectivas, ya que se ha demostrado que el crecimiento en concha es prioritario sobre el del tejido para varios bivalvos. Langton *et al.* (1977), en sus ensayos con *Tapes japonica*, demostraron que existe una correlación entre la ganancia en peso de la concha y la cantidad de alimento ingerido y observaron que un 89 % de la ganancia total en peso es debida a crecimiento de la concha. Además, experimentos con *Thais lamellosa* han demostrado que la tasa de producción de concha puede limitar la tasa máxima de crecimiento del cuerpo. Esta es aparentemente una estrategia defensiva, ya que un rápido crecimiento del cuerpo podría resultar en conchas más delgadas e incrementar la probabilidad de depredación (Palmer, 1983).

La ganancia en peso de la concha de *Mytilus galloprovincialis* parece alta en relación a la cantidad del alimento ingerido. Esto pudiera ser explicado por la tasa relativamente alta de renovación del agua de mar en los acuarios experimentales. Langton *et al.* (1977) asumen que sólo un pequeño porcentaje del peso seco del alimento ingerido hace la matriz orgánica de la concha y que la fuente principal de la parte inorgánica es el material inorgánico disuelto, que puede ser filtrado por los organismos del agua circundante y transformado en la parte inorgánica de la concha misma. Este proceso requiere evidentemente de energía, ya que la absorción y la precipitación de los iones inorgánicos involucrados es un proceso activo.

Además, tales iones deben de ser transportados y fijados a la matriz orgánica de la concha, lo cual requiere de la activación de rutas metabólicas y de enzimas específicas (Wilbur, 1964; Sick y Sigfried, 1982).

#### **IV.3. Viabilidad y composición de las microalgas preservadas.**

Existen muchas controversias acerca de las técnicas de preservación en estado viable de microalgas.

Por lo que se refiere a la tasa de congelación, hay aparentemente un consenso general que, contrariamente a lo que se encuentra en literatura acerca de la preservación de células bacterianas, la técnica de congelado lento es superior a la rápida en el caso de las microalgas. Holm-Hansen (1963) investigó este aspecto con diferentes algas verdes y azul-verdes y encontró que en general la viabilidad, inclusive después de una serie de procesos de descongelación y congelación sucesivos, fue mayor cuando usaba una tasa de congelación lenta. Igualmente, en tiempos más recientes, Lepesteur *et al.* (1993) ensayaron diez métodos de preservación con fitoplancton marino y encontraron una pérdida significativamente mayor de células viables con la congelación rápida que con la lenta.

Varios autores sugieren también que el uso de agentes protectores, aunque diferentes de los que se usan en bacteriología, favorece la conservación de la viabilidad de las microalgas. Entre éstos se encuentra Tsuru (1973), quien reporta una mayor viabilidad de algas verdes con adición de estos agentes, aunque esto no fue el caso con algas azul-verdes. El mismo tipo de resultados fue logrado por Buitrago (1988) con microalgas de origen marino.

Nuestros resultados confirman que el uso de crioprotectores en combinación con una

tasa de congelación lenta es superior a las otras técnicas que se probaron durante este trabajo. Los bajos resultados de sobrevivencia a largo plazo pueden ser debidos a la proliferación de bacterias, que se observó sobre todo cuando se utilizó como crioprotector el glicerol, que por otra parte puede ser un buen sustrato de crecimiento para varias bacterias (Bianchi, 1976). Este fenómeno de contaminación bacteriana fue menos evidente con dimetil sulfóxido (DMS), aunque los resultados finales no sugieren que éste tenga una mayor actividad de protección para las células.

A pesar de los resultados obtenidos a la fecha, la investigación de la adición de crioprotectores necesita estudios adicionales ya que estos agentes parecen afectar a las microalgas en diversas maneras (Morris, 1976a). Los datos obtenidos en el presente trabajo coinciden en general con la literatura, relativo a la dificultad que existe en preservar microalgas en estado viable. En consecuencia estas técnicas son poco viables si se tratara de utilizarlas para la producción comercial de inóculos masivos, por lo menos hasta que se logre obtener un alto porcentaje de células competentes que se reproduzcan a corto plazo y ésto sea congruente con fines prácticos.

Por otro lado, parece conveniente señalar la importancia que tiene este tipo de estudios para otras finalidades. Primeramente, esta técnica sería útil para mantener líneas celulares viables por tiempos largos, ya que favorecería la preservación de sus características intrínsecas, que pueden alterarse más fácilmente con los métodos clásicos de mantenimiento en medios líquidos o sólidos.

Queda mucho por explicar acerca de los diferentes efectos que producen diferentes técnicas, que parecen en gran parte ser típicos de la especie y hasta de su origen marino o dulceacuícola. También, es importante resaltar que las técnicas de preservación por secado

(al aire o en vacío, después de la congelación) causan pérdidas inmediatas de metabolitos y que éstas aumentan con el tiempo de almacenamiento. Estas pérdidas, también se notaron en menor grado en el caso de las algas congeladas y solamente después de un período relativamente largo en el congelador (Anexo 2).

La pérdida de estos compuestos, durante los procesos de preservación y de resuspensión en agua, causada por una mayor permeabilidad de las membranas, afectadas por la desecación y congelación (Greiff, 1960) y quizás de origen metabólico por lo que se refiere a los cambios notados después del almacenaje, es el motivo principal de la pérdida de viabilidad.

#### **IV.4. Bioensayo de eficiencia de absorción de *Mytilus galloprovincialis*.**

Las eficiencias de absorción de *Mytilus galloprovincialis* obtenidas durante este trabajo fueron altas en relación a las registradas para otras especies de bivalvos para las cuales, en la mayoría de los casos, los máximos valores de eficiencia mencionados varían entre el 70 y el 80% con raciones de menos de 1 mg l<sup>-1</sup> y aún menores, entre el 20 y el 50%, con raciones más altas (7 mg l<sup>-1</sup>) (Griffiths y Griffiths, 1987).

En esta investigación, al igual que la amplia gama de valores reportados en la literatura, son difíciles de interpretar debido a la extensa variedad de alimentos utilizados, de sus concentraciones y de las diferentes situaciones y diseños experimentales usados en los diferentes trabajos (Widdows, 1978; Navarro y Winter, 1982; Sprung, 1984; Navarro *et al.*, 1991; van Erkom-Schurink y Griffiths, 1992; Beiras *et al.*, 1993). Kreeger (1993) menciona además que la eficiencia de asimilación de los bivalvos puede estar influenciada por muchos factores fisiológicos, incluyendo la actividad enzimática digestiva, el tiempo de residencia en el estómago y la sincronía digestiva, lo cual explicaría en gran medida la gran variación de datos encontrados en la literatura.

Así como se han demostrado variaciones entre estrategias alimenticias, que varían entre las mencionadas en la introducción acerca de filtradores continuos y discontinuos, hasta las diferentes reacciones a la concentración de alimento proporcionado (Urban *et al.*, 1983), también existen diferencias inter- e intraespecíficas muy marcadas acerca de las estrategias de la eficiencia con la cual el organismo utiliza su alimento. Hawkins y Bayne (1991) mencionan que factores biológicos de diferente naturaleza, incluyendo el genotipo, el tamaño, y los estados fisiológico y nutricional de los organismos tienen influencia sobre la eficiencia con la cual la ración absorbida es utilizada para el metabolismo de mantenimiento.

Muchos autores han mencionado que la eficiencia de absorción está más estrechamente relacionada con la cantidad y a la calidad del alimento, que con otras características específicas de las microalgas consumidas. En los años pasados aparecieron dos escuelas de pensamiento acerca de los efectos de la calidad del alimento sobre la tasa de ingestión. Un grupo reporta que las tasas de ingestión varían inversamente con la calidad del alimento (Calow, 1975a; Streit, 1978; Cammen, 1980), lo cual podría actuar como un mecanismo para mantener constantes las tasas de entrada de algunos componentes alimenticios (Calow, 1975b). Contrariamente, otros encuentran que las tasas de ingestión se relacionan positivamente con la calidad del alimento (Frankenberg y Smith, 1967; Hylleberg, 1975).

Taghon (1981) presenta un modelo estudiado específicamente para micrófagos, en el cual predice las tasas óptimas de ingestión del organismo como una función de la calidad nutricional de los alimentos. La predicción básica del modelo es que existe una tasa de ingestión óptima para una calidad determinada de alimento y que esta tasa de ingestión aumenta cuando mejora la calidad del alimento. El modelo asume que los costos de alimentación son los mismos para todos los tipos de alimentos ya que, según este autor, a una tasa de ingestión determinada el gasto necesario para alimentarse con un alimento de

alta calidad es el mismo que con uno de baja calidad.

Comparando los resultados de eficiencia de absorción de *Mytilus galloprovincialis*, se observa una discrepancia entre los calculados con el índice de Conover (1966) o directamente con los datos que se obtuvieron midiendo la concentración de sustancia orgánica y de sus diferentes fracciones presentes en las heces y comparándola con la totalidad de la sustancia orgánica ingerida.

La discrepancia se explica por el hecho que la sustancia inorgánica presente en las dietas utilizadas en este trabajo fue absorbida casi totalmente (desde el 92 hasta el 99.6%). Esto contradice lo que postula Conover, que solo el componente orgánico del alimento es significativamente afectado por los procesos digestivos e indica que esta fracción es igualmente importante para *Mytilus galloprovincialis* como la sustancia orgánica, ya que los bivalvos pueden utilizar una parte por lo menos del material inorgánico ingerido para producción de la concha (Berry y Schleyer, 1983). La asimilación de buena parte de las sustancias inorgánicas presentes en el alimento ha sido también demostrada en el caso de otros organismos, particularmente en crustáceos (Prus, 1971; Newman *et al.*, 1982) y Navarro (1983) menciona que el bivalvo *Chlamys islandica* no tiene la capacidad de seleccionar la fracción orgánica del alimento en preferencia de la fracción inorgánica.

La eficiencia con la cual las microalgas preservadas fueron utilizadas fue similar que con las microalgas frescas y hasta mayor que ésta, como fue el caso de *Phaeodactylum tricornutum*. Esto puede ser debido a que, como un resultado de los procesos de secado y liofilizado, las microalgas probablemente tienen una pared celular más frágil o más permeable, lo cual facilitaría su digestión por los organismos y explicaría la tendencia a una mayor eficiencia de absorción y utilización de las dietas preservadas (Laing y Gil-Verdugo,

1991).

La alta eficiencia de absorción de las fracciones orgánicas de todas las dietas refleja una alta eficiencia de las enzimas digestivas de *M. galloprovincialis*, que según Berry y Schleyer (1983) incluyen carbohidrasas, celulasas, peptidasas y lipasas, lo cual significa que este organismo puede utilizar alimentos de diferente naturaleza. Aparte de esta habilidad de asimilar con igual eficiencia alimentos de diferente tipo y composición, lo cual quedaría demostrado por la casi total falta de diferencias entre los porcentajes de asimilación de las diferentes fracciones orgánicas, es evidente que *M. galloprovincialis* tiene la capacidad de optimizar sus funciones digestivas, ya que mantuvo eficiencias cercanas al 100% con una cantidad de alimento superior a la concentración que la mayoría de los autores consideran demasiado alta para varios organismos filtradores.

El mecanismo más probable para esta alta eficiencia sería un aumento de la concentración de las enzimas digestivas, como en los casos descritos por Condrey *et al.* (1972), quienes mencionan que la alta asimilación de las fracciones orgánicas de la dieta de *Penaeus setiferus* y *Penaeus aztecus* está en función de la actividad y concentración de las enzimas digestivas de estos camarones y por Newman *et al.* (1982) para *Macrobrachium rosebergii*, para el cual reportaron eficiencias de 96 y 85%, respectivamente, para lípidos y para carbohidratos.

En cuanto a la energía ingerida y asimilada con las dietas, ésta fue similar independientemente de la forma de preservación en seco, ligeramente superior en el caso de las dietas congeladas y decididamente superior con las frescas. Esto se reflejó en una mayor cantidad de energía disponible para *M. galloprovincialis* alimentado con las microalgas en forma fresca. Estos resultados (transformados en equivalentes calóricos), concuerdan con

los reportados por otros autores (Navarro y Winter, 1982).

Los porcentajes de energía perdida por *M. galloprovincialis* en las heces fueron insignificantes, sobre todo cuando se alimentó a los mejillones con *P. tricornutum*, en donde las pérdidas representaron entre el 0.2 y el 1.9% del alimento ingerido. Aparentemente el aporte de energía de esta microalga es alto, lo cual contradice lo reportado por algunos autores, según los cuales esta especie no es muy adecuada como alimento para bivalvos, ya que sería difícil de digerir. Este no fue el caso con *M. galloprovincialis*, aunque el menor crecimiento registrado con esta microalga indica de todas formas que es cualitativamente inferior a *Chaetoceros* sp.

Por otro lado, se reconoce que los procesos digestivos tienen un costo energético (efecto dinámico específico) que puede representar una fracción significativa de la energía asimilada, cuando ésta se mide indirectamente como diferencia entre el contenido energético del alimento ingerido y el de las heces. Aún cuando este costo ha sido principalmente estudiado en crustáceos (Nelson *et al.*, 1977; Nelson *et al.*, 1985; Olivares-González, 1992), es probable que a este efecto se deba el menor crecimiento somático de *M. galloprovincialis* alimentado con *P. tricornutum* fresco, en comparación con el medido con *Chaetoceros* en la misma forma de presentación. En este sentido, la menor digeribilidad de *Phaeodactylum* quedaría comprobada y explicaría la mayor razón de conversión de alimento que se obtuvo con esta dieta en los ensayos de alimentación a mediano plazo.

El hecho que no se obtuvieron incrementos de la concha similares con las microalgas preservadas que con las frescas, no implica una calidad inferior de estas dietas, sino que refleja el efecto de las pérdidas de diferentes fracciones orgánicas, que causaron que la ración de microalgas preservadas administrada fuera menor (aproximadamente 50% menos) que

cuando se usaron las microalgas frescas, indicando que el tamaño de la ración fue el principal factor en determinar diferencias en el crecimiento de *M. galloprovincialis* (Urban *et al.*, 1983).

Ensayos posteriores con microalgas preservadas, mantenidas en agitación en agua de mar durante el mismo período utilizado en el proceso de resuspensión, indicaron que aproximadamente el 50% del peso seco total se solubiliza en el agua. Sprung (1984) y Widdows (1991) mencionan que varios moluscos pueden utilizar con alta eficiencia materiales orgánicos e inorgánicos en solución, motivo por el cual la posibilidad de esta pérdida no fue considerada como importante al inicio de estos experimentos. El menor incremento ponderal de estos organismos alimentados con las microalgas preservadas, hacen pensar que *Mytilus galloprovincialis* es menos eficiente que otros moluscos en la utilización de sustancias disueltas.

Se conoce poco acerca de los requerimientos nutricionales de los bivalvos (Kreeger, 1993). En muchos casos, este conocimiento se basa en la suposición que la composición bioquímica de los organismos refleja sus requerimientos dietéticos, o más sencillamente en el estudio de la composición de las microalgas más propicias para el crecimiento de los mismos. Durante este trabajo se determinó la composición proximal del tejido de *Mytilus galloprovincialis* alimentado con los dos tipos de microalgas frescas y preservadas. Se encontró que ésta fue similar con ambas microalgas y lo mismo se observó también para el perfil de los ácidos grasos. A pesar de que se conoce que los ácidos grasos poliinsaturados (20:5w3 y 22:6w3) son esenciales para promover el crecimiento de moluscos y crustáceos, el metabolismo de estos ácidos en moluscos bivalvos todavía no se entiende bien (Thompson y Harrison, 1992). Ya que en este trabajo no fue posible determinar estos ácidos grasos en las dietas ni en el tejido de los mejillones, no tenemos información sobre el aporte de estos

ácidos por las microalgas. Sin embargo, aún en el caso de que los procesos de preservación hubieran causado pérdida de algunos constituyentes esenciales, varios moluscos tienen la habilidad de modificar por elongación y desaturación los ácidos grasos de cadena corta de las dietas 'pobres' en los ácidos poliinsaturados de cadena más larga que requieren para su metabolismo (Laing y Alvarado, 1994), lo cual puede explicar como dietas pobres en esta clase de ácidos grasos se consideren en la literatura como dietas de alta calidad para moluscos en general (Webb y Chu, 1982; Brown *et al*, 1989).

## V. CONCLUSIONES.

Los resultados de este estudio demuestran que no se puede generalizar acerca de la calidad alimenticia de dietas particulares para los bivalvos, sino que cada especie tiene que ser estudiada en forma individual, considerando por separado el tipo de dieta, la estrategia con la cual ésta es suministrada y el tamaño de ración adecuado, ya que todos estos factores son importantes para determinar las condiciones bajo las cuales se puede optimizar el crecimiento del organismo.

En el caso de *Mytilus galloprovincialis* se determinó que puede utilizar eficientemente raciones superiores a las reportadas en la literatura como óptimas para otras especies. Los resultados obtenidos en los ensayos a mediano plazo con dietas preservadas como alimento para *M. galloprovincialis*, indican que es necesario efectuar más estudios tendientes a encontrar las mejores soluciones a los principales problemas presentados en este caso que fueron, la precipitación de material preservado al fondo de los acuarios con pérdidas sustanciales de alimento y las pérdidas de fracciones orgánicas debidas a las técnicas de preservación y de almacenaje, además de las ocasionadas por solubilización durante el período de resuspensión en agua.

Mientras se encuentran soluciones a estos problemas, las dietas secas pueden ser útiles en situaciones de emergencia en las granjas de moluscos bivalvos y posiblemente de otros invertebrados marinos, debido a la evidente ventaja de poder disponer de una dieta de características conocidas cuando, por cualquier motivo, no haya disponibilidad de dietas frescas. Estudios adicionales pudieran de hecho indicar la factibilidad de utilizarlas rutinariamente como dietas, ya que todas las fracciones, orgánicas e inorgánicas, de las

microalgas preservadas son utilizadas con una alta eficiencia. Su efectividad, por lo que se refiere al crecimiento de *M. galloprovincialis*, está por lo tanto únicamente limitada por el tamaño de la ración y no por su calidad dietética intrínseca.

El uso de agentes crioprotectores de microalgas es indispensable para lograr la viabilidad de cepas por períodos de tiempo relativamente largos, aunque es necesario continuar investigando los procesos de daño celular de las microalgas marinas causados por los procesos de preservación, ya que éstos causan pérdidas inmediatas de metabolitos celulares que aumentan con el tiempo de almacenamiento.

El uso del índice de Conover, usado ampliamente en literatura para calcular la eficiencia de asimilación de varios organismos no parece indicado, por lo menos en el caso de *Mytilus galloprovincialis*, ya que esta especie asimila eficientemente el material inorgánico de la dieta. Debido a que esto se ha mencionado también para otras especies, particularmente crustáceos, sería necesario considerar con reserva los datos que se refieren a la eficiencia de utilización de la dieta de otros organismos, que se hayan calculado con este método.

## LITERATURA CITADA

- Aizdaicher, N.A. y V.A. Silkin. 1983. Viability of the unicellular alga *Phaeodactylum tricornutum* after preservation in darkness. *Plant Physiol.* 58: 32-37.
- Antia, N.J. 1977. Effects of temperature on the darkness survival of marine microplanktonic algae. *Microb. Ecol.* 3: 41-54.
- A.O.A.C. 1980. Official methods of analysis. 13th edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Bayne, B.L., J. Widdows y R.J. Thopson. 1976. Physiological integrations. 261-292. En: Bayne, B.L. (ed.): *Marine mussels. Their ecology and physiology.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Bayne, B.L. 1991. The biology and cultivation of mussels. *Aquaculture.* 94: 121-278.
- Beaumont, A.R., R. Seed y P. García-Martínez. 1989. Electrophoretic and morphometric criteria for the identification of the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. 251-258. En: Ryland, J.S. y P. A. Tyler (eds.): *Reproduction, genetics and distributions of marine organisms.* Olsen & Olsen, Fredensborg, Denmark.
- Beiras, R., A. Pérez-Camacho y M. Albentosa. 1993. Influence of food concentration on energy balance and growth performance of *Venerupis pullastra* seed reared in an open-flow system. *Aquaculture.* 116: 353-365.
- Ben-Amotz, A. y A. Gilboa. 1980. Cryopreservation of marine unicellular algae. 1. A survey of algae with regard to size, culture age, photosynthetic activity and chlorophyll -to-cell ratio. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 2: 157-161.
- Berry, P.F. y M.H. Schleyer. 1983. The brown mussel *Perna perna* on the Natal coast, South Africa: utilization of available food and energy budget. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 13: 201-210.
- Bianchi, M. 1976. Etude taxonomique et distribution écologique des bactéries vibrioides du milieu marine. These de Doctorat. Université D' Aix-Marseille II.
- Biedenbach, J.M., L.L. Smith y A.L. Lawrence. 1990. Use of a new spray-dried algal product in penaeid larviculture. *Aquaculture.* 86: 249-257.
- Bligh, E.G. y W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Bonotto, S. 1988. Food and chemicals from microalgae. *Progr. Oceanogr.* 21: 207-215.
- Borowitzka, M.A. y L.J. Borowitzka. 1988. *Micro-algal biotechnology.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Box, J.D. 1988. Cryopreservation of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Br. phycol. J.* 23: 385-386.

- Brown, A. Jr. 1972. Experimental techniques for preserving diatoms used as food for larval *Penaeus aztecus*. Proc. Nat. Shellfish Ass. 62: 21-25.
- 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, Report. 205.
- Buitrago, E.B. 1988. Concentración y preservación de microalgas como reserva de alimento de organismos marinos cultivables. 47-53. En: Larvicultura de camarones peneidos. Vol. 1. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. V Centenario. Subprograma II-Acuicultura. CYTED-D.
- Calow, P. 1975a. Defecation strategies of two freshwater gastropods, *Ancylus flubiatilis* Mull and *Planorbis contortus* Linn., with a comparison of field and laboratory estimates of food absorption rate. Oecologia. 20: 51-63.
- Calow, P. 1975b. The feeding strategies of two freshwater gastropods, *Ancylus fluviatilis* Mull and *Planorbis contortus* Linn., in terms of ingestion rates and absorption efficiencies. Oecologia. 20: 33-49.
- Calow, P. 1977. Conversion efficiencies in heterotrophic organisms. Biol. reviews. 52: 385-409.
- Cammen, L.M. 1980. Ingestion rate: an empirical model for aquatic deposit feeders and detritivores. Oecologia. 44: 303-310.
- Chang, T.M.S., F.C. McIntosh y S.G. Mason. 1966. Semipermeable aqueous microcapsules. I. Preparation and properties. Can. J. Physiol. Pharmacol. 44: 115-128.
- Chu, F., K. Webb., D. Hepworth y M. Roberts. 1982. The acceptability and digestibility of microcapsules by larvae of *Crassostrea virginica*. J. Shellfish Res. 2: 29-34.
- Coeroli, M., D.De Gailland y J.P. Landret. 1984. Recent innovations in cultivation of molluscs in French Polynesia. Aquaculture. 39:45-67.
- Coll-Morales, J. 1986. Acuicultura marina animal. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Condrey, R.E., J.G.Gosselink y H.J. Bennett. 1972. Comparison of the assimilation of different diets by *Penaeus setiferus* and *P. aztecus*. Fish. Bull. 70: 1281-1292.
- Conover, R.J. 1966. Assimilation of organic matter by zooplankton. Limnol. Oceanogr. 11: 338-345.
- Cordero-Esquivel, B. y D. Voltolina. 1994. Growth of *Modiolus capax* (Conrad) (Mollusca:Bivalvia) with two diets and two feeding regimes. Rev. Invest. Mar. (México-Cuba). 3: (en prensa).
- Coutteau, P. y P. Sorgeloos. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. J. Shellfish Res. 11: 467-476.

- Curatolo, A., M.J. Ryan y J.P. Mercer. 1993. An evaluation of the performance of manila clam spat (*Tapes philippinarum*) fed on different rations of spray-dried algae (*Tetraselmis suecica*). *Aquaculture*. 112: 179-186.
- Davis, H.C. y R.R. Guillard. 1958. Relative value of ten genera of micro-organisms as food for oyster and clam larvae. *U.S. Fish. Wildl. Serv. Fish. Bull.* 136: 293-304.
- De Pauw, N., J. Morales y G. Persoone. 1984. Mass culture of microalgae in aquaculture systems: progress and constraints. *Hydrobiologia*. 116/117: 121-134.
- De Pauw, N. 1981. Use and production of microalgae as food for nursery bivalves. *Proc. Int. Workshop on Nursery Culturing of Bivalve Molluscs Ghent, Belgium. Spec. Publ. European Maric. Soc.* 7: 35-69.
- De Pauw, N. y G. Persoone. 1988. Micro-algae for aquaculture. 197-221. En: Borowitzka, M.A. y L.J. Borowitzka, (eds.): *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- Del Río-Portilla, M.A., A.D. Re-Araujo y D. Voltolina. 1992. Growth of the pearl oyster *Pteria sterna* under different thermic and feeding conditions. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 89: 221-227.
- Dubois, M., K.A. Gilles., J.K. Hamilton., B.A. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.* 28: 350-356.
- Edwards, C.A. y D.O.F. Skibinski, 1987. Genetic variation of mitochondrial DNA in mussel (*Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*) populations from south west England and south Wales. *Mar. Biol.* 94: 547-556.
- Enright, C.T., G.F. Newkirk, J.S. Craigie y J.D. Castell. 1986a. Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 96: 1-13.
- Enright, C.T., G.F. Newkirk, J.S. Craigie y J.D. Castell. 1986b. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilis* Schutt of varied chemical composition. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 96: 15-26.
- Epifanio, C.E. 1979. Comparison of yeast and algal diets for bivalve molluscs. *Aquaculture*. 16: 187-192.
- Epifanio, C.E. 1982. Phytoplankton and yeast as foods for juvenile bivalves: a review of research at the University of Delaware. 292-304. En: Pruder, G.D., C.J. Langdon and D.E. Conklin (eds.): *Proc. 2nd Int. Conf. Aquaculture Nutrition. Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*. Louisiana State University, Baton Rouge, LA.
- Epifanio, C., C. Valenti. y C. Turk. 1981. A comparison of *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana* as foods for the oyster *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*. 23:347-353.
- Ewart, J.W. y C.E. Epifanio. 1981. A tropical flagellate food for larval and juvenile oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquaculture*. 22: 297-300.

- Färber-Lorda, J. 1986. Etudes biologiques, energetiques et biochimiques du krill antarctique *Euphasia superba* et *Thysanoessa macrura* recolte au cours de la Campagne FIBEX. These de Doctorat, Université de Aix-Marseille II.
- Flaak, A.R. y C.E. Epifanio. 1978. Dietary protein levels and growth of the oyster *Crassostrea virginica*. Mar. Biol. 15: 157-163.
- Foster-Smith, R.L. 1975a. The effect of concentration of suspension on the filtration rates and pseudofaecal production for *Mytilus edulis* L., *Cerastoderma edule* (L.) and *Venerupis pullastra* (Montagu). J. exp. mar. Biol. Ecol. 17:1-22.
- Foster-Smith, R.L. 1975b. The effect of concentration of suspension and inert material on the assimilation of algae by three bivalves. J. mar. biol. Ass. U.K. 55: 411-418.
- Frankenberg, D. y K.L. Smith, Jr. 1967. Coprophagy in marine animals. Limnol. Oceanogr. 12: 443-450.
- Gabbott, P.A., D.A. Jones y D.H. Nichols. 1975. Studies on the design and acceptability of microcapsulated diets for marine particle feeders. II. Bivalve molluscs. 10th Eur. Symp. Mar. Biol., Ostend, Belgium. 127-141.
- Galgani, M.L. 1988. Essais de substitution des algues vivantes par des microparticules inertes pour l'alimentation des larves zoé de crevettes péneïdes. Aquaculture. 69: 115-127.
- García-Pámanes, F. y L.E. García-Pámanes. 1987. Cultivo comercial del mejillón en Baja California. 27-30. Acuavisión, Revista Mexicana de Acuicultura. Fondepesca, México. 10.
- Gardner, J.P.A. 1992. *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) (Bivalvia, Mollusca): the taxonomic status of the mediterranean mussel. Ophelia. 35: 219-243.
- Goldblatt, M.J., D.E. Conklin y W.D. Brown. 1980. Nutrient leaching from coated crustacean rations. Aquaculture. 19: 383-388.
- Goldenhuys, D.J., R.D. Walmsley y D.F. Toerin. 1988. Quality of algal material produced on a fertilizer-tap water medium in outdoor plastic-enclosed system. Aquaculture. 68: 157-164.
- González-Leonardo, M.I. 1990. Diseño y selección de medios alternativos para el cultivo de microalgas. Tesis de licenciatura. Escuela Superior de Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California, México.
- González-Medina, S. 1991. Determinación de la tasa de dilución óptima y del contenido protéico de tres especies de microalgas cultivadas en un sistema semicontinuo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California. México.
- González-Olivares, E. 1992. Balance energético de los adultos de *Artemia franciscana* Kellogg, 1906, bajo diferentes condiciones de temperatura. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. México.
- Gosling, E.M. 1984. The systematic status of *Mytilus galloprovincialis* in Western Europe: a review. Malacologia. 25: 551-568.

- Greiff, D. 1960. The effect of freezing, low temperature storage and drying by vacuum sublimation on the activities of viruses and cellular particulates. 167-187. En: Parkes, A.S. y A.U. Smith (eds.): Recent research in freezing and drying, Blackwell Scientific publications, Oxford.
- Griffiths, C.L. y R.J. Griffiths. 1987. Bivalvia. 1-89. En: Pandain, T.J. y F.J. Vernberg, (eds.): Animal energetics. Vol. 2. Bivalvia through reptilia. Academic Press Inc., N.Y.
- Guillard, R.R.L. 1983. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. 108-132. En: Berg, C.J. (ed.): Culture of marine invertebrates: selected readings. Hutchinson Ross Publishing Co., Stroudsburg, PA.
- Guillard, R.R.L. y J.H. Rhyter. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8: 229-239.
- Hawkins, A.J.S. y B.L. Bayne, 1991. Nutrition of marine mussels: factors influencing the relative utilizations of protein and energy. Aquaculture. 94: 177-196.
- Helm, M.M. e I. Laing. 1987. Preliminary observations on the nutritional value of "*Tahiti*" *Isochrysis* to bivalve larvae. Aquaculture. 62: 281-288.
- Hemerick, G. 1973. Mass culture. 255-266. En: Stein J.R. (ed.): Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement. Cambridge University Press, Cambridge.
- Herrero, C., A. Cid, J. Fabregas y J. Abalde. 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. Aquac. Enging. 10: 99-110.
- Hidu, H. y R. Ukeles. 1962. Dried unicellular algae as food for larvae of the hard shell clam, *Mercenaria mercenaria*. Proc. Natn. Shellfisheries. Ass. 53: 85-101.
- Holm-Hansen, O. 1963. Viability of blue-green algae after freezing. Physiol. Plant. 16: 530-540.
- Holm-Hansen, O. 1973. Preservation by freezing and freeze-drying. 195-205. En: Stein J.R. (ed.): Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hortsman, U. 1985. The use of microalgae in aquaculture. Arch. Hidrobiol. 20: 153-156.
- Hylleberg, J. 1975. Selective feeding by *Abarenicola pacifica* with notes on *Abarenicola vagabunda* and a concept of gardening in lugworms. Ophelia. 14: 113-137.
- Johannesson, K., N. Kautski y M. Tedengren. 1990. Genotypic and phenotypic differences between Baltic and North Sea populations of *Mytilus edulis* evaluated through reciprocal trasplantations. II. Genetic variation. Mar. Ecol. Progr. Ser. 59: 211-219.
- Jones, D.A., T.H. Moller, R.J. Campbell, J.G. Munford y P.A. Gabbott. 1975. Studies on the design and acceptability of micro encapsulated diets for marine particle feeders. I. Crustacea. 10th Eur. Symp. Mar. Biol. Ostend, Belgium, 1: 229-239.

- Jones, D.A. y P.A. Gabbott. 1976. Prospects for the use of microcapsules as food particles for marine particulate feeders. 77-91. En: Nixon, J.R. (ed.): Microcapsulation. Marcel Dekker Inc., New York and Basel.
- Jones D.A, J. Munford y P. Gabbott. 1974. Microcapsules as artificial food particles for aquatic filter feeders. *Nature (Lond.)*. 247: 233-235.
- Jorgensen, C.B. 1990. Bivalve filter feeding: hydrodynamics, bioenergetics, physiology and ecology. Olsen & Olsen. Denmark.
- Keen, A.M. 1971. Sea shells of the tropical west America. Marine mollusks from Baja California to Peru. Stanford University Press, Stanford.
- Koehn, R.K. 1991. The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus*. *Aquaculture*. 94: 125-145.
- Kreeger, D.A. 1993. Seasonal patterns in utilization of dietary protein by the mussel *Mytilus trossulus*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 95: 215-232.
- Laing, I., A. Child y A. Janke. 1990. Nutritional value of dried algae diets for larvae of manila clam (*Tapes philippinarum*). *J. mar. biol. Ass. U. K.* 70: 1-12.
- Laing, I. y C. Gil-Verdugo. 1991. Nutritional value of spray-dried *Tetraselmis suecica* for juvenile bivalves. *Aquaculture*. 92: 207-218.
- Laing, I. y J. López-Alvarado. 1994. Effect of dried algae diets on conditioning and fecundity of manila clam, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve). 25: 157-166.
- Laing, I. y P. Millican. 1992. Indoor nursery cultivation of juvenile bivalve molluscs using diets of dried algae. *Aquaculture*. 102: 231-243.
- Langdon, C.J. 1982. New techniques and their application to studies of bivalve nutrition. 305-320. En: Pruder, G.D., C.J. Langdon y D.E. Conklin (eds.): Proc. 2nd Int. Conf. Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. Louisiana State University Press. Baton Rouge, LA.
- Langdon, C.J. y M.J. Waldock. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 61: 431-448.
- Langton, R.W. 1975. Synchrony in the digestive diverticula of *Mytilus edulis* L. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 55: 221-230.
- Langton, R.W. y P.A. Gabbott. 1974. The tidal rhythm of extracellular digestion and the response to feeding in *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.* 24: 181-187.
- Langton, R.W. y G.U. McKay. 1976. Growth of *Crassostrea gigas* (Thunberg) spat under different feeding regimes in a hatchery. *Aquaculture*. 7:225-233.
- 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.

- Lepesteur, M., J.M. Martin y A. Fleury. 1993. A comparative study of different preservation methods for phytoplankton cell analysis by flow cytometry. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 93: 55-63.
- Loosanoff, V.L. y T. Murray, Jr. 1974. Maintaining adult bivalves for long periods on artificially grown phytoplankton. *The Veliger*. 16: 93-94.
- López-Elías, J.A. y D. Voltolina. 1993. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas, México*. 19: 169-180.
- Lowry, O., N. Rosebrough., A. Farr y R. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lucas, A. y P.G. Beninger. 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*. 44: 187-200.
- Masson, M. 1977. Observations on the feeding of larvae of *Mytilus galloprovincialis* with inert foods. *Mar. Biol.* 40: 157-164.
- Mathers, N.F. 1972. The tracing of natural algal food labelled with a carbon 14 isotope through the digestive tract of *Ostrea edulis* L. *Proc. malac. Soc. Lond.* 40: 118-124.
- McDonald, J.H., R. Seed y R.K. Koehn. 1991. Taxonomy of the genus *Mytilus*. *Mar. Biol.* 111: 323-333.
- McDonald, J.H. y R.K. Koehn. 1988. The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific coast of North America. *Mar. Biol.* 99: 111-118.
- McHenery, J.G., J.A. Allen y T.H. Birkbeck. 1983. Effect of tidal submersion on lysozyme activity in *Mytilus edulis* and *Tellina tenuis*. *Mar. Biol.* 75: 57-61.
- McQuiston, A. 1969. Cyclic activity in the digestive diverticula of *Lasaea rubra* (Montagu). *Proc. malac. Soc. Lond.* 8: 483-492.
- Metting, B. y J. Pyne. 1986. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme and microbial Technol.* 8: 386-394.
- Millamena, O.M., E.J. Aujero y I.G. Borlongan. 1990. Techniques of algae harvesting and preservation for use in culture and as larval food. *Aquac. Enging.* 9: 295-304.
- Morris, G.J. 1976a. The cryopreservation of *Chlorella*. 1. Interactions of rate of cooling, protective additive and warming rate. *Arch. Microbiol.* 107: 57-62.
- Morris, G.J. 1976b. The cryopreservation of *Chlorella*. 2. Effect of growth temperature on freezing tolerance. *Arch. Microbiol.* 107: 309-312.
- Mortensen, S.H., K. Y. Borsheim, J.R. Rainuzzo y G. Knutsen. 1988. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schutt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 122: 173-185.
- Morton, B. 1970. The tidal rhythm and rhythm of feeding and digestion in *Cardium edule*. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 50: 499-512.

- Morton, B. 1973. A new theory of feeding and digestion in the filter-feeding lamellibranchia. *Malacologia*. 14: 63-79.
- Morton, B. 1977. The tidal rhythm of feeding and digestion in the pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 26: 135-151.
- Napolitano, G.E. 1990. Fatty acid composition of three cultured algal species (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* and *Chaetoceros calcitrans*) used as food for bivalve larvae. *J. World Aquac. Soc.* 21: 122-130.
- Navarro, E., J.I.P. Iglesias, A. Perez-Camacho, U. Labarta y R. Beiras. 1991. The physiological energetics of mussels *Mytilus galloprovincialis* from different cultivation rafts in the Ria de Arosa Galicia, N. W. Spain). *Aquaculture*. 94: 197-212.
- Navarro, J.M. 1983. Oferta alimenticia natural y su efecto sobre los procesos fisiológicos del bivalvo *Mytilus chilensis* en la Bahía de Yaldad, Chiloe (sur de Chile). *Mem. Asoc. Latinoam. Acuicult.* 5: 175-187.
- Navarro, J.M y J.E. Winter. 1982. Ingestion rate, assimilation efficiency and energy balance in *Mytilus chilensis* in relation to body size and different algal concentrations. *Mar. Biol.* 67: 255-266.
- Nell, J. y W. O'Connor. 1991. The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley) larvae. *Aquaculture*. 99: 277-284.
- Nelson, S.G., A.W. Knight y H.W. Li. 1977. The metabolic cost of food utilization and ammonia production by juvenile *Macrobrachium rosebergii* (Crustacea:Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 57A: 67-72.
- Nelson, S.G., M.A. Simmons y A.W. Knight. 1985. Calorigenic effect of diet on the grass shrimp *Crangon franciscorum* (Crustacea:Crangonidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 82A: 373-376.
- Newell, R. I. E. 1982. Molluscan bioenergetics - A synopsis. 252-271. En: Pruder, G.D., C.J. Langdon and D.E. Conklin (eds.): *Proc. 2nd Int. Conf. Aquaculture Nutrition. Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*. Louisiana State University, Baton Rouge, LA.
- Newman, M.W., P.L. Lutz y S.C. Snedaker, 1982. Temperature effects on feed ingestion and assimilation efficiency of nutrients by the malaysian prawn, *Macrobrachium rosebergii* (de Man). *J. World Maricul. Soc.* 13: 95-103.
- Nonomura, A.M. 1988. A future of phycotechnology. 529-552. En: Lembi, C.A. y J.R. Waaland (eds.): *Algae and human affairs*. Cambridge University Press., Cambridge.
- Oswald, W.J. 1988. The role of microalgae in liquid waste treatment and reclamation. 255-281. En: Lembi, C.A. y J.R. Waaland (eds.): *Algae and human affairs*. Cambridge, University Press, Cambridge.
- Palmer, A.R. 1983. Growth rate as a measure of food value in thaidid gastropods: assumptions and implications for prey morphology and distribution. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 73: 95-124.

- Pande, S., R. Khan. y T. Venkitasubramanian. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acid. *Anal. Biochem.* 6: 415-423.
- Persoone, G. y C. Claus. 1980. Mass culture of algae: a bottle-neck in the nursery culturing of molluscs. 265-285. En: Shelef, G. y C.J. Soeder (eds.): *Algae biomass*. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Provasoli, L., J.J.A. McLaughlin y M.R. Droop. 1957. The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.* 25: 392-428.
- Prus, T. 1971. The assimilation efficiency of *Asellus aquaticus* L. (Crustacea, Isopoda). *Freshw. Biol.* 1: 287-305.
- Rangel-Dávalos, C. 1990. El cultivo de moluscos marinos en México. 107-138. En: De la Lanza-Espino, G 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.
- Reid, R.G.B. 1982. Aspects of bivalve feeding and digestion relevant to aquaculture nutrition. 231-251. En: Pruder, G.D., Ch. J. Langdon and D. E. Conklin, (eds.): *Proc. 2nd Int. Conf. Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*. Louisiana State University, Baton Rouge, LA.
- Rico-Mora, R. 1987. Efecto interactivo de la temperatura y de la concentración de microalgas en la fisiología alimenticia y la energía potencial para el crecimiento de *Modiolus capax* (Conrad) (Bivalvia: Mytilidae). Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México.
- Riisgard, H.U. y F. Mohlenberg. 1979. An improved recording apparatus for determining the filtration rate of *Mytilus edulis* as a function of size and algal concentration. *Mar. Biol.* 52:61-67.
- Romberger, H.P. y C.E. Epifanio. 1981. Comparative effects of diets consisting of one or two algal species upon assimilation efficiencies and growth of juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquaculture.* 25: 77-87.
- Saks, N.M. 1978. The preservation of salt marsh algae by controlled liquid nitrogen freezing. *Cryobiology.* 15: 563-568.
- Sánchez-Saavedra, M.P. y D. Voltolina, 1994. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. *Comp. Biochem. Physiol.* 107B: 39-44.
- Sarver, S.K., D.W. Foltz. 1993. Genetic population structure of a species' complex of blue mussels (*Mytilus* spp.). *Mar. Biol.* 117: 105-112.
- Scott, J.M. 1980. Effect of growth rate of the food algae on the growth/ingestion efficiency of a marine herbivore. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 60: 681-702.
- Sedgwick, R.W. 1980. The requirements of *Penaeus merguensis* for vitamin and mineral supplements in diets based on freeze-dried *Mytilus edulis* meal. *Aquaculture.* 19: 127-137.

- Sick, L.V. y C.A. Sigfried. 1982. Effects of the ambient environment on metabolic regulation of shell biosynthesis in marine bivalve mollusks. 377-399. En: Pruder, G.D., C.J. Langdon and D.E. Conklin (eds.): Proc. 2nd Int. Conf. Aquaculture Nutrition. Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. Louisiana State University, Baton Rouge, LA.
- Skibinski, D.O.F., J.A. Beardmore y T.F. Cross. 1983. Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae:Mollusca) in the British Isles. Biol. J. Linn. Soc. 19: 137-183
- Smaal, A.C. 1991. The ecology and cultivation of mussels: new advances. Aquaculture. 94: 245-261.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1981. Biometría, principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume Ediciones, Madrid.
- Sommer, T., W. Potts y N. Morrissy. 1990. Recent progress in the use of processed microalgae in aquaculture. Hydrobiologia. 204: 435-443.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343. En: Stein J.R. (ed.): Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sprung, M. 1984. Physiological energetics of mussel larvae (*Mytilus edulis*). IV. Efficiencies. Mar. Ecol. Progr. Ser. 18: 179-186.
- Streit, B. 1978. A note on the nutrition of *Stylaria lacustris* (Oligochaeta:Naididae). Hydrobiologia. 61: 273-276.
- Sukenik, A. y R. Wahnou. 1991 Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. Aquaculture. 97: 61-72.
- Taghon, G.L. 1981. Beyond selection: optimal ingestion rate as a function of food value. The American Naturalist. 118: 202-214.
- Takano, M., J-I, Sado, T. Ogawa y G. Terui. 1973. Freezing and freeze-drying of *Spirulina platensis*. Cryobiology. 10: 440-444.
- Tenore, K.R. y W.M. Dunstan. 1973. Comparison of feeding and biodeposition of three bivalves at different food levels. Mar. Biol. 21: 190-195.
- Thompson, R.J. y B.L. Bayne. 1972. Active metabolism associated with feeding in the mussel *Mytilus edulis* L. J. exp. mar. Biol. Ecol. 9: 111-124.
- Thompson, R.J. y B.L. Bayne. 1974. Some relationships between growth, metabolism and food in the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 27: 317-326.
- Trujillo-Valle, M. de L. 1993. La colección de microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Comunicaciones Académicas. CTATC-9101.
- Tsuru, S. 1973. Preservation of marine and fresh water algae by means of freezing and freeze-drying. Cryobiology. 10: 445-452.

- Ukeles, R., G.H. Wikfors y J.W. Twarog. 1984. Relative growth rate cycles in *Crassostrea virginica* (Gmelin) fed five algal diets. J. Shellfish Res. 4: 155-159.
- Ukeles, R. y G.H. Wikfors. 1988. Nutritional value of microalgae cultured in the absence of vitamins for growth of juvenile oyster, *Crassostrea virginica*. J. Shellfish Res. 7: 381-387.
- Urban, E.R., Jr., G.D. Pruder y Ch.J. Langdon. 1983. Effect of ration on growth and growth efficiency of juveniles of *Crassostrea virginica* (Gmelin). J. Shellfish Res. 3: 51-57.
- Van Erkom-Schurink, C. 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: 779-789.
- Volkman, J.K., G.A. Dunstan, S.M. Barrett, P.D. Nichols y S.W. Jeffrey. 1992. Essential polyunsaturated fatty acids of microalgae used as feedstocks in aquaculture. 180-186. En: Allan, G.L. y W. Dall (eds.): Proc. Aquaculture Nutritional Workshop, Salamander Bay. NSW Fisheries, Brackish Station, Salamander Bay, Australia.
- Volkman, J.K., S. Jeffrey., P. Nichols., G. Rogers y C. Garland. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. J. exp. mar. Biol. Ecol. 128: 219-240.
- Vonshak, A. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. 117-145. En: Richmond, A. (ed.): CRC Handbook of microalgal mass culture. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Waldock, M.J. y D.L. Holland. 1984. Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: polyunsaturated fatty acids. Lipids, 19: 332-336.
- Webb, K.L. y F.L.E. Chu. 1982. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. 272-291. En: Pruder, G.D., C.J. Langdon and D.E. Conklin (eds.): Proc. 2nd Int. Conf. Aquaculture Nutrition. Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. Louisiana State University, Baton Rouge, LA.
- Whyte, J.N.C., N. Bourne y C.A. Hodgson. 1989. Influence of algal diets on biochemical composition and energy reserves in *Patinopecten yessoensis* (Jay) larvae. Aquaculture. 78: 333-347.
- Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. Aquaculture. 60: 231-241.
- Widdows, J. 1978. Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of *Mytilus edulis*. J. mar. biol. Ass. U.K. 58: 109-124.
- Widdows, J. 1978. Physiological indices of stress in *Mytilus edulis*. J. mar. biol. Ass. U.K. 58: 125-142.
- Widdows, J. 1991. Physiological ecology of mussel larvae. Aquaculture. 94: 147-163.
- Widdows, J. y B.L. Bayne. 1971. Temperature acclimation of *Mytilus edulis* L. with reference to its energy budget. J. mar. biol. Ass. U.K. 51: 109-124.

- Widdows, J., P. Fieth y C.M. Worrall. 1977. Relationships between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 50: 195-207.
- Wikfors, G.H., J.W. Twarog y R. Ukeles. 1984. Influence of chemical composition of algal food sources on growth of juvenile oysters, *Crassostrea virginica*. Biol. Bull. 167: 251-263.
- Wikfors, G.H. 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. Aquaculture. 59: 1-14.
- Wilbur, K.M. y G. Owen. 1964. Growth. 211-242. En: Wilbur, K.M y C.M. Yonge (eds.): Physiology of mollusca. Academic Press. Ney York.
- Winter, J.E. 1974. Growth in *Mytilus edulis* using different types of food. Ber. wiss. Kommm. Meeresforsch. 23: 360-375.
- Winter, J.E. 1978. A review on the knowledge of suspension-feeding in lamellibranchiata bivalves, with special reference to artificial aquaculture systems. Aquaculture. 13: 1-33.
- Winter, J.E. y R.W. Langton. 1975. Feeding experiments with *Mytilus edulis* L. at small laboratory scale. I. The influence of the total amount of food ingested and food concentration on growth. 565-581. En: Persoone, G. y E. Jasper (eds.): Proc. 10th Eur. Symp. Mar. Biol. Vol. 1. Universa Press. Wetteren.
- Winter, J.E. y R.W. Langton. 1976. Feeding experiment with *Mytilus edulis* L. at small laboratory scale. I. The influence of the total amount of food ingested and food concentration on growth. 565-581. En: Persoone, G. y E. Jaspers (eds.): Proc. 10th Eur. Symp. Mar. Biol. Ostend, Belgium. Universa Press Watteren.
- Withers, L.A. 1985. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. 243-265. En: Kartha, K.K. (ed.): Cryoprotection of plant cells and organs. CRC Press, Boca Raton.

# **ANEXOS**

# GROWTH OF *Modiolus capax* (CONRAD) (MOLLUSCA: BIVALVIA) WITH TWO DIETS AND TWO FEEDING REGIMES

Beatriz Cordero Esquivel and Domenico Voltolina

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, (C.I.C.E.S.E.), México

## ABSTRACT

Groups of the mytilid *Modiolus capax* were kept at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  and were fed during 30 days equal rations of the microalgae *Chaetoceros sp.* and *Pavlova lutheri*, administered continuously or in two aliquots. Increases in shell height were small (0.45 mm/month), and there were no differences between groups. Final meat dry weights were greater for the *Pavlova*-fed organisms, which may be attributed to the higher organic content of this microalga. There was a tendency for greater increases in organisms fed discontinuously. Food conversion indices were high in all cases, which is incongruent with the scarce shell height increases and suggests an uncoupling between shell and meat growth processes.

Key words: growth, *Modiolus capax*, ISE, Gulf of California.

## RESUMEN

Grupos de *Modiolus capax* fueron mantenidos a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  y alimentados durante 30 días con una misma ración diaria de las microalgas *Chaetoceros sp.* y *Pavlova lutheri* suministradas en forma continua o en dos porciones. Los incrementos del alto de la concha fueron bajos (0.45 mm/mes), y no hubo diferencias por tipo de alimentación. Los pesos secos finales de la carne de *M. capax* resultaron más altos para los organismos alimentados con *Pavlova*, lo cual se debe al mayor contenido orgánico de esta microalga, y se notó un mayor incremento en el caso de dietas suministradas en forma discontinua. Los índices de conversión de alimento fueron altos, lo que no es congruente con los bajos valores de aumento de la concha y sugiere la posibilidad de un desacoplamiento entre el crecimiento del tejido y de la concha.

Palabras clave: crecimiento, *Modiolus capax*, ISE, Golfo de California.

## INTRODUCCION

Considerable information is now available on the mytilid *Modiolus capax* (Conrad), a species which was poorly known until recent years. The reproductive cycle in natural conditions has been described by Ochoa Baez (1985), by Garza Aguirre and Bückle Ramírez (1989) and laboratory-induced spawning and larval development by Orduña Rojas and Farfán (1991). However, attempts to obtain laboratory-conditioned broodstock have not been successful (Espinoza Peralta, 1989; Farfán, CICESE, pers. comm.). This restricts the possibility of obtaining laboratory-produced spat for aquaculture, to the availability of mature adults in nature. Broodstock conditioning may be achieved by maintaining optimum conditions for somatic growth (Sastry, 1975) which, for an as yet incompletely known species, such as *M. capax*, involves investigations on the effects of several environmental factors. Since feeding has an important role in gonadic development (Sastry, 1968, 1975; Helm *et al.*, 1973; Grant and Cranford, 1989), this has been one of the first to be investigated (Rico Mora, 1987).

The present paper is a further contribution in this field. It describes, in terms of somatic growth of *M. capax*,

the effects of two microalgal diets used with two feeding regimes.

## MATERIALS AND METHODS

Specimens of *Modiolus capax*, obtained from a natural bed in the upper Gulf of California (San Felipe: Lat.  $31^\circ 01'$  Long.  $114^\circ 51'$ ) were acclimatized during approximately one month to laboratory conditions (temperature:  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ; salinity:  $32 \pm 1\text{‰}$ ; oxygen: to 100 % saturation by air bubbling; feeding "*ad libitum*" with a mixture of several microalgae, depending on availability). After this time, 145 specimens with a shell height of between 3.5 and 4.5 cm were scrubbed free of epibiosis, starved during 48 hours, measured to the nearest 0.1 mm with a vernier calliper, individually marked and divided into five groups with a homogeneous size distribution (one way analysis of variance,  $\alpha = 0.05$ ).

Four of these groups were placed in equal numbers of 45 L aquaria. The remaining organisms were shucked and dried in a convection oven at  $60^\circ\text{C}$  to constant weight. The mean of their meat dry weights was considered as the mean initial dry weight and compared later to the values obtained for each group at the end

of the experiment, to calculate weight increases. The relative gross and net food conversion indices were calculated with the equations  $GFC = TF/W$  and  $NFC = OF/W$  where GFC and NFC = gross and net conversion indices, respectively; TF and OF = total and organic dry weight of the food administered throughout the experiment and W = dry meat weight gained (Sedgwick, 1980). The inverse of these values  $\times 100$  indicates the percentage of feed which goes into tissue growth and may be used as an approximation of the growth efficiency of an organism, under the specified experimental conditions.

The microalgae used for the feeding experiment were the clonal strains *Chaetoceros* sp. (CH-X-1) and *Pavlova lutheri* (Droop) Hibberd (PA-L-1) of CICESE's collection (Voltolina *et al.*, 1991). Both were maintained in semicontinuous cultures, at daily dilution rates of 50 and 30 % respectively, the first in the simplified medium described by López Elfas (1990) and the second in f medium (Guillard and Ryther, 1962).

The daily ration for the experimental groups was determined with preliminary trials and was close to the threshold for pseudofaeces production when the total feed was administered in one single ration. This was, on a dry weight basis, approximately 4 % of the organisms' meat dry weight.

Two of the groups (one for each algal strain) were fed daily a volume of algal culture equivalent to 4 % of their initial weight, delivered continuously with a peristaltic pump throughout 24 hours. The others received the same ration, divided in equal parts into one morning and one evening aliquots.

The experiment lasted 30 days, under experimental conditions similar to those described earlier, with daily faeces removal and complete water changes. At the end of the experiment the organisms were starved for 24 hours and their shell heights and meat dry weights were determined as described previously.

## RESULTS AND DISCUSSION

Mean initial shell heights ranged between  $40.86 \pm 0.80$  and  $41.18 \pm 0.88$  and final ones between  $41.09 \pm 0.96$  and  $41.92 \pm 0.72$ . Since initial and final individual measurements were available, individual increments were obtained and used for statistical analysis. They were widely variable, as shown by the high values of the standard error (Table I). Analysis of variance showed no significant difference in shell increase between groups. Therefore, the overall mean monthly increment ( $0.45 \pm 0.21$  mm) may be taken as

representative for *M. capax*, under the experimental conditions detailed earlier.

This rate is low, compared to that of other mytilids (e.g. Cayré, 1978; Hickman, 1979; García *et al.*, 1982) but not far from those obtained in the field by Garza Aguirre (1987), of between 1.2 and 1.3 mm for organisms of initial size from 5 to 43 mm, and of 0.45 mm for those between 43 and 60 mm.

Initial mean meat dry weight was  $343.9 \pm 32.0$  mg and the final ones ranged between  $393.3 \pm 39.1$  and  $524.2 \pm 52.4$  mg. In this case, some differences were noted. The groups fed *Pavlova* had higher final weights and there was no difference between feeding regimes. In the case of *Chaetoceros* the final weight of the group fed continuously was not significantly higher than the initial, while the group given the same amount of that alga in two aliquots increased significantly and the value of the mean final weight overlapped that of the group fed *Pavlova* continuously (Table I).

The weight increments were used to calculate the gross and net feed conversion indices for each group. These were better for *Pavlova* when total feed dry weight was used. However, using organic rather than total food dry weight, the values were fairly similar, since *Pavlova lutheri* had a low ash content (9 %), while the organic weight of *Chaetoceros* was only 55 % of the total.

In both cases, indices were better when food was given in separate rations rather than continuously. We noted that in the first case the food had invariably been completely used by the time the next half ration was due, while in several occasions the aquaria with a continuous food supply had, in the morning, a notable microalgal density, which might indicate the presence of diurnal filtration cycles.

In short-term experiments, Rico Mora (1987 and pers. comm.) found that *P. lutheri*-fed *M. capax* had gross and net growth efficiencies of approximately 50 and 60-70 % respectively, which compare well with the food conversion indices obtained here.

## CONCLUSIONS

Knowledge of this species is still insufficient to draw any conclusion as to its potential for aquaculture. Some authors have pointed out that it has slow shell growth rates, this agrees with our results and makes its culture economically unattractive (Garza Aguirre, 1987; Aguirre Hinojosa, 1987). On the other hand, it may maintain high growth efficiencies within a wide range of

temperatures and of food concentrations (Rico Mora, 1987) and its food conversion is as high or higher than those of other fast-growing species, such as the pearl oyster *Pteria sterna* (Del Río Portilla *et al.*, 1992) which has been suggested as a good candidate for aquaculture because of its high growth rates (Aguirre Hinojosa, 1987; Baqueiro, 1987; Bückle Ramirez *et al.*, 1992)

This inconsistency may be the result, as shown for other species (Ukeles *et al.*, 1984; Hilbish, 1986) of an uncoupling between shell and tissue growth, so that meat increases first and shell later. Given the high efficiency of food utilization of this species, this is a distinct possibility that is at present under investigation.

## REFERENCES

- AGUIRRE HINOJOSA, E. (1987): *Análisis de la fijación, crecimiento y sobrevivencia del mejillón Modiolus capax (Conrad) (Bivalvia: Mytilidae) durante el desarrollo de una comunidad sobre sustratos artificiales en la Bahía de los Angeles, B.C.* Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C., Mexico. 106 p.
- BAQUEIRO, E. (1987): Historia, presente y futuro del cultivo de bivalvos en México. *Mem. III Reunión Nal. de Malacología y Conquiliología*, Soc. Mex. de Malacología, Monterrey, N.L., México. 469-501.
- BÜCKLE RAMIREZ, L.F., D. VOLTOLINA LOBINA, E. MORALES GUERRERO and F. VALENZUELA BURIEL (1992): Spat settlement and growth of *Pteria sterna* (Gould) (Mollusca, Bivalvia) in Bahía de los Angeles, Baja California, México. *Trop. Ecol.* 33. (in press).
- CAYRE, O. (1978): Etude de la moule *Perna perna* L. et des possibilités de mytiliculture en République Populaire du Congo. *Cah. O.R.S.T.O.M. (Oceanogr.)* 16:9-17.
- DEL RIO PORTILLA, M.A., A.D. RE ARAUJO and D. VOLTOLINA (1992): Growth of the pearl oyster *Pteria sterna* under different thermic and feeding regimes. *Mar. Ecol. (Progr. Ser.)* 89:221-227.
- ESPINOZA PERALTA, A.M. (1989): *Dilación del desove de Modiolus capax (Conrad) (Bilvavia: Mytilidae) en condiciones controladas de temperatura y alimentación.* Tesis de Licenciatura. Escuela Superior de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México. 106 p.
- GARCIA, P.F., G. SALAS, and A. OLIVIA (1982): Ecología de *Mytilus californianus*. In: Estudios para el desarrollo del cultivo comercial de los mejillones *Mytilus californianus* y *Mytilus edulis* en las costas de Baja California. Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Informe anual 1982, Tomo III.
- GARZA AGUIRRE, M.C. (1987): *Ciclo reproductivo, estructura de la población y crecimiento del mejillón Modiolus capax (Conrad) (Bivalvia-Mytilidae) en la Bahía de los Angeles, Ensenada, B.C.* Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C., México. 95 p.
- GARZA AGUIRRE, M.C. and L.F. BÜCKLE RAMIREZ (1989): Ciclo reproductivo del mejillón *Modiolus capax* (Conrad, 1837) (Bilvavia, Mytilidae, Anisomyaria) en la Bahía de los Angeles, Baja California, México, *An. Inst. Cienc. Mar Limnol. Univ. Nac. Autón. Méx.* 16(1): 157-169.
- GRANT, J. and P.J. CRANFORD (1989): The effect of laboratory diet conditioning on tissue and gonad growth in the sea scallop *Placopecten magellanicus*. In: Ryland, J.S. and P.A. Tyler (eds.) *Reproduction, genetics and distribution of marine organisms*, Olsen & Olsen, Fredensborg, 469 p.
- GUILLARD, R.R.L. and J.H. RYTHER (1962): Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8:229-239.
- HELM, M.M., D.L. HOLLAND and R.R. STEPHENSON (1973): The effect of supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of *Ostrea edulis* L. on larval vigour. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 53: 673-684.
- HICKMAN, R.W. (1979): Allometry and growth of the green lipped mussel *Perna canaliculus* In New Zealand. *Mar. Biol.* 51.
- HILBISH, T.J. (1986): Growth trajectories of shell and soft tissue in bivalves: seasonal variations In *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 96: 103-113.
- LOPEZ ELIAS, J.A. (1990): *Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con medios simplificados: evaluación de técnicas analíticas y de producción.* Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C., México, 163 p.

- OCHOA BAEZ, R.I. (1985): Antecedentes sobre el ciclo de producción de *Modiolus capax* (Conrad, 1837) (Bivalvia: Mytilidae) en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. *Inv. Mar. CICIMAR* 2: 86-103.
- ORDUÑA ROJAS, J. and B.C. FARFAN (1991): Induced spawning and ontogeny of *Modiolus capax* Conrad (Bivalvia: Mytilidae). *Veliger* 34: 302-308.
- RICO MORA, R. (1987): *Efecto interactivo de la temperatura y de la concentración de microalgas en la fisiología alimenticia y la energía potencial para el crecimiento de Modiolus capax (Conrad) (Bivalvia: Mytilidae)*. Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C., México, 91 p.
- SASTRY, A.N. (1968): The relationships among food, temperature and gonad development of the bay scallop *Aquiptecten irradians* Lamarck. *Physiol. Zool.* 41: 44-53.
- SASTRY, A.N. (1975): Physiology and ecology of reproduction in marine invertebrates. 279-299. In: Vernberg, F.J. (ed.) *Physiological ecology of estuarine organisms*, University of South Carolina Press, Columbia, 397 p.
- SEDGWICK, R.W. (1980): The requirements of *Penaeus merguensis* for vitamin and mineral supplements in diets based on freeze-dried *Mytilus edulis* meal. *Aquaculture* 19: 127-137.
- UKELES, R., G.H. WIKFORS and J.W. TWAROG (1984): Relative growth rate cycles in *Crassostrea virginica* (Gmelin) fed five algal diets. *J. Shellfish Res.* 4: 155-159.
- VOLTOLINA LOBINA, D., M.L. TRUJILLO VALLE y M.I. GONZALEZ LEONARDO (1991): La colección de cepas de microalgas del Departamento de Acuicultura del C.I.C.E.S.E. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada B.C., México. Comunicaciones Académicas CTACT-9101. 49 p.

TABLA 1.- Initial and final mean shell heights (in mm) and meat dry weights (in mg) of the four experimental groups of *Modiolus capax*, and increments after one month. Standard errors (n:29) are given in parenthesis. Gross and net food conversion indices were calculated from total and ash-free amount of food supplied and from the increase in mean meat dry weights. Lack of statistical differences ( $\alpha$ : 0.05; analysis of variance and Student-Newman Keuls test) is indicated by equal letters.

	<i>Chaetoceros</i>		<i>Pavlova</i>	
	Continuous	Divided	Continuous	Divided
Height				
Initial	40.86 (0.39)	41.18 (0.43)	40.88 (0.47)	40.89 (0.48)
Final	41.28 (0.44)	41.92 (0.36)	41.31 (0.49)	41.09 (0.48)
Increase	0.42a (0.18)	0.74a (0.35)	0.43a (0.13)	0.20a (0.53)
Weight				
Initial	343.9a (32.0)	343.9a (32.0)	343.9a (32.0)	343.9a (32.0)
Final	393.3ab (19.1)	436.5b (20.2)	464.8bc (21.7)	524.2c (25.5)
Increase	69.91 (14.80)	97.81 (19.15)	129.45 (19.34)	185.92 (23.71)
Conversion				
Gross	6.12	4.37	3.30	2.30
Net	3.36	2.40	3.01	2.09

## THE BIOCHEMICAL COMPOSITION OF TWO DIATOMS AFTER DIFFERENT PRESERVATION TECHNIQUES

BEATRIZ CORDERO ESQUIVEL, DOMENICO VOLTOLINA LOBINA and  
FRANCISCO CORREA SANDOVAL

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Departamento de Acuicultura,  
Av. Espinoza # 843.A.P.2732, Ensenada, Baja California, México (Fax 011-52-667-4-48-80)

(Received 27 October 1992; accepted 27 November 1992)

**Abstract**—1. Air- and freeze-drying caused an approximately 70% loss of total lipids, while freezing left unchanged the proximate composition of the two diatoms *Chaetoceros* sp. and *Phaeodactylum tricorutum*.

2. Loss of total organics after two months of storage was approximately 20% for air- and freeze-dried algae, but lower (10 and 5% for *Phaeodactylum tricorutum* and *Chaetoceros* sp., respectively) in the samples stored in a commercial freezer.

3. The amino acid profiles are similar to those generally reported for algal single-cell protein. Both algae may be considered a good source of dietary protein for aquaculture since they contain all the amino acids considered essential for fish and shrimp, including methionine.

4. Short-chain (14 and 16 C) fatty acids are 90% or more in *Chaetoceros*, while *Phaeodactylum* has more than 30% of 18 to 22 C. Unsaturation is approximately 50% for *Chaetoceros* and vary between 44 and 63% in *Phaeodactylum*, depending on preservation and storage.

5. Storage caused an increase in the percentages of the essential fatty acids 18:2 and 18:3.

### INTRODUCTION

The traditional diet for many cultured aquatic organisms are live microalgae. For this, aquaculturists need large-scale microalgal cultures, which add considerably to the costs of production and involve an additional factor of risk compared to artificial food. For these reasons, the feasibility of using alternative diets, such as micropelleted artificial food or microalgae preserved with different techniques, has been under investigation for several years. In spite of the advances in artificial feed formulation and presentation (Jones *et al.*, 1974; Chu *et al.*, 1982), researchers have been focussing their attention more on preserved microalgae, since they are the natural diet of the organisms to be fed. Frozen concentrated cultures have been used as main diet or as a complement to live ones in shellfish cultures (Sommer *et al.*, 1990) and freeze-, spray- or air-dried or simply refrigerated algal concentrates have been suggested by many authors for some mollusks and crustaceans (Brown, 1972; Laing *et al.*, 1990; Nell and O'Connor, 1991; Laing and Millican, 1992). The main concern in all these studies is the fact that the biochemical composition of microalgae might be altered by the preservation and storage techniques, which in turn could affect the survival and growth of the organisms feeding on them.

The present study examines the proximate and biochemical composition of two diatoms which have been used successfully for aquaculture in Mexico, and how these may be affected by three different preservation techniques.

### MATERIALS AND METHODS

The algae used are the clonal strains CH-X-1 (*Chaetoceros* sp.) and PH-T-1 (*Phaeodactylum tricorutum* Bohlin) of CICESE's collection (Voltolina *et al.*, 1991). Biomass was produced in semi-continuous 15 l cultures kept in steady-state by 50% daily dilutions. Lighting was continuous, with a concentration of  $\approx 120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and was provided by two Cool White and two Daylight 40 W fluorescent tubes for each set of three catboys.

Daily yields were concentrated by centrifugation at 2000 rpm for 15 min, and the concentrate divided into three equal volumes for preservation: by air-drying in a convection oven at  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , by freezing at  $-20^\circ\text{C}$ , and by freeze-drying in a Labconco freeze-dryer after pre-freezing at  $-20^\circ\text{C}$ . Freeze- and air-dried algae were stored with silica gel in ziplock plastic bags and the frozen ones were kept in a commercial freezer at  $-20^\circ\text{C}$ .

Proximate analyses were run in triplicate on composite samples between one and three days after preservation, and after about two months of storage.

Fatty and amino acid profiles are only available for air- and freeze-dried samples, freshly preserved and after two months of storage for fatty acids and for two months old samples for amino acids.

Total and ash-free dry weights were determined as in Sorokin (1973). Samples were dried to constant weight in a convection oven at  $60^\circ\text{C}$  and ashed at  $470^\circ\text{C}$  in a muffle furnace.

Protein content was determined according to Lowry *et al.* (1951), as described by Malara and Charra (1972a) and modified by Farber (1986);

Table 1. Proximate analyses of *Chaetoceros* sp. and *Phaeodactylum tricornutum*\*

Component	Fresh	Air-dried			Freeze-dried			Frozen		
		A	B	%	A	B	%	A	B	%
<i>Chaetoceros</i>										
Protein	45.46	69.52	54.18	21.9	69.30	58.33	15.8	46.46	45.29	2.9
Carbohydrate	17.51	20.32	18.63	8.3	13.48	14.44	21.9	16.84	15.31	9.1
Lipid	37.07	10.16	8.81	13.3	12.22	6.93	43.3	36.71	35.14	4.3
Ash	32.30	70.58			70.51			33.29		
% initial organics			81.62			79.70			95.74	
<i>Phaeodactylum</i>										
Protein	41.91	62.20	40.97	34.1	55.50	45.82	17.4	39.93	32.73	18.0
Carbohydrate	27.73	30.10	27.82	7.6	33.28	29.98	21.9	26.02	22.91	12.0
Lipid	30.37	7.70	7.53	2.2	11.22	7.60	32.3	34.04	34.01	0.1
Ash	28.96	70.90			68.71			46.52		
% initial organics			76.32			83.40			89.65	

\*The organic fractions of the stored samples are given as percentages of the ash-free dry weight immediately after preservation. A: Immediately after preservation; B: after two months of storage; %: percentage loss after storage.

carbohydrates with the phenol sulphuric method by Dubois *et al.* (1956), modified by Malara and Charra (1972b); pre-treatment was as in Whyte (1987). Lipids were extracted following Bligh and Dyer (1959) and Chiaverini (1972) and measured with the colorimetric method of Pande *et al.* (1963).

Fatty acid concentrations were obtained by gas chromatography according to AOAC (1980), and amino acids with a Dionex DS-50 with lithium citrate buffers, following manufacturer's specifications.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Proximate composition

The higher inorganic contents were those of air- and freeze-dried algae. Fresh and frozen *Chaetoceros* samples were very similar in ash values, while in the case of *Phaeodactylum*, freezing increased the inorganic fraction by approximately 50% (Table 1).

This is in part due to the retention of different quantities of sea salt by the various samples. It also reflects the substantial loss of lipids evident in the air-

and freeze-dried algae, immediately after preservation. This increased the relative concentrations of the other two organic fractions, especially in the case of proteins.

Freezing did not alter the proximate composition and would also seem more efficient than either of the other two techniques when samples need to be stored for long periods of time. Two months of storage resulted in an approximately 20% loss of total organics in both types of dried samples, in slightly more than 10% for frozen *Phaeodactylum*, and in less than 5% for *Chaetoceros*. The relative concentrations of the three classes of organic constituents were practically unchanged.

The reason for the high percentages of lipids lost initially with both drying techniques is possibly due to the fact that diatoms store at least part of their lipids as oil droplets (Hendey, 1964; Raymont, 1980). These might be more volatile than other types of lipids, even at the low temperatures used in this work.

Bacterial degradation is the most probable explanation for the loss of other compounds during

Table 2. Amino acid composition of *Chaetoceros* sp. and of *Phaeodactylum tricornutum*\*

Amino acid	<i>Chaetoceros</i>				<i>Phaeodactylum</i>					
	A	B	C	D	A	B	E	F	G	H
Lysine†	5.6	5.9	6.4	5.3	5.4	5.4	5.8	5.1	2.37	
Histidine†	1.5	1.9	1.9	2.4	1.8	1.6	1.7	1.4		
Arginine†	5.7	7.6	6.5	6.8	6.8	5.9	6.9	9.6		2.17
Aspartic acid	11.8	11.6	10.0	8.3	10.5	10.5	9.0	10.8		
Threonine†	5.1	4.2	4.6	6.1	5.3	5.2	5.6	5.7	1.29	1.14
Serine	6.8	5.0	5.9	6.8	5.4	4.9	6.1	5.1		
Glutamic acid	12.4	15.3	10.8	9.7	13.8	13.4	11.7	13.4		
Proline	6.6	5.9	5.7	6.5	7.7	10.4	6.6	4.4		
Glycine	5.3	6.4	6.0	5.3	5.8	5.4	6.0	7.0		
Alanine	7.5	5.6	7.4	7.1	7.4	7.3	7.5	8.3		
Valine†	6.1	4.4	6.0	6.4	5.8	5.8	6.1	6.4	1.33	1.19
Methionine†	2.3	2.6	2.6	2.4	2.3	2.3	2.0	1.9	0.77	0.76
Isoleucine†	5.1	5.5	5.6	6.0	4.7	4.7	5.1	5.1	1.12	0.95
Leucine†	7.7	8.6	8.4	7.4	7.8	7.8	8.0	8.9	2.04	1.96
Tyrosine	4.5	3.4	4.6	5.6	3.7	3.7	4.3	3.2	0.92	1.09
Phenylalanine†	5.4	5.4	6.8	7.3	5.3	5.3	6.9	5.7	1.16	1.08

\*Values are reported as percentages of the total amino acid content.

†Essential amino acids for fish and shrimp.

A: Freeze dried; B: air-dried (this study); C and D: *Chaetoceros calcitrans* and *Ch. gracilis* respectively, both freeze dried (Brown, 1991); E: *Ph. tricornutum* freeze-dried (Brown, 1991); F: *Ph. tricornutum* freeze-dried (Pipilano *et al.*, 1981); G and H: percentages of essential dietary amino acids for fish and shrimp respectively, based on a 40% dietary protein level (Tacan, 1990).

Table 3. Composition and percentages of major fatty acids in the microalgae *Chaetoceros* sp. and *Phaeodactylum tricornutum* (concentrations in % of total fatty acids)

Fatty acid	<i>Chaetoceros</i>				<i>Phaeodactylum</i>			
	Freeze-dried		Air-dried		Freeze-dried		Air-dried	
	A	B	A	B	A	B	A	B
14:0	21.4	21.2	19.1	20.8	—	4.9	4.9	4.6
16:0	24.9	21.8	19.3	20.1	10.9	27.4	23.1	22.8
16:1	53.7	55.6	49.0	55.0	40.8	56.0	43.0	42.9
18:0	—	1.0	1.2	2.9	—	0.9	—	0.8
18:1	—	—	2.5	—	15.3	6.2	1.0	5.5
18:2	—	—	—	0.3	—	0.8	—	2.1
18:3	—	—	—	0.3	—	0.2	—	0.4
20:0	—	—	7.9	0.1	—	—	—	—
22:0	—	—	—	0.5	33.0	3.6	28.0	20.4
22:1	—	0.4	—	—	—	—	—	—
24:0	—	—	—	—	—	—	—	0.5
% Unsat.	53.7	56.0	51.5	55.6	56.1	63.2	44.0	50.9

A: Immediately after preservation; B: after two months of storage.

storage, since even when they are healthy, mass cultures contain fairly high bacterial densities. The fact that losses are generally lower in the frozen samples would seem to agree with this possibility, although normal oxidative processes would also have been slower at low temperatures and might have had the same final result.

*Amino acids*

The amino acid profiles of the two algae do not differ greatly (Table 2) and generally agree with those reported in the literature for the same or closely related species (Epifanio *et al.*, 1981; Brown, 1991). They are, in fact, remarkably similar to cell protein of algal origin, including green and blue-green algae (Becker, 1986).

As to the method of preservation, air- and freeze-drying gave approximately similar results. In a number of cases the results obtained with the two methods of preservation gave a difference higher than 10% which, although some authors do not agree (Soeder, 1981), is usually accepted as the limit of reproducibility of the analytical method. However, these variations are not consistent. The relative concentration

of one specific amino acid could increase with one method of preservation for one species, and decrease for the other species, as is the case of, e.g. arginine, proline and glutamic acid.

For this class of compounds, both algae are qualitatively as well as quantitatively adequate dietary sources for fish and shrimp. Irrespective of the method of preservation, they contain all the amino acids known to be essential for these organisms (Tacon, 1990). This needs to be emphasized especially for methionine: there seems to be a general agreement that algal single cell protein is a poor source of this amino acid (Schultz and Ostage, 1976; Soeder, 1981; Tacon, 1990). This is clearly not the case for *Chaetoceros* and *Phaeodactylum*, since their methionine content is more than three times higher than the optimum in fish and shrimp diets.

Cysteine was not measured in this work. Like tyrosine, this is considered a non-essential, rather than essential amino acid (Tacon, 1990) since it may be synthesized from methionine probably by demethylation as described by Hochberg and Rahat (1971) for the flagellate *Ochromonas*. Its presence in *Phaeodactylum* has been mentioned by Epifanio *et al.*

Table 4. Major fatty acids as percentages of total fatty acids in air-dried and freeze-dried *Chaetoceros* sp. and *Phaeodactylum tricornutum*: comparison with literature values

Fatty acid	<i>Chaetoceros</i>				<i>Phaeodactylum</i>				
	A	B	C	D	E	F	G		
	Air-dried	Freeze-dried			Air-dried	Freeze-dried			
14:0	19.1	21.4	27.0	10.9	14.9	4.9	—	14.3	12.9
16:0	19.3	24.9	16.5	29.0	22.9	23.1	10.9	22.6	29.3
16:1	49.0	53.7	47.5	43.2	36.8	43.0	40.8	41.3	35.8
17:1	—	—	—	—	—	—	—	9.0	—
18:0	1.2	0.0	1.2	5.1	4.0	—	—	7.4	3.9
18:1	2.5	0.0	4.6	6.6	12.7	1.0	15.3	—	12.9
18:2	—	—	2.5	3.1	6.3	—	—	0.3	5.3
18:3	—	—	0.6	1.0	1.4	—	—	—	—
20:0	7.9	—	—	0.4	0.3	—	—	9.8	—
20:5	—	—	—	—	—	—	—	16.9	—
22:0	—	—	—	0.7	0.8	28.0	33.0	—	—
22:1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
24:0	—	—	—	—	—	—	—	—	—

A: air- and freeze-dried *Chaetoceros* sp. (this study); B, C and D: freeze-dried *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros gracilis* 1 and *Chaetoceros gracilis* 2, respectively (Volkman *et al.*, 1989); E: *Phaeodactylum tricornutum* (this study); F: Epifanio *et al.* (1981); G: Arno *et al.* (1987).

(1981) and it is probably present in *Chaetoceros* as well, given the already mentioned general similarity of the amino acid profiles of many microalgae. Even its absence, however, would not cause a dietary deficiency, since it becomes limiting at concentrations well below those recorded for methionine from which, as mentioned, it may be synthesized.

#### Fatty acids

The fatty acid profiles (Table 3) refer to air- and freeze-dried algae, shortly after preservation and after two months of storage. The interspecific differences lie especially in the almost total lack of longer than 16 C chains for *Chaetoceros*, while 18 and especially 22 C chains represent more than 30% of the total fatty acids of *Phaeodactylum*.

With only one exception, the percentage of unsaturation is higher than 50%; among unsaturates, palmitoleic acid is the most abundant in all cases, oleic being the second most important in *Phaeodactylum*.

The method of drying seemed to be responsible for some differences in this general picture: freshly air-dried *Chaetoceros* had a higher than 10% content of 18 and 20 C acids, which were totally absent in the freeze-dried sample. In the case of *Phaeodactylum*, the percentage of total unsaturates in the freeze-dried sample was about 12% higher, in spite of its lower content of palmitic acid, due to the presence of high quantities of the C 18:1 oleic acid.

Storage resulted in a slight increase of unsaturates in all instances. This might be important, since in all cases part of this increase is due to the presence of 18:2 and 18:3 (linoleic and linolenic) acids. The second one is generally thought to be of high dietary value and the first may be desaturated and chain-elongated by many fish species to the even more important 20:4n6 arachidonic acid (Tacon, 1990).

All these results must be used with proper caution: first of all, the loss of lipids after freeze- and air-drying might have significantly altered the initial biochemical composition of both algae, modifying the final relative concentrations of the various fatty acids in different ways depending on the treatment, on specific differences of the reserve products and possibly, in the case of storage, on the nature of the remaining products.

As to the possible beneficial effects of storage, the deleterious effects of lipid auto-oxidation have been documented for a number of fish species (ADCP, 1983; Tacon, 1990). Thus, the effects of the presence of high unsaturates, which are more susceptible to this process, ought to be tested through bioassay with target organisms, before suggesting their use as diet, either alone or for the formulation of artificial animal feeds.

The data we obtained with our freshly preserved samples are compared (Table 4) to the few available in the literature, for the same or closely related species. These were recalculated from the original

data since their sum total did not add to 100%, either because they were given as percentages of total lipids or, in the case of Epifanio *et al.* (1981), because their profile contained two fatty acids which were not detected with our method. These have been included in the table but not used for the recalculation of relative concentrations. It is remarkable how most of the data are within or come close to the range of concentrations we found, for the major constituents, and how they vary widely in the minor ones. Whether these are real clonal or species differences, or if they are due to different culture conditions or simply to differences in sample treatment prior to determination is unknown; an explanation will have to wait until a determined effort is made in this direction, especially on the analytical and sample handling procedures, and on the type of compounds which are to be analysed.

#### CONCLUSION

Freezing would seem the most reliable technique for the preservation of microalgae, since it does not alter perceptibly their proximate composition even after a long period of storage. Both air- and freeze-drying result in the loss of a high percentage of lipids, which might be especially important given the high dietary value of some of its fatty acid constituents. Dried algae show a further loss of organics after two months of storage, possibly due to chemical oxidation or to bacterial activity.

The amino acid profiles of the two algae are similar. Both have all amino acids known to be essential for fish and shrimp and a higher than normal, for protein of algal origin, of the heat essential methionine. Short-chain fatty acids are dominant in the profiles of both algae. However, *Phaeodactylum tricornutum* has a higher content of C 18 and 20 than *Chaetoceros*.

Storage of dry algae slightly increases some of the essential unsaturated fatty acids. However, the possible improvement in dietary value should be confirmed through bioassays.

#### REFERENCES

- ADCP (1983) Fish feeds and feeding in developing countries—an interim report on the ADCP feed development programme. Rome, UNDP/FAO, ADCP/REP/83/18, 1-97.
- AOAC (1980) *Official Methods of Analysis*, 13th Edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Arai T., Kawaguchi A. and Yamada M. (1987) Positional distribution of fatty acids in lipids of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry* 26, 2573-2576.
- Becker E. (1986) Nutritional properties of microalgae: potentials and constraints. In *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture* (Edited by Richmond A.), pp. 339-419. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Digh E. and Dyet W. (1959) A rapid method of total lipid

- extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.
- Brown A. Jr (1972) Experimental techniques for preserving diatoms used as food for larval *Penaeus aztecus*. *Proc. Nat. Shellfish Ass.* **62**, 21-25.
- Brown M. (1991) The amino acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* **145**, 79-99.
- Chiaverini J. (1972) Techniques d'extraction et d'analyse des lipides. Université de Paris, Station Zoologique, Villefranche-Sur-Mer. *Notes de Travail* **12**, 1-12.
- Chu F., Webb K., Hepworth D. and Roberts M. (1982) The acceptability and digestibility of microcapsules by larvae of *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.* **2**, 29-34.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P. and Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.* **28**, 350-356.
- Epifanio C., Valenti C. and Turk C. (1981) A comparison of *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana* as foods for the oyster *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* **23**, 347-353.
- Farber J. (1986) Etudes biologiques, energetiques et biochimiques du krill antarctique *Euphasia superba* et *Thysanoessa macrura* recolté au Cours de la Campagne Fibex. Ph.D. Thesis, Université de Aix-Marseille II.
- Hendey N. (1964) An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. Part V: Bacillariophyceae (Diatoms). *Fish. Invest. Ser. IV*, 1-327.
- Hochberg A. and Rahat M. (1971) Ethionine and methionine metabolism by the chrysoomonad flagellate *Ochromonas danica*. *J. Protozool.* **18**, 487-490.
- Jones D., Munford J. and Gabbott P. (1974) Microcapsules as artificial food particles for aquatic filter feeders. *Nature* **247**, 233-235.
- Laing I., Child A. and Janke A. (1990) Nutritional value of dried algae diets for larvae of Manila clam (*Tapes philippinarum*). *J. mar. biol. Ass. U.K.* **70**, 1-12.
- Laing I. and Millican P. (1992) Indoor nursery cultivation of juvenile bivalve molluscs using diets of dried algae. *Aquaculture* **102**, 231-243.
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A. and Randall R. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Malara G. and Charra R. (1972a) Dosage des protéines particulières selon la méthode du Lowry. Université de Paris, Station Zoologique, Villefranche-Sur-Mer. *Notes de Travail* **5**, 1-11.
- Malara G. and Charra R. (1972b) Dosage des glucides particuliers du phytoplancton selon la méthode de Dubois. Université de Paris, Station Zoologique, Villefranche-Sur-Mer. *Notes de Travail* **6**, 1-12.
- Nell J. and O'Connor W. (1991) The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley) larvae. *Aquaculture* **99**, 277-284.
- Pande S., Khan R. and Venkatasubramanian T. (1963) Microdetermination of lipids and serum total fatty acid. *Analyt. Biochem.* **6**, 415-423.
- Raymont J. (1980) *Plankton and Productivity in the Oceans* Vol. 1, Phytoplankton, 2nd Edn, pp. 1-489. Pergamon Press, Oxford.
- Schultz E. and Oslage II. (1976) Composition and nutritive value of single cell protein (SCP). *Anim. Feed Sci. Tech.* **1**, 9-24.
- Soeder C. (1981) Chemical composition of microalgal biomass as compared to some other types of single cell protein (SCP). In *Wastewater for Aquaculture*. (Edited by Grobbelaar J., Soeder C. and Toerien D.), pp. 73-85. U.O.F.S. Publ., Series C. 3.
- Sommer T., Potts W. and Morrissy N. (1990) Recent progress in the use of processed microalgae in aquaculture. *Hydrobiologia* **204**, 435-443.
- Sorokin C. (1973) Dry weight, packed cell volume and optical density. In *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurement* (Edited by Stein J. R.), pp. 1-448. Cambridge University Press, Cambridge.
- Tacon A. (1990) *Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp*, pp. 1-117. Argent Laboratories Press, Redmond, Washington.
- Volkman J., Jeffrey S., Nichols P., Rogers G. and Garland C. (1989) Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* **128**, 219-240.
- Voltolina D., Trujillo M. d. L. and González M. I. (1991) *La Colección de Microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Comunicaciones Académicas. CIATC-9101.
- Whyte J. (1987) Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* **60**, 231-241.

JOURNAL OF THE  
**WORLD**  
AQUACULTURE  
SOCIETY

Craig S. Tucker,  
Managing Editor  
Delta Research and  
Extension Center  
P.O. Box 197  
Stoneville, MS 38776  
U.S.A.

Phone 601-686-9311  
Fax 601-686-2827

TO: Dr. Beatriz Cordero E.

FROM:

  
Craig S. Tucker, Editor

SUBJECT: Status of manuscript 93-MC-01

I received the final copy of your paper and it is accepted for publication. The next correspondence you will receive will be page proofs for review and correction. It is difficult to predict when you will receive proofs because there was a considerable backlog of papers submitted to the Journal when I inherited the editorship. I am working to eliminate the backlog and will make every effort to oversee timely publication of your paper. I am sorry about this delay and I hope you will bear with me until the Journal is back on schedule.

**Growth of Mytilus galloprovincialis Lmk. fed with four microalgae  
and two feeding regimes**

**Beatriz Cordero Esquivel and Domenico Voltolina Lobina**

**Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada  
(C.I.C.E.S.E.), Departamento de Acuicultura. Av. Espinoza No. 843. Apartado  
Postal 2732, Ensenada 22830, Baja California, México**

The culture of marine bivalve molluscs depends on the availability of large quantities of microalgae (De Pauw 1981; Webb and Chu 1982). This is especially true when conditioning adults for later induction of spawning, a common practice in many aquaculture facilities, which all employ luxury feeding of organisms being conditioned (Coeroli et al. 1984; Grant and Cranford 1989). When feeding a target organism, consideration is generally given only to the amount of feed supplied and to its intrinsic quality. However, the strategy of supply should also be considered, since different species may have different feeding behaviours involving, among others, presence or absence of diel cycles or diminished particle retention efficiency at high and/or low food concentration (Reid 1982). Even when the clearance rate remains constant, the microalgae may be used with different efficiency, due to production of pseudofaeces or to shortened gut retention times (Smaal 1991), which would result in an inefficient use of the available food. Therefore, given the high costs involved in mass microalgae production, the strategy of supplying food to adults is an important factor in determining the total production costs of a commercial hatchery.

Concerning the intrinsic quality of the food, different species or even different strains of the same species of microalgae may differ widely in their dietary value. The same microalga may be considered as an excellent or poor food source, depending on conditions under which it is being grown and, even when these are similar, on the organism to which it is fed. This led De Pauw and Persoone (1988) to the conclusion that there is no general criterion for choosing a microalgal diet.

In the present paper we evaluated the dietary value of four microalgae delivered continuously or in rations to juveniles of Mytilus galloprovincialis Lmk.

Microalgae used were local clonal isolates CH-X-1 (Chaetoceros sp.), IS-X-1 (Isochrysis sp.), PH-T-1 (Phaeodactylum tricornutum Bohlin) and TE-X-1 (Tetraselmis sp.) of CICESE's collection, grown in "f" medium (Guillard and Ryther 1962) in 15 l carboys. Volumes of the cultures equivalent to 50 (CH-X-1), 30 (IS-X-1), 75 (PH-T-1) and 30% (TE-X-1) of their total volume were harvested daily. This maintained the microalgae in near-exponential growth, since these dilution rates are close to the maximum values of the cell division rates reported for these clones (Trujillo-Valle 1993).

Lighting was continuous with two Cool White and two Daylight fluorescent tubes, giving an approximate light concentration of  $120 \mu\text{E} / \text{m}^2 / \text{s}$ . pH was maintained between 7.5 and 8.2 by unmetered, continuous  $\text{CO}_2$  injection.

Cell concentrations were checked daily by haemocytometer counts and total and organic dry weights were obtained filtering an appropriate volume of culture through a precalibrated Whatman GF/C glass fiber filter. The samples were dried in a convection oven at  $60^\circ\text{C}$  for 8 hours, weighed to the nearest 0.1 mg, ashed in a muffle furnace at  $490^\circ\text{C}$  for 12 hours and reweighed to obtain ash content. The organic dry weight was obtained by difference (Sorokin 1973).

The proximate composition of each species was obtained from experiments run in parallel (López-Elías and Voltolina 1993; González-Medina 1991): protein with the

method of Lowry et al. (1951), as modified by Farber (1986), carbohydrates according to Dubois et al. (1956), after the treatment detailed in Whyte (1987) and lipids with the colorimetric method of Pande et al. (1963) after extraction following Bligh and Dyer (1959).

Due to space constraints, the feeding experiment was run first with Chaetoceros and Isochrysis and repeated later for the two remaining species. Two lots of juvenile (20 to 30 mm in height) Mytilus galloprovincialis Lmk. were obtained from a local aquaculture farm and acclimated in the laboratory for two weeks, during which time they were fed ad libitum with a mixture in equal parts of the two microalgae to be used in the experiment. After this time, 12 groups of 15 organisms each were selected at random and distributed in an equal number of 15 l aquaria, after checking the homogeneity of their size distributions by analysis of variance, and starved for 48 hours, to avoid overestimation of the initial weight due to their gut contents.

For each of the two lots 15 organisms were sampled. The initial height was measured with a vernier calliper to the nearest 0.1 mm and the total and ash-free dry weights of the meat and the dry weight of the shell were obtained with the same gravimetric methods detailed earlier for microalgae, but drying for at least 12 hours or to constant weight.

The daily ration was determined previously with some mussels fed mornings and evenings, during several days, amounts of microalgae equivalent, on a dry weight basis, to daily totals of 4, 6 and 8% of the dry weight of the mussels ( half rations of

2, 3 and 4% in the mornings and in the evenings, respectively). The first ration was consumed within two-three hours and 8 % caused the production of pseudofaeces. Therefore the subsequent experiment was run with the 6% ration, in which no pseudofaeces were noted throughout the trial.

The mussels were fed for 31 days, with no adjustment of the ration for body growth. For each alga three aquaria received the given ration, divided into one morning and one evening aliquot. The other three groups of organisms were fed the same amount of that microalga, but supplied continuously during 24 hours with a peristaltic pump.

Experimental conditions were: temperature  $21 \pm 1$  °C, pH  $7.9 \pm 0.1$ , oxygen to 100 % saturation. The aquaria were cleaned daily and the water changed with the same frequency.

At the end of the experiment the mussels were again starved for 48 hours, and their final shell height, total and ash-free dry weights of the meat and dry weight of the shells were obtained as described previously.

The condition index was calculated with the equation  $(AFDW/DWS) \times 1000$ , where AFDW = Ash-free dry weight of the meat and DWS = dry weight of the shell (Lucas and Beninger 1985).

Food conversion ratios (FCR) were obtained following Sedgwick (1980) but using total and ash-free dry, rather than wet, weights of the meat, with the formula:  $FCR = \text{Total dry weight of food fed} / \text{tissue weight gained}$ .  $100/FCR$  gives the percentage of food converted into tissue (growth efficiency).

In all cases, height and weight increases of Mytilus galloprovincialis fed continuously with one microalga did not differ from those obtained with the same microalga administered in two daily rations (one-way ANOVA,  $\alpha = 0.05$ ). All the results obtained with each microalga were therefore pooled and compared to those of the other diets (Table 1).

Height increases ranged between 1.8 and 2.5 mm (both for Chaetoceros) and there was no difference between diets. However, all weight increases and the related body condition indices differed significantly. In all cases, Tetraselmis gave the poorest results, with some overlap with Isochrysis for shell dry weight and with Phaeodactylum for dry meat weight. Chaetoceros produced the best growth. Even if there was some overlap, it consistently outranked the remaining diets.

The final body condition index was low for Tetraselmis-fed M. galloprovincialis, the highest was with Chaetoceros and there was no significant difference when Phaeodactylum and Isochrysis were fed (Table 1).

The best food conversion ratios were again with Chaetoceros, since approximately 40 and 25 % of its biomass was converted by Mytilus galloprovincialis

into total and organic body dry weights respectively. The poorest ratio was with Tetraselmis and it was especially low in the case of conversion into organic dry weight, which was only about 6 % (Fig. 1).

There are few examples in the literature that describe the evaluation of food supply strategies for bivalves. Langton and McKay (1976) obtained higher growth rates for Crassostrea gigas juveniles fed discontinuously with a mixture of different microalgae, which they attributed to a higher amount of food ingested as well as to a better assimilation efficiency. In our experiments there was no difference due to feeding regime, possibly because the division in aliquots of the daily ration kept the initial cell concentrations within optimum values for assimilation. For many molluscs this is known to be dependent on particle concentration, being lower at high food densities (Widdows and Bayne 1971; Widdows 1978). However, for some species it is independent of food availability, as long as it remains within a range of optimal values, which depends on the species and on environmental conditions (Rico-Mora 1987; Del Rio-Portilla et al. 1992).

In the case of our experiment, particle concentration remained within this range, since we fed our organisms 50% more microalgae than would produce pseudofaeces, had they been supplied only in one ration, as has been shown for several other molluscan species (Tenore and Dunstan 1973; Foster-Smith 1975; Smaal 1991). We did not try to take advantage of the fact that Mytilus galloprovincialis, like Mytilus edulis, is a continuous feeder (Riisgard and Mohlenberg 1979) by feeding even higher rations on a continuous basis, which might have resulted in a better weight gain.

However, we obtained evidence with another mytilid (Modiolus capax Conrad) that, at equal rations, a continuous supply of food yields the same results as discontinuous feeding.

The data available on the average composition of the microalgae grown in our laboratory indicate that Tetraselmis and Isochrysis have the highest protein content and Tetraselmis the lowest lipids. Isochrysis has the lowest ash content and Chaetoceros the highest. The differences are not large (Table 2), but our results showed Chaetoceros as the best food, in spite of its high ash content.

The use of Isochrysis, considered an excellent food for many filter-feeders (Ewart and Epifanio 1981, Sukenik and Wahnou 1991), but which often has some technical problems in large-scale cultures (Coeroli et al. 1984), had no advantage over Phaeodactylum and it was a poorer food than Chaetoceros sp., both less demanding and easier to maintain in culture. It should be noted that Phaeodactylum is not generally considered as a good food source (Davis and Guillard 1958, Epifanio et al. 1981), although it has been used successfully for growing oyster larvae (Wilson 1978) and for feeding juveniles of some bivalves (Foster-Smith 1975).

Tetraselmis is a species with high quality since the ratio of protein content/cell volume is high compared to that of many other species used in aquaculture. However, its value as food is low, possibly because of the presence of a rigid cell wall which might make it difficult to digest (Brown et al. 1989). In fact Rico-Mora (1987), in feeding experiments with the mytilid Modiolus capax, obtained assimilation efficiencies as

low as 50 % for this microalga.

### Literature Cited

- Bligh, E. and W. Dyer.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37:911-917.
- Brown, M. R., S. W. Jeffrey and C. D. Garland.** 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature review. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Marine Laboratories. Report 205:1-44.
- Coeroli, M., D. De Gaillard and J. P. Landret.** 1984. Recent innovations in cultivation of molluscs in French Polynesia. Aquaculture 39:45-67.
- Davis, H. C. and R. R. Guillard.** 1958. Relative value of ten genera of micro-organisms as food for oyster and clam larvae. United States. Fishery and Wildlife Service, Fishery Bulletin 136, 58:293-304.
- Del Río-Portilla, M. A., A. D. Re-Araujo and D. Voltolina.** 1992. Growth of the pearl oyster Pteria sterna under different thermic and feeding conditions. Marine Ecology Progress Series 89:221-227.

- De Pauw, N. 1981. Use and production of microalgae as food for nursery bivalves. Proceedings of the International Workshop on Nursery Culturing of Bivalve Molluscs. Ghent, Belgium. Special Publication of the European Mariculture Society 7:35-69.
- De Pauw, N. and G. Persoone. 1988. Micro-algae for aquaculture. Pages 197-221 in M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka, editors. Micro-Algal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- Dubois, M., K. Gilles, J. Hamilton., P. Rebers. and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28:350-356.
- Epifanio, C., C. Valenti. and C. Turk. 1981. A comparison of Phaeodactylum tricornutum and Thalassiosira pseudonana as foods for the oyster Crassostrea virginica. Aquaculture 23:347-353.
- Ewart, J. W. and C. E. Epifanio. 1981. A tropical flagellate food for larval and juvenile oysters, Crassostrea virginica Gmelin. Aquaculture 22:297-300.
- Farber, L. J. 1986. Etudes biologiques, energetiques et biochimiques du krill antarctique Euphasia superba et Thysanoessa macrura recolte au cours de la Campagne Fibex. Ph.D. thesis, Université de Aix-Marseille II, Marseille, France.

- Foster-Smith, R. L.** 1975. The effect of concentration of suspension on the filtration rates and pseudofaecal production for Mytilus edulis L., Cerastoderma edule (L.) and Venerupis pullastra (Montagu). *Journal of experimental Biology and Ecology* 17:1-22.
- González-Medina, S.** 1991. Determinación de la tasa de dilución óptima y del contenido protéico de tres especies de microalgas cultivadas en un sistema semicontinuo. B. Sc. thesis. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Mexico.
- Grant, J. and P. J. Cranford.** 1989. The effect of laboratory diet conditioning on tissue and gonad growth in the sea scallop Placopecten magellanicus. Pages 95-105 in J. S. Ryland and P. A. Tyler, editors. *Reproduction genetics and distributions of marine organisms*. 23rd European Marine Biology Symposium, Olsen and Olsen, Fredensborg, Denmark.
- Guillard, R. R. L. and J. H. Rhyter.** 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. Cyclotella nana Hustedt and Detonula confervacea (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8:229-239.
- Langton, R. W. and G. U. McKay.** 1976. Growth of Crassostrea gigas (Thunberg) spat under different feeding regimes in a hatchery. *Aquaculture* 7:225-233.

- López-Elías, J. A. and D. Voltolina.** 1993. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas*, Mexico 19,169-180.
- Lowry, O., N. Rosebrough., A. Farr. and R. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
- Lucas, A. and P. G. Beninger.** 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* 44:187-200.
- Pande, S., R. Khan. and T. Venkitasubramanian.** 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acid. *Analytical Biochemistry* 6:415-423.
- Reid, R. G. B.** 1982. Aspects of bivalve feeding and digestion relevant to aquaculture nutrition. Pages 231-251 in G. D. Pruder, C. J. Langdon and D. E. Conklin, editors. *Proceedings of the second international conference on aquaculture nutrition: Biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition*. Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana. USA.
- Rico-Mora, R.** 1987. Efecto interactivo de la temperatura y de la concentración de microalgas en la fisiología alimenticia y la energía potencial para el crecimiento de Modiolus capax (Conrad) (Bivalvia:Mytilidae). M. Sc. thesis. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, Mexico.

- Riisgard, H. U. and F. Mohlenberg.** 1979. An improved recording apparatus for determining the filtration rate of Mytilus edulis as a function of size and algal concentration. *Marine Biology* 52:61-67.
- Sedgwick, R. W.** 1980. The requirements of Penaeus merguensis for vitamin and mineral supplements in diets based on freeze-dried Mytilus edulis meal. *Aquaculture* 19:127-137.
- Smaal, A. C.** 1991. The ecology and cultivation of mussels: new advances. *Aquaculture* 94:245-261.
- Sorokin, C.** 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. Pages 321-343 in J.R. Stein, editor. *Handbook of phycolgical methods. Culture methods and growth measurements.* Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- Sukenik, A. and R. Wahnnon.** 1991 Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. Isochrysis galbana. *Aquaculture* 97:61-72.
- Tenore, K. R. and W. M. Dunstan.** 1973. Comparison of feeding and biodeposition of three bivalves at different food levels. *Marine Biology* 21:190-195.
- Trujillo-Valle, M. L.** 1993. La colección de microalgas del CICESE. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, Mexico. Comunicaciones Académicas CIACT 9301 .

- Webb, K. L. and F. L. E. Chu.** 1982. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. Pages 272-291 in G. D. Pruder, C. J. Langdon and D. E. Conklin editors. Proc. 2nd International Conference on Aquaculture Nutrition. Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Whyte, J.** 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60:231-241.
- Widdows, J. and B. L. Bayne.** 1971. Temperature acclimation of Mytilus edulis L. with reference to its energy budget. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 51:109-124.
- Widdows, J.** 1978. Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of Mytilus edulis. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 58:109-124.
- Wilson, J. E.** 1978. The food value of Phaeodactylum tricornutum Bohlin to the larvae of Ostrea edulis L. and Crassostrea gigas Thunberg. *Aquaculture* 13:313-323.

Table 1. Mean increases (in parenthesis standard error) in shell height, in total and organic meat dry weight and in shell weight and final condition index of *Mytilus galloprovincialis*, when fed four different species of algae under two feeding regimes for 31 days. The results of the comparisons for each type of increment (one way analysis of variance and LSD test:  $\alpha = 0.05$ ) are indicated for each column. Equal letters indicate lack of significant difference (example: a, ab, bc indicate that a is significantly smaller than bc and that there is no difference between a and ab nor between ab and bc).

Microalga	Initial height (mm)	Height increase (mm)	Weight increases (mg)			Condition Index %
			meat total	meat organic	shell total	
<i>Chaetoceros</i> (C)	25.6 (0.24)	2.45 (0.25)	46.59 (2.91)	29.94 (1.96)	242.02 (20.65)	93.76 (1.58)
<i>Chaetoceros</i> (R)	26.0 (0.24)	1.81 (0.22)	38.80 (2.68)	25.67 (1.71)	203.48 (16.37)	93.19 (2.28)
<i>Chaetoceros</i> (X)	25.7 (0.17)	2.06 (0.17)	42.70 (2.00)	27.80 (1.30)	222.75 (13.20)	93.48 (1.38)
		a	c	c	b	c
<i>Isochrysis</i> (C)	25.9 (0.31)	2.10 (0.31)	35.70 (3.21)	21.71 (1.91)	223.48 (23.56)	84.94 (1.82)
<i>Isochrysis</i> (R)	25.8 (0.26)	1.94 (0.27)	36.11 (3.06)	21.00 (1.91)	192.59 (19.72)	87.00 (1.83)
<i>Isochrysis</i> (X)	25.9 (0.20)	2.03 (0.20)	35.90 (2.20)	21.36 (1.31)	208.04 (15.36)	85.97 (1.29)
		a	bc	b	ab	b
<i>Phaeodactylum</i> (C)	25.6 (0.24)	2.40 (0.28)	35.38 (3.74)	25.50 (2.68)	268.17 (21.76)	81.12 (2.71)
<i>Phaeodactylum</i> (R)	25.0 (0.24)	2.00 (0.24)	22.95 (4.67)	19.51 (2.44)	191.11 (17.71)	82.06 (3.25)
<i>Phaeodactylum</i> (X)	25.3 (0.17)	2.2 (0.18)	29.16 (3.00)	22.50 (1.81)	229.64 (14.51)	81.59 (2.10)
		a	ab	bc	b	b
<i>Tetraselmis</i> (C)	24.5 (0.34)	2.00 (0.34)	24.32 (4.87)	10.48 (2.25)	145.01 (23.53)	72.88 (2.01)
<i>Tetraselmis</i> (R)	24.3 (0.35)	2.08 (0.32)	26.24 (3.83)	13.72 (2.65)	164.31 (26.65)	75.99 (2.19)
<i>Tetraselmis</i> (X)	24.4 (0.24)	2.04 (0.23)	25.28 (3.10)	12.10 (1.72)	154.66 (17.70)	74.43 (1.50)
		a	a	a	a	a

C = continuous feeding; R = feeding in two daily aliquots; X = mean of C and R.

Table 2. Average composition of the four microalgae used in the feeding experiment of Mytilus galloprovincialis. The organic fractions have been recalculated as mean % of the total organic contents, from López-Elías and Voltolina (1993) and from González-Medina (1991).

	<u>Chaetoceros</u>	<u>Isochrysis</u>	<u>Phaeodactylum</u>	<u>Tetraselmis</u>
PROTEIN	60.3	65.4	59.1	68.9
CARBOHYDRATES	16.0	12.3	16.7	14.0
LIPIDS	23.7	22.3	24.2	17.1
ASH	18.6	7.2	16.8	17.1

Figure 1. Food conversion ratios (dry weight of food/dry meat increase) of Mytilus galloprovincialis fed four different species of algae. Ch = Chaetoceros sp.; I = Isochrysis sp.; Ph = Phaeodactylum tricornutum; T = Tetraselmis sp. White columns: gross conversion (total dry weight of food/total dry meat increase); Shaded columns: net conversion (total dry weight of food/ash-free dry meat increase). Lower values indicate higher food conversion efficiency.

