

TESIS DEFENDIDA POR
Claudia María Miranda Saucedo
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Director del Comité

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga
Partida
Miembro del Comité

Dr. Manuel Alberto Segovia
Quintero
Miembro del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

*Coordinador del programa de
posgrado en Ciencias en
Acuicultura*

**Dr. David Hilario
Covarrubias Rosales**
**Director de Estudios de
Posgrado**

15 de Septiembre del 2011

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



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ACUICULTURA**

CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE POSLARVAS DE ABULÓN (*Haliotis rufescens*) ALIMENTADAS CON DIETAS MONOESPECÍFICAS DE DIATOMEAS BENTÓNICAS CONSERVADAS EN FRÍO

PROYECTO DE TESIS

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

Presenta:

CLAUDIA MARIA MIRANDA SAUCEDO

Ensenada, Baja California, México, Septiembre 2011.

RESUMEN de la tesis de **Claudia María Miranda Saucedo**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Acuicultura. Ensenada, Baja California. Septiembre 2011.

CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE POSLARVAS DE ABULÓN (*Haliotis rufescens*) ALIMENTADAS CON DIETAS MONOESPECÍFICAS DE DIATOMEAS BENTÓNICAS CONSERVADAS EN FRÍO

Resumen aprobado por:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Director de Tesis

Durante la producción comercial de cultivos de abulón uno de los factores importantes es lograr un suministro adecuado de alimento para obtener altas tasas de crecimiento y altos porcentajes de supervivencia. El objetivo de éste trabajo fue evaluar el crecimiento y la supervivencia de poslarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) alimentadas con dietas de diatomeas bentónicas conservadas en frío (4 °C). Para este proyecto se utilizaron siete especies de diatomeas bentónicas (*Nitzschia thermalis* var. *minor*, dos diferentes cepas de *Nitzschia laevis* (cepa A y B), *Nitzschia* cf. *fonticola* var. *pelagica*, *Nitzschia frustulum* var. *perminuta*, *Navicula incerta* y *Navicula byscanterae*), aisladas de las costas del Pacífico de México. Se mantuvieron cultivos monoespecíficos, no axénicos y por triplicado en recipientes plásticos de 20 l con 16 l de medio "f" a 20 ± 1 °C y con iluminación continua de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para cada especie de diatomeas se obtuvo la biomasa total de los cultivos y fue almacenada en alícuotas en oscuridad y con refrigeración por un periodo de ocho semanas. Se encontró que las siete especies de diatomeas tienen viabilidad para el crecimiento después de ocho semanas de almacenamiento en frío. Se evaluaron diferencias significativas en la densidad celular y la tasa de crecimiento de las siete especies de diatomeas durante el periodo de almacenamiento en frío. La composición proximal y el contenido de pigmentos aumentan a partir de la semana cinco de almacenamiento en frío y se evaluó mayor cantidad de carbohidratos.

Cuando se mantuvieron poslarvas de abulón rojo alimentadas con diatomeas frescas (sin preservar) y conservadas en frío de las especies *N. thermalis*, *N. byscanterae*, *N. frustulum*, *N. fonticola* y *N. incerta*, se obtuvieron significativamente mayores longitudes de las poslarvas con diatomeas conservadas en frío. La mayor tasa de crecimiento de las poslarvas ($63.1 \mu\text{m d}^{-1}$) fue obtenida al utilizar como alimento la diatomea *N. incerta* conservada en frío. Se encontraron diferencias significativas en la supervivencia de las poslarvas alimentadas con diatomeas frescas y diatomeas conservadas en frío. Se encontró mayor supervivencia en las poslarvas alimentadas con diatomeas frescas.

Este trabajo muestra que pueden ser almacenadas en frío siete especies de diatomeas bentónicas por al menos ocho semanas y que mantienen su viabilidad para el crecimiento y sin grandes cambios en su composición bioquímica. Las

diatomeas preservadas en frío proporcionan los nutrientes necesarios para obtener altas tasas de crecimiento de poslarvas de abulón rojo.

Palabras claves: Preservación en frío, diatomeas bentónicas, viabilidad, composición proximal, *Haliotis rufescens*.

ABSTRACT of the thesis presented by **Claudia María Miranda Saucedo** as a partial requirement to obtain the **MASTER OF SCIENCE** degree in **AQUACULTURE**. Ensenada, Baja California, September, 2011.

**GROWTH AND SURVIVAL OF ABALONE POSTLARVAE (*Haliotis rufescens*)
FED WITH REGIMES OF BENTHIC DIATOMS IN COLD STORAGE**

During the commercial production of abalone, food supply is an important factor to obtain high growth and survival rate. The objective of this study was measured the growth and survival of red abalone postlarvae (*Haliotis rufescens*) fed with benthic diatoms maintained in cold storage (4 °C). For this study seven species of benthic diatoms (*Nitzschia thermalis* var. *minor*), to different strains of *Nitzschia laevis* (strain A and B), *Nitzschia* cf. *fonticola* var. *pelagica*, *Nitzschia frustulum* var. *perminuta*, *Navicula incerta* y *Navicula byscanterae*), isolated from the Pacific coast of México were used. Monospecific non-axenic diatoms were cultured in triplicate in 20 l plastic containers with 16 l of medium “f” at 20 °C ± 1 and 100 µE m² s⁻¹. For each diatoms strain the total algal biomass was collected and stored in dark conditions and refrigerated for eight weeks. All seven benthic diatoms species placed for eight weeks showed viability and growth after eight week in cold storage. Significant differences in cell density and growth rate were detected among all seven diatom species in cold storage. A higher carbohydrate and pigment content was detected after five weeks in cold storage.

Abalone postlarvae fed with cold storage strains of *N. thermalis*, *N. byscanterae*, *N. frustulum*, *N. fonticola* y *N. incerta* showed significant difference in growth rate than those fed with fresh benthic diatoms (without preservation). Postlarvae fed with cold stored *N. incerta* showed the higher growth (63.1 µm d⁻¹), and postlarvae fed with fresh cultured diatoms showed a higher survival rate.

This study showed that all seven species of benthic diatoms preserved in cold storage for at least eight weeks, maintained their viability, growth rate and biochemical composition without significant changes. The benthic diatoms placed in cold storage can supply all nutrient requirements to obtained a high growth rate in abalone poslarvae.

Keywords: Cold storage, benthic diatoms, viability, biochemical composition, *Haliotis rufescens*.

DEDICO ESTE TRABAJO CON PROFUNDO AMOR Y CARIÑO:

A LA MEMORIA DE MIS PAPÁS JOSÉ SAUCEDO RODRIGUEZ Y
MARTHA ESPINOZA SAINZ, SIEMPRE ESTAN EN MIS
RECUERDOS Y EN EL CORAZÓN

A MI MAMÁ LUZ MARIA SAUCEDO Y GERMAN ARCE

A MIS HERMANOS TERE, MIRIAM Y GERMAN

A MARCO Y NUESTRO ANGELITO

A TODA MI FAMILIA

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y en particular al Departamento de Acuicultura por el apoyo brindado para la realización de mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el periodo de estudios.

Al apoyo económico para la realización de esta tesis a través del proyecto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACyT proyecto 130074).

A Dios por sus bendiciones y por haberme dado la fuerza para finalizar una importante etapa en mi vida llena de satisfacciones y hermosas sorpresas.

Mi eterno agradecimiento y admiración a mi Directora de Tesis Dra. Pilar Sánchez por compartir sus conocimientos, su cariño, apoyo y sobre todo dedicación en la dirección de esta tesis, esto sólo por mencionar algo de lo mucho que tengo que agradecerle. Mil Gracias Pily!!

A los miembros del comité de tesis: Dr. Manuel Alberto Segovia Quinteto, Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez y Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida quienes con sus acertadas observaciones y contribuciones ayudaron a la mejora de este trabajo.

A la empresa Abulones Cultivados, S. DE R. L. DE C.V. en especial al Director General J. Benito Altamira R. y al Gerente de Producción Ocean. Noé García Cruz por la donación de poslarvas de abulón para la realización de este trabajo.

A la empresa Productores Marinos Baja en especial al Ocean. Enrique Vázquez Moreno por la donación de poslarvas de abulón para la realización de este trabajo.

Al Dr. Benjamín Barón por facilitarme el uso de su Microscopio Estereoscópico para la toma de imágenes de las poslarvas de abulón.

A la Dra. Carmen Paniagua por permitirme usar dentro de su laboratorio el Microscopio con epifluorescencia para la toma de imágenes de diatomeas.

Mi más sincero agradecimiento al Biólogo Norberto Flores por compartir sus experiencias y por el apoyo brindado durante todo este tiempo.

A los técnicos del sistema de abastecimiento de agua marina José G. Espinoza Ibarra, Luis A. Murillo Valenzuela, Norberto Flores, Adrián Celaya B.

A la Secretaria Cecilia Quiñones Loera por su ayuda y estar disponible en todo momento.

Otra de las razones por las que agradezco a Dios es por haber conocido a mis Amiguinas Lilian y Ceres (mi parte del trio dinámico) personitas que aprecio mucho y espero que estos dos años se multipliquen por muchos más de sincera amistad. Esto también va para ti mi petrush (Jenniffer).

A mis compañeros de Maestría Ananda, Fernando, Tzitziki, Yosef y Sergio por los buenos momentos y esas reuniones siempre para comer.

A mis compañeros de laboratorio: Ceres, Estrella, Lilian, Soco, Flor, Fernando, Luis, Marytza, Kenia, Martín, Anita, Gracias por hacer más amenas las horas de laboratorio.

A los chicos de servicio social Noemí, Angyell maza, Ricardo Hoffmann, Paúl, Fernando Márquez por su gran ayuda para llevar a cabo la experimentación de este trabajo. A Enrique Loyola por ayudarme en la realización de los análisis bioquímicos.

A la Dra. Pilar, Martin Pérez, Paúl, Luis Márquez, Marco Anzuetto especial agradecimiento por ayudarme a colocar las poslarvas en las unidades experimentales.

A Marco por su apoyo, cariño y compartir conmigo el regalo más bonito del mundo.

De nuevo a mi familia por apoyarme en todo momento, a mi papá hasta el cielo le agradezco infinitamente porque gracias a su apoyo incondicional en toda mi vida pude dar un paso más en mis estudios. A mi mamá, a mis hermanos, a todos los tíos y primos gracias por su cariño, los quiero mucho y a pesar de la distancia siempre están en mis pensamientos.

Finalmente mi reconocimiento a todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	Página
Resumen español	i
Resumen inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Contenido	vii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tablas	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Antecedentes	5
II. OBJETIVOS	10
II.1 Objetivo general	10
II.2 Objetivos específicos	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS	11
III.1 Características de las diatomeas	11
III.2 Cultivo de diatomeas para producción de biomasa	11
III.3 Conservación en frío de la biomasa de diatomeas	15
III.3.1 Ensayos de viabilidad de diatomeas conservadas en frío	15
III.3.2 Análisis proximales	16
III.3.2.1 Peso seco y contenido de cenizas	16
III.3.2.2 Proteínas	17
III.3.2.3 Carbohidratos	17
III.3.2.4 Lípidos	17
III.3.2.5 Pigmentos	17
III.3.3 Inóculo de bacterias	18
III.3.4 Bioensayo de alimentación de poslarvas de abulón rojo con diatomeas preservadas	18

CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

	Página
III.3.4.1 Dietas monoespecíficas de diatomeas bentónicas	21
III.3.6 Análisis de resultados	23
IV. RESULTADOS	25
IV.1. Ensayo de viabilidad de diatomeas conservadas en frío	25
IV.1.1 Densidad celular de diatomeas bentónicas	25
IV.1.2 Tasa de crecimiento específica	28
IV.1.3 Medición de diatomeas conservadas en frío	30
IV.2.1 Pigmentos	31
IV.3.1 Análisis proximales de microalgas conservadas en frío	34
IV.3.2 Peso seco orgánico	37
IV.4. Bioensayo de alimentación de poslarvas de abulón rojo con diatomeas frescas y conservadas en frío	39
IV.4.1 Longitud de poslarvas	39
IV.4.2 Tasa de crecimiento	43
IV.4.3 Tasa de supervivencia	47
V. DISCUSIÓN	49
V.1 Viabilidad de diatomeas conservadas en frío	49
V.2 Análisis proximales	54
V.3 Crecimiento y supervivencia de poslarvas de abulón <i>H.</i> <i>rufescens</i>	56
VI. CONCLUSIONES	60
VII. RECOMENDACIONES	61
VIII. LITERATURA CITADA	62

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Secuencia de producción de cultivos en volúmenes progresivamente mayor para siete especies de diatomeas bentónicas. A: Erlenmeyer con 100 ml. B: Erlenmeyer con 700 ml. C: Cubetas con 16 L.	14
2. Diagramatización esquemática de la disposición de las unidades experimentales utilizadas en el bioensayo de alimentación con poslarvas de abulón rojo alimentadas con cinco especies de diatomeas preservadas y sin preservar.	20
3. Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (cél ml ⁻¹) en las especies A) <i>Nitzschia laevis</i> (cepa A); B) <i>Nitzschia laevis</i> (cepa B); C) <i>Nitzschia thermalis</i> var. <i>minor</i> ; D) <i>Navicula biskanterae</i> ; E) <i>Nitzschia frustulum</i> ; F) <i>Nitzschia</i> cf. <i>fonticola</i> ; G) <i>Navicula incerta</i> , durante ocho semanas de almacenamiento en frío Anova de una vía y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; a>b>c>d.	27
4. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento específica (μ) en las especies A) <i>Nitzschia laevis</i> (cepa A); B) <i>Nitzschia laevis</i> (cepa B); C) <i>Nitzschia thermalis</i> var. <i>minor</i> ; D) <i>Navicula biskanterae</i> ; E) <i>Nitzschia frustulum</i> ; F) <i>Nitzschia</i> cf. <i>fonticola</i> ; G) <i>Navicula incerta</i> , durante ocho semanas de almacenamiento en frío. Anova de una vía y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; a>b>c>d.	29
5. Valores promedio y desviación estándar de la concentración de clorofila a (■) y carotenos (■) en las especies A) <i>Nitzschia laevis</i> (cepa A); B) <i>Nitzschia laevis</i> (cepa B); C) <i>Nitzschia thermalis</i> var. <i>minor</i> ; D) <i>Navicula biskanterae</i> ; E) <i>Nitzschia frustulum</i> ; F) <i>Nitzschia</i> cf. <i>fonticola</i> ; G) <i>Navicula incerta</i> , durante ocho semanas de almacenamiento en frío. Letras minúsculas-mayúsculas y números diferentes indican diferencias significativas para proteínas, carbohidratos y lípidos. Anova de una vía y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; a>b>c>d; A>B>C>D.	33

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACION)

6. Composición proximal de (■) proteínas, (▒) carbohidratos y (▓) lípidos, en las especies A) *Nitzschia laevis* (cepa A); B) *Nitzschia laevis* (cepa B); C) *Nitzschia thermalis* var. *minor*; D) *Navicula biskanterae*; E) *Nitzschia frustulum*; F) *Nitzschia* cf. *fonticola*; G) *Navicula incerta*, durante ocho semanas de almacenamiento en frío. Letras minúsculas-mayúsculas y números diferentes indican diferencias significativas para proteínas, carbohidratos y lípidos. Anova de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$; $A>B>C>D$ y $1>2>3$. 36
7. Valores promedio y desviación estándar del peso seco orgánico ($\mu\text{g m}^{-1}$) en las especies A) *Nitzschia laevis* (cepa A); B) *Nitzschia laevis* (cepa B); C) *Nitzschia thermalis* var. *minor*; D) *Navicula biskanterae*; E) *Nitzschia frustulum*; F) *Nitzschia* cf. *fonticola*; G) *Navicula incerta*, durante ocho semanas de almacenamiento en frío. Anova de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c$. 38
8. Valores promedio y desviación estándar de la longitud (μm) de poslarvas alimentadas con diatomeas frescas (●) y almacenadas en frío (○) en las especies A) *Nitzschia thermalis* var. *minor*; B) *Navicula biskanterae*; C) *Nitzschia frustulum*; D) *Nitzschia* cf. *fonticola*; E) *Navicula incerta*, durante ocho semanas de almacenamiento en frío. Letras minúsculas indican diferencias significativas para longitud con respecto al tiempo y letras mayúsculas indican diferencias por tratamiento de almacenamiento. Anova de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$; $A>B$. 42
9. Valores promedio y desviación estándar de la Tasa de crecimiento ($\mu\text{m d}^{-1}$) de poslarvas alimentadas con diatomeas frescas (●) y almacenadas en frío (○) en las especies A) *Nitzschia thermalis* var. *minor*; B) *Navicula biskanterae*; C) *Nitzschia frustulum*; D) *Nitzschia* cf. *fonticola*; E) *Navicula incerta*, durante ocho semanas de almacenamiento en frío. Letras minúsculas indican diferencias significativas para longitud con respecto al tiempo y letras mayúsculas indican diferencias por tratamiento de almacenamiento. Anova de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$; $A>B$. 45

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACION)

- 10** Valores promedio y desviación estándar de la supervivencia de poslarvas alimentadas con diatomeas frescas (●) y conservadas en frío (○) en las especies A) *Nitzschia thermalis* var. *minor*; B) *Navicula biskanterae*; C) *Nitzschia frustulum*; D) *Nitzschia* cf. *fonticola*; E) *Navicula incerta*, durante 8 semanas de almacenamiento en frío. Letras minúsculas indican diferencias significativas para longitud con respecto al tiempo y letras mayúsculas indican diferencias por tratamiento de almacenamiento. Anova de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$; $A>B$. 48

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Ración y frecuencia de alimentación para poslarvas y juveniles tempranos de <i>H. rufescens</i> propuesta por Miranda-Saucedo (2009).	22
II	Mediciones promedio (μm) y desviación estándar del tamaño de las células de las 7 especies de diatomeas bentónicas conservadas en frío durante 8 semanas, se indica el valor inicial (semana 0) y final (semana 8). Anova de una vía y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b$.	30
III	Longitud inicial (L_i), longitud final (L_f) (μm) y tasa de crecimiento (TC, $\mu\text{m d}^{-1}$) de poslarvas alimentadas durante 28 días con cinco especies de diatomeas frescas y conservadas en frío.	46

Capítulo I

Introducción

Los abulones (*Haliotis* spp.) son organismos herbívoros que habitan en cuevas, grietas o refugios entre rocas donde pueden encontrar protección contra los depredadores (Hahn, 1989). Sus poblaciones se distribuyen en agregaciones las cuales están relacionadas a la heterogeneidad de sustratos y a la discontinuidad de los mantos de macroalgas, así como la capacidad de dispersión de las larvas (León-Carballo y Muciño-Díaz, 1996).

Los abulones son gasterópodos, dioicos que producen gran cantidad de gametos durante el desove (de 0.5 a 3 millones por hembra), sin embargo, sólo una pequeña cantidad de éstos llegarán a ser abulones adultos (Hahn, 1989). La fecundación en el abulón es externa y después de 4 a 15 días la larva veliger tiene metamorfosis e inicia la exploración del fondo marino. Después de la metamorfosis inician su vida bentónica como poslarva. El periodo de poslarva continúa hasta la formación del primer poro respiratorio, que ocurre entre uno y tres meses de edad, dependiendo de las condiciones ambientales y la alimentación, lo que marca el inicio del estadio juvenil. En condiciones de cultivo, los organismos que logran llegar a esta etapa (aproximadamente del 10 – 20% de las poslarvas iniciales), alcanzan supervivencias entre el 90 – 99% (Ebert y Houk, 1984; Hahn, 1989; Leighton, 2000).

En la península de Baja California, México la pesquería del abulón es una de las más importantes y en esta región habitan de forma natural las especies de abulón *H. corrugata* (abulón amarillo), *H. rufescens* (abulón rojo), *H. fulgens* (abulón azul), *H. sorenseni* (abulón chino) y *H. cracherodii* (abulón negro). La distribución de estas especies está comprendida desde la frontera sur de Estados Unidos de

América hasta el Estero el Conejo en Baja California Sur, México (Pérez-Muñoz, 1995; Ponce-Díaz *et al.*, 2000).

El cultivo de este molusco en nuestro país ha alcanzado su mayor desarrollo en los últimos 16 años, contando con el apoyo académico de la Universidad Autónoma de Baja California (U.A.B.C.) y otras instituciones, así como de cooperativas pesqueras y del sector privado (Salas-Garza y Searcy-Bernal, 1992). En 1984, se inició en México la operación de dos laboratorios para la producción de semilla destinada al repoblamiento situadas en el ejido Eréndira, Baja California (B.C.) y en Bahía Tortugas, Baja California Sur (B.C.S.). A partir de 1985, el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (I.I.O-UABC.) inició estudios para mejorar las técnicas de cultivo en laboratorio y campo (Martínez-Ponce y Searcy-Bernal *et al.*, 1998). A raíz de dichos estudios se desarrolló un experimento de escala piloto-comercial en la Isla de Todos Santos, B.C., que dio lugar en 1993 al primer proyecto a nivel comercial con la formación de la empresa Abulones Cultivados S. de R.L. de C.V., que actualmente desarrolla todas las fases de producción en el cultivo de abulón rojo en el ejido Eréndira (Pérez-Muñoz, 1995).

En el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), se iniciaron los primeros estudios para relacionar la composición proximal de distintas especies de diatomeas bentónicas aisladas de Baja California y la tasa de crecimiento y supervivencia de poslarvas de abulón (Correa-Reyes *et al.*, 2001; Simental-Trinidad *et al.*, 2001; Carbajal-Miranda *et al.*, 2005; Correa-Reyes *et al.*, 2009).

Dentro de las técnicas de cultivo, la producción de poslarvas y juveniles es fundamental, por lo que los factores que influyen en la mortalidad y crecimiento en esta etapa deben ser claramente entendidos (Hahn, 1989). La producción de juveniles de abulón inicia con la inducción al desove utilizando métodos químicos y físicos, y con el cultivo de larvas (4 a 7 días) en flujo continuo o con recambios de agua. El periodo larval dura aproximadamente una semana y no se requiere

proporcionar alimento ya que las larvas son lecitotróficas. Estas son inducidas a la metamorfosis en estanques con superficies colonizadas por diatomeas o bien con ácido gamma-aminobutírico (GABA). Durante la metamorfosis las larvas pierden el velum, secretan una nueva concha peristomal y desarrollan el sistema digestivo para permitir la alimentación exógena a base de bacterias, diatomeas y otros microorganismos (Hahn, 1989; Salas-Garza *et al.*, 1992; Kawamura *et al.*, 1998).

El abulón en la etapa poslarval tiene un tamaño promedio inicial de 250 μm y finaliza cuando tienen 2,000 μm aproximadamente. Las poslarvas se alimentan de la biopelícula que cubre las superficies de cultivo, la cual está compuesta por una capa de microorganismos (diatomeas y bacterias principalmente) y materia orgánica asociada. Estas biopelículas se forman proporcionando luz y flujo de agua a los tanques de cultivo y ocasionalmente inoculando diatomeas (Roberts *et al.*, 2000). Los microorganismos, incluyen diversas diatomeas bentónicas de la flora local de la región cultivadas en substratos artificiales o cultivos específicos de especies aisladas de la flora de la región como *Navicula incerta*, *Nitzschia* spp., y *Cocconeis* spp. (Ponce-Díaz *et al.*, 2003).

Debido a la disminución de las capturas de abulón por actividad pesquera, el cultivo de este molusco en Baja California es una actividad importante en la producción. En el año de 1996 se estimó una pesquería cercana a las 1100 toneladas y para el año 2008 ésta ha disminuido a 794 toneladas de peso total (SAGARPA, 2008). Tales efectos es las poblaciones naturales son probablemente el resultado de la sobrepesca, incluso fenómenos naturales como El Niño de 1997 a 1998, el cual redujo drásticamente los mantos de macroalgas, siendo estos la principal fuente de alimento de juveniles y adultos de especies de abulón (Ponce-Díaz *et al.*, 2003).

Las microalgas han pasado a ser organismos de interés industrial, por la posibilidad de realizar cultivos masivos para alimentar organismos herbívoros filtradores y obtener productos específicos como vitaminas, proteínas, ácidos

grasos no saturados y pigmentos. Sin embargo, el cultivo masivo de microalgas para la alimentación de larvas y juveniles de moluscos, es uno de los factores limitantes o así llamados “cuellos de botella” ya que una alimentación deficiente en cantidad y calidad nutricional, causará problemas de adecuado crecimiento y supervivencia en etapas posteriores de desarrollo y por consecuente pérdidas económicas (Cabrera y Montecino, 1987).

La producción de cultivos semiintensivos de diatomeas, requiere de condiciones específicas, por lo que la conservación de cultivos microalgales a bajas temperaturas durante largos periodos hasta por varios meses y que sean viables para su posterior utilización, es una importante alternativa para reducir el tiempo asociados con el mantenimiento de diatomeas bentónicas y los costos que representaría la pérdida de la producción por falta de alimento y calidad de las poslarvas (Voltolina, 1994; Sánchez-Saavedra, 2006).

En las granjas comerciales la reinoculación con diatomeas bentónicas suministradas como alimento no se basa en estudios científicos, en la rutina diaria se agregan inóculos no cuantificados con periodicidades aparentemente subóptimas, ya que las superficies de los tanques de cultivo se observan frecuentemente sin suficientes diatomeas. Además, no se cuenta con el equipo necesario para cubrir la demanda de diatomeas utilizadas como alimento en el caso de problemas asociados a fallas técnicas en el suministro de aire, la energía eléctrica, la calidad de agua, las mareas rojas, la contaminación por otras microalgas, las bacterias, los protozoarios, y otros factores. Lo anterior ha ocasionado serios problemas en el adecuado abastecimiento de diatomeas utilizadas para alimentar las poslarvas de abulón. Es necesaria la búsqueda de alternativas para asegurar el continuo abastecimiento de alimento, y una promisorio alternativa es el uso de concentrados de diatomeas bentónicas almacenadas en frío.

La preservación de cepas de microalgas por largos periodos es reconocida como un medio para mantener células del cultivo original, de esta manera también hay

una reducción del tiempo, del equipo y del espacio requerido para mantener las colecciones que proveen microalgas.

I.1. Antecedentes

El desarrollo de las técnicas de cultivo de abulón en diversas partes del mundo, ha demostrado el alto potencial que tiene la acuicultura para incrementar los volúmenes de producción comercial. En las granjas y laboratorios de producción de abulón, uno de los principales problemas está relacionado con poder satisfacer los requerimientos nutricionales por medio de la alimentación adecuada en las primeras etapas de vida, ya que es un factor fundamental para el desarrollo de esta actividad (Kawamura *et al.*, 1995, 1998). En México parte del proceso del cultivo ya se conoce, sin embargo se siguen teniendo aún altas tasas de mortalidad (90%) en la fase de poslarva y/o juvenil temprano (Ponce-Díaz *et al.*, 2003).

Shilling *et al.* (1996), afirman que las larvas de *H. rufescens* pueden utilizar hasta un tercio del material orgánico disuelto en el agua para sostener las funciones metabólicas, y pueden vivir hasta 30 días dependiendo de la cantidad de este aporte una vez que han agotado las reservas del saco vitelino. La tasa de pastoreo de las poslarvas de abulón (*Haliothis* spp.) se encuentra relacionada con la edad de las poslarvas así como con la densidad de alimento. En *Haliothis rufescens*, la actividad de pastoreo es mínima durante la primera semana de vida y se incrementa abruptamente después de la segunda y tercera semanas después del asentamiento (Martínez-Ponce y Searcy-Bernal, 1998).

Las poslarvas de *Haliotis* spp. tienen preferencia por ingerir diatomeas pequeñas (<35µm) como *Navicula incerta* y *Pinnularia biceps*, en presencia de diferentes especies de diatomeas (Siqueiros-Beltrones y Voltolina, 2000).

Para tratar de mejorar la eficiencia de crecimiento y de supervivencia en esta etapa, se han realizado distintos trabajos que asocian el crecimiento del abulón con la composición proximal de las diatomeas bentónicas utilizadas como alimento de poslarvas de abulón. Correa-Reyes *et al.* (2001), evaluaron el valor nutrimental de diferentes especies de diatomeas bentónicas al ser suministradas como alimento en cultivos monoespecíficos y concluyeron que el crecimiento de las poslarvas de *H. rufescens* está en relación a las características bioquímicas de las diatomeas bentónicas. Simental-Trinidad (2002) investigó el efecto del enriquecimiento de láminas de *Macrocystis pyrifera* por medio de la colonización selectiva con la diatomea bentónica *N. incerta* y evaluó que tienen un alto valor nutrimental y aumentan la tasa de crecimiento en juveniles de abulón rojo.

En el 2002, Carbajal-Miranda evaluó el crecimiento en poslarvas de *H. rufescens* utilizando como alimento dietas monoespecíficas y mixtas de diatomeas bentónicas, encontrando una mayor tasa de crecimiento al ser alimentadas con el cultivo monoespecífico de *N. incerta*.

En diferentes partes del mundo se han realizado intentos para tratar de sustituir el uso de microalgas vivas, en algunos estudios se ha experimentado con dietas formuladas como microcápsulas y uso alternativo de microorganismos como bacterias (Couteau y Sorgeloos, 1992), sin embargo, éstos han sido descartados como sustitutos de las microalgas vivas ya que no proporcionan igual crecimiento y supervivencia en los organismos que los consumen. Las microalgas vivas tienen un mayor valor nutritivo y mejor digestibilidad comparada con muchos sustitutos, la calidad nutricional de las fuentes de alimento, dependen de muchos constituyentes bioquímicos como ácidos grasos, vitaminas, esteroides y carbohidratos (Siguineau *et al.*, 1996).

Son pocos los trabajos en los cuales se menciona la utilización de concentrados de microalgas. Las condiciones de crecimiento del cultivo previo a su conservación en frío, pueden ser modificadas para cambiar la composición bioquímica que permita aumentar la tolerancia a las bajas temperaturas. Estos cambios incluyen: la edad del cultivo (Morris, 1976), la temperatura de incubación (Morris, 1976), la composición bioquímica (Morris *et al.*, 1977), la limitación de nutrientes (McLellan, 1989) y el potencial osmótico del medio (Canavate y Lubián, 1995).

Roland y Broadley (1990), utilizaron concentrados de las diatomeas *Thalassiosira pseudonana* y *Skeletonema costatum* como suministro de alimento provisional y por corto plazo para alimentar larvas pediveligers de *Crassostrea gigas*, no se observaron mortalidades al suministrar estas microalgas como alimento y promovieron el crecimiento.

Diferentes técnicas han sido utilizadas para concentrar y preservar microalgas para alimento de moluscos bivalvos como las microalgas secas con atomización (spray-dryer) y liofilizadas de algas que tienen bajo éxito al emplearse como alimento para larvas de las almejas *Mercenaria mercenaria* y *Saccostrea glomerata* (Numaguchi y Nell, 1991). Cordero-Esquivel y Voltolina-Lobina (1996), realizaron ensayos comparativos al utilizar microalgas congeladas y microalgas liofilizadas, como aporte de alimento para mejillón *Mytilus galloprovincialis* mostrando mayor rendimiento los organismos alimentados con microalgas congeladas, éstos resultados reflejaron una menor tasa de degradación bioquímica en las microalgas almacenadas en congelamiento que las liofilizadas. Un factor limitante para la inclusión comercial de concentrados de microalgas ha sido la incapacidad de crear pastas que conserven un alto valor nutricional y mantengan viabilidad para su crecimiento. Entre las distintas técnicas utilizadas para conservar cultivos microalgales, están el uso de pastas secas, el congelamiento y la refrigeración entre los métodos más utilizados (Knauer y Southgate, 1999).

Souza *et al.* (2002) demostraron que concentrados de *Chaetoceros muelleri* y *Thalassiosira pseudonana* almacenados durante 6 semanas a 4 °C se pueden dar de alimento a larvas de *Penaeus monodon* y promueven tasas de supervivencia similares a las de alimentar con las microalgas frescas.

Uno de los pocos antecedentes de la preservación exitosa de diatomeas bentónicas por frío y sin uso de crioprotectantes para *Navicula incerta* y *Amphiprora paludosa* var. *hialina*. Se encontró que estas dos especies mantienen su viabilidad para crecer y presentan pocos cambios en la composición bioquímica después de 4 semanas de almacenamiento a 4 °C por medio de refrigeración y oscuridad (Sánchez-Saavedra, 2006).

Ponis *et al.* (2008), realizaron la producción y preservación de la microalga *Pavlova lutheri*, en corto plazo. El almacenamiento se realizó durante 23 días a diferentes temperaturas (1, 4, 25 °C) y como conservantes ácido ascórbico y propanoico con burbujeo de aire. Se obtuvo que a bajas temperaturas (1 y 4 °C) el tiempo de vida de la microalga en almacenamiento fue mayor, pero se dio una disminución del 70% del contenido total de ácidos grasos.

La diatomea *Cylindrotheca closterium* mantiene su viabilidad de crecimiento después de ser mantenida a baja temperatura (4 ± 1 °C) y en oscuridad por un periodo de 21 semanas (Araújo *et al.*, 2008).

La cantidad de ácidos grasos es modificada conforme disminuye la temperatura, hay un aumento en la producción de ácidos grasos saturados e insaturados, lo que aumenta la fluidez de las biomembranas (Koven *et al.*, 1989). Se ha encontrado que especies del género *Nitzschia* spp. producen altos niveles de ácidos grasos a bajas temperaturas, por lo que se estudian para ser utilizadas como alimento en estadios tempranos de moluscos (Renaud *et al.*, 1995).

Un factor importante que limita la utilización comercial de concentrados de microalgas es la baja disponibilidad de pastas que conserven un alto valor

nutricional y alta viabilidad en su crecimiento por el almacenamiento prolongado en bajas temperaturas y sin aditivos químicos.

Capítulo II

Objetivos

II.1 General

Evaluar el crecimiento y la supervivencia de poslarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) alimentadas con dietas de diatomeas bentónicas conservadas en frío.

II.2 Específicos

- Evaluar la viabilidad para el crecimiento y la composición bioquímica de siete especies de diatomeas bentónicas almacenadas en frío a 4 °C (por refrigeración) durante dos meses.
- Evaluar la tasa de crecimiento y el porcentaje de supervivencia de poslarvas de *H. rufescens* al suministrar como alimento dietas monoespecíficas de cinco especies de diatomeas bentónicas almacenadas en frío a 4 °C.

Capítulo III

Materiales y Métodos

III.1. Características de las diatomeas

Las siete cepas de diatomeas bentónicas que se utilizaron en este trabajo fueron provistas de la colección particular del Laboratorio de Microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE. Seis de las especies de diatomeas bentónicas que se utilizaron provenían de aislamientos de cepas de Baja California: *Nitzschia thermalis* var. *minor*, dos diferentes cepas de *Nitzschia laevis* (cepa A y B), *Nitzschia* cf. *fonticola* var. *pelagica*, *Nitzschia frustulum* var. *perminuta* aisladas por Correa-Reyes (2001), la cepa de *Navicula incerta* fue donada por la empresa “Abulones Cultivados S. de R.L. de C.V.” en el Ejido Eréndira, la cual fue aislada de las costas de la Bahía Todos Santos por personal del Laboratorio de Microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California. Además, se utilizó una cepa de Nayarit *Navicula byskanterae* aislada por Aguilar-May (2002).

III. 2. Cultivo de diatomeas para producción de biomasa

El cultivo de diatomeas se llevó a cabo en el laboratorio húmedo central del Departamento de Acuicultura del CICESE. El agua de mar utilizada para los cultivos fue provista del sistema cerrado del laboratorio, la cual fue filtrada e irradiada con rayos ultravioleta. Los cultivos se mantuvieron con iluminación continua provista por lámparas fluorescentes de 1.2 m y 40 Watts con irradiancia de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y temperatura controlada en valores de $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Se inoculó cada una de las especies de diatomea en matraces con 100 ml de medio de cultivo “f” preparado según las recomendaciones de Guillar y Ryther (1962).

Los cultivos de las siete especies se mantuvieron de forma estática, no axénicos y en volúmenes progresivamente mayores desde matraz Erlenmeyer de 225 ml hasta Erlenmeyer de 1000 ml los cuales contenían medio de cultivo “f”. A los matraces de 225 ml se les adicionó 100 ml de agua de mar filtrada y medio de cultivo, para los matraces de 1 L se adicionó 700 ml de agua de mar y la cantidad correspondiente de medio de cultivo “f”. En todos los casos el medio de cultivo se esterilizó en una autoclave Yamato SE300 a 121 °C y 1.05 kg m^{-2} de presión durante 30 minutos. Semanalmente se reinocularon los cultivos de cada especie con el medio de cultivo y condiciones de cultivo ya indicadas en líneas atrás, esto con el fin de tener un cultivo en fase de crecimiento exponencial.

Los cultivos mantenidos en matraz de 1 L sirvieron como inóculo para cultivos mantenidos en cubetas con 16 L de medio para cada una de las especies. Los detalles de los sistemas experimentales en cubetas están descritos por Correa-Reyes (2001). El agua de mar en las cubetas se trató por una desinfección química siguiendo la técnica descrita por Hemerick (1973), añadiendo agua de mar hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) al 6% por 24 horas y posteriormente se le agregó tiosulfato de sodio (0.15 g por litro de agua) para neutralizar el cloro residual y una profusa aireación para su total eliminación. Dichos cultivos fueron expuestos a iluminación continua de luz blanca, la cual fue suministrada por lámparas fluorescentes de tipo comercial y la temperatura se mantuvo en 20 ± 2 °C controlada por el sistema de refrigeración del laboratorio húmedo central del Departamento de Acuicultura del CICESE (Figura 1).

Para los cultivos mantenidos en cubetas se tomaron muestras el día de inoculación de cada especie (día 0), y en el día de la cosecha de la biomasa (día 7). Con una alícuota de cada muestra se evaluó la cantidad de biomasa producida por medio de conteos directos en una cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad y con ayuda de un microscópio compuesto Olympus modelo HB2, siguiendo las recomendaciones propuestas por Sorokin (1973).

Con los datos de los conteos obtenidos se calculó la tasa de crecimiento específica (μ) descrita por Fogg y Thake (1978), utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{(\log_2 N_2) - (\log_2 N_1)}{t_2 - t_1}$$

en donde:

μ = Tasa de crecimiento específica

\log_2 = Logaritmo en base 2

t_1 = Tiempo inicial

t_2 = Tiempo final

N_1 = Número de células en el t_1

N_2 = Número de células en el t_2

Debido a las características del crecimiento de las diatomeas bentónicas y a que forman una película que se adhiere a las paredes y a la base del recipiente, las muestras fueron disgregadas con tratamiento de ultrasonido (40 seg a 100 KHz) previo a realizar la colecta de muestras de los matraces. Este procedimiento se repitió hasta por un tiempo de tres minutos al realizar la evaluación del número de células.

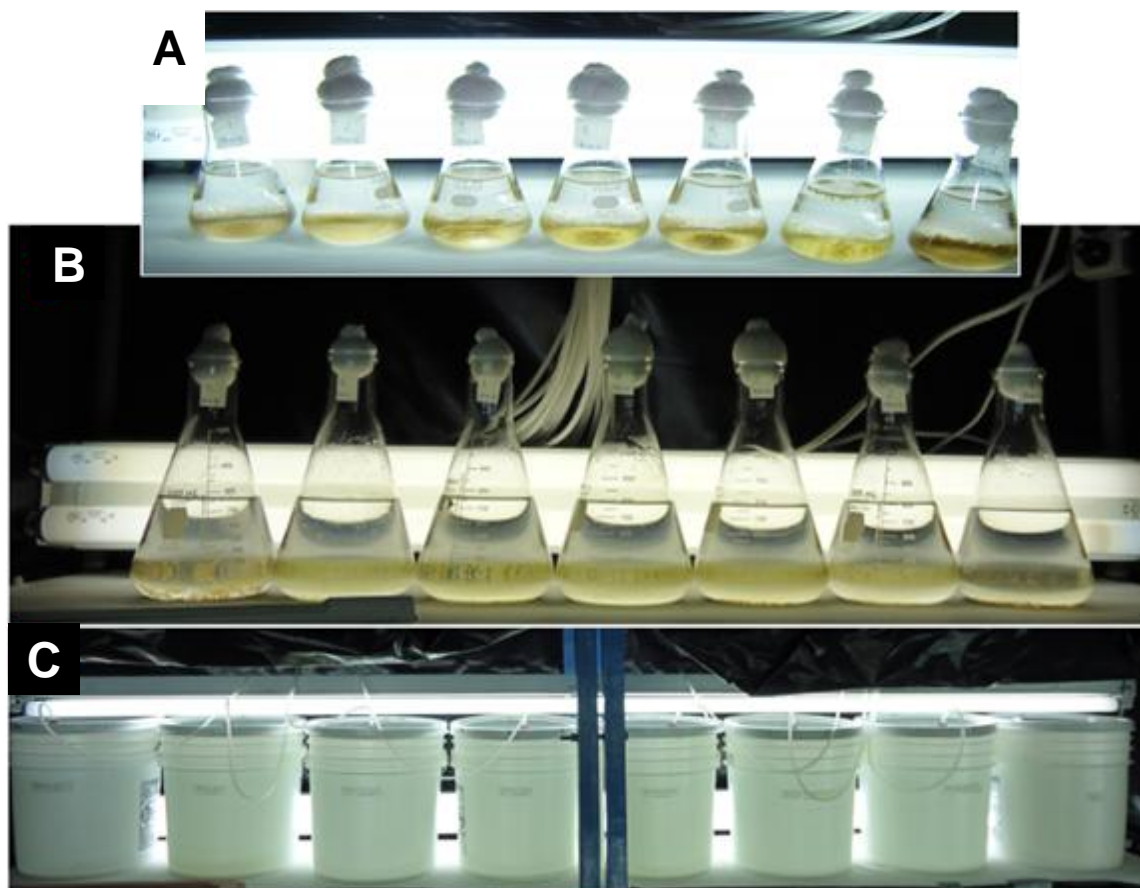


Figura 1. Secuencia de producción de cultivos en volúmenes progresivamente mayor para 7 especies de diatomeas bentónicas. A: Erlenmeyer con 100 ml. B: Erlenmeyer con 700 ml. C: Cubetas con 16 L.

III. 3. Conservación en frío de la biomasa de diatomeas

Se cosechó el total de la biomasa de células de los cultivos que se mantuvieron por cada una de las siete especies en cubetas con 16 litros. La biomasa de células se cosechó en fase estacionaria mediante el raspado manual de las paredes y del fondo del recipiente. El volumen cosechado se concentró por sedimentación en un volumen de 3.6 L el cual se subdividió en alícuotas de 100 ml dentro de frascos de vidrio con tapa previamente esterilizados y etiquetados. Los frascos se almacenaron en ocho bolsas negras con 21 frascos cada una y se mantuvieron en refrigeración (4 °C). Como control del tratamiento de conservación en frío se colectó una alícuota de cada cultivo concentrado; esta alícuota sirvió como inóculo para iniciar un nuevo cultivo al cual se le evaluó el crecimiento y la composición bioquímica antes de ser almacenado en refrigeración (tiempo 0).

Cada semana se extrajo del refrigerador una bolsa negra con las alícuotas de los cultivos para evaluar la viabilidad para el crecimiento, el análisis de la composición proximal y los cultivos de bacterias.

III. 3. 1. Ensayos de viabilidad de diatomeas conservadas en frío

La viabilidad se evaluó como la capacidad de las células conservadas en frío para crecer en medio nuevo. Para ello, cada semana se tomó para cada especie y por triplicado una alícuota de 10 ml de la muestra conservadas (100 ml) en frío. Esta alícuota se utilizó como inóculo para iniciar un nuevo cultivo en matraz Erlenmeyer con 100 ml de medio como ya está descrito en la sección III.2.

Se evaluó el crecimiento de estos cultivos como ya está descrito en la sección III.2.

III. 3. 2. Análisis proximales

Se evaluó cada semana, durante ocho semanas, la composición proximal (proteínas, carbohidratos, lípidos, cenizas y pigmentos) de las distintas cepas almacenadas en frío.

Para los análisis de la composición de cada una de las especies se tomaron submuestras de los cultivos conservados en frío. Las muestras fueron suspendidas en filtros de fibra de vidrio (de 45 mm de diámetro y abertura de poro de 1 μm). Los filtros se lavaron previamente con agua destilada y pre-incineraron en una mufla a 470 °C por un periodo de 4 horas.

Todas las muestras se colocaron en viales previamente etiquetados y se almacenaron a -20 °C, se mantuvieron congeladas hasta obtener el total de las muestras durante las ocho semanas de experimentación y para posteriormente realizar los análisis químicos correspondientes.

III. 3. 2. 1. Peso seco y contenido de cenizas

El peso seco total (PST) y el peso de las cenizas (PC) se evaluaron según la técnica propuesta por Sorokin (1973). Se colectó una alícuota de 15 ml de cada cultivo y condición experimental y se filtró a través de filtros de fibra de vidrio de 45 mm de diámetro y 1 μm de abertura de poro, se eliminaron residuos lavando con 10 ml de formiato de amonio al 3%. Las muestras se mantuvieron en una estufa a 60 °C hasta obtener valores de peso seco constante. Para conocer el contenido de cenizas, las muestras fueron incineradas en una mufla a 470 °C por 4 horas y posteriormente se pesó en una balanza analítica. Por diferencias entre el peso seco constante y el peso de las cenizas se obtuvo el peso seco orgánico (PSO).

III. 3. 2. 2. Proteínas

La extracción de la proteínas se realizó con hidróxido de sodio, siguiendo el método descrito por Malara y Charra (1972a), y para la evaluación según el método de Lowry *et al.* (1951). Para la elaboración de la curva de calibración de las proteínas se utilizó como estándar el suero de albúmina de bovino (98%) Sigma®.

III. 3. 2. 3. Carbohidratos

La extracción de los carbohidratos se efectuó con ácido sulfúrico al 0.5 N siguiendo la técnica descrita por Whyte (1987) y la medición de carbohidratos se realizó siguiendo el método de Dubois *et al.* (1956) y Malara y Charra (1972b) utilizando fenol al 5% y ácido sulfúrico concentrado. Para la curva de calibración se utilizó como estándar una solución de glucosa (99%) marca Sigma®.

III. 3. 2. 4. Lípidos

La extracción de los lípidos se realizó con una mezcla de cloroformo-metanol-agua siguiendo el método de Blight y Dyer, (1959) y modificada por Chiaverini (1972). La cuantificación de lípidos se efectuó por el método de Pande *et al.* (1963). Para realizar la curva de calibración se utilizó una solución de tripalmitina (99%) Sigma®.

III. 3. 2. 5. Pigmentos

La cuantificación de pigmentos se realizó siguiendo la técnica descrita por Parsons *et al.* (1984). La colecta de muestras se efectuó por triplicado para cada especie y condición experimental de cultivo.

III. 3. 3. Inóculos de bacterias

Para descartar la presencia de bacterias tipo *Vibrio* en los cultivos de diatomeas, se realizaron cultivos semanales en medio Difco TCBS Agar (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose), siguiendo los procedimientos descritos en DIFCO (1984). Para ello, se filtró para cada caso 10 ml de muestra en condiciones asépticas. Para el filtrado se utilizaron filtros estériles de 47 mm con 0.2 μm de abertura de poro. Estos filtros se colocaron en las cajas de Petri de 5.5 cm de diámetro con medio Bacto TCBS Agar (15 ml), se incubaron a temperatura ambiente durante 48 horas y se realizaron los conteos de unidades formadoras de colonias.

III. 3. 4. Bioensayo de alimentación de poslarvas de abulón rojo con diatomeas preservadas.

Para evaluar la calidad nutritiva de las diatomeas almacenadas y seleccionadas por su viabilidad y composición proximal, se realizó un bioensayo con poslarvas de abulón (*Haliotis rufescens*) durante 29 días, a las que se suministró como alimento las especies de diatomeas bentónicas seleccionadas.

Para este experimento se utilizaron abulones de aproximadamente 5 mm de longitud que fueron proporcionados por la empresa Abulones Cultivados, S. de R.L. ubicada en el Ejido Eréndira, Baja California, México. Las poslarvas se trasladaron al laboratorio húmedo central del Departamento de Acuicultura del CICESE, fueron introducidas en un recipiente cilíndrico de 100 L con 80 L de agua de mar filtrada, aclimatadas a una temperatura de 19 °C durante seis días y de esta manera evitar mortalidad por manipulación durante la cosecha y el traslado. Diariamente se realizó un recambio de agua del 100% y se alimentaron *ad libitum* con la diatomea *Navicula incerta*.

Los organismos se colocaron al azar en 30 recipientes de plástico color blanco de 1 L con 500 ml de agua de mar filtrada. Cada recipiente tenía una tapa con dos orificios, uno para la entrada de aire y otro para el desfogue de gases. Se mantuvieron las poslarvas a una densidad de 0.5 organismo cm^{-2} , teniendo un total de 80 organismos por unidad experimental. Estos recipientes con poslarvas fueron colocadas en dos cámaras provistas con mangueras para suministrar aireación y estuvieron situadas en el Laboratorio Húmedo Central del edificio de Acuicultura (Figura 2). Cada día se realizó un recambio de agua del 100% de todas las unidades experimentales. El agua de mar utilizada para los recambios fue filtrada por filtros de cartucho de 10, 5 y 1 μm e irradiada con luz ultravioleta. Se midieron cada día los parámetros fisicoquímicos de Nitrógeno amoniacal total (NAT) con un paquete de reactivos para análisis de acuarios (Aquarium Pharmaceutical Inc.), salinidad (‰) con un refractómetro S-100, y el oxígeno disuelto con un oxímetro YSI modelo 55-12 FT.

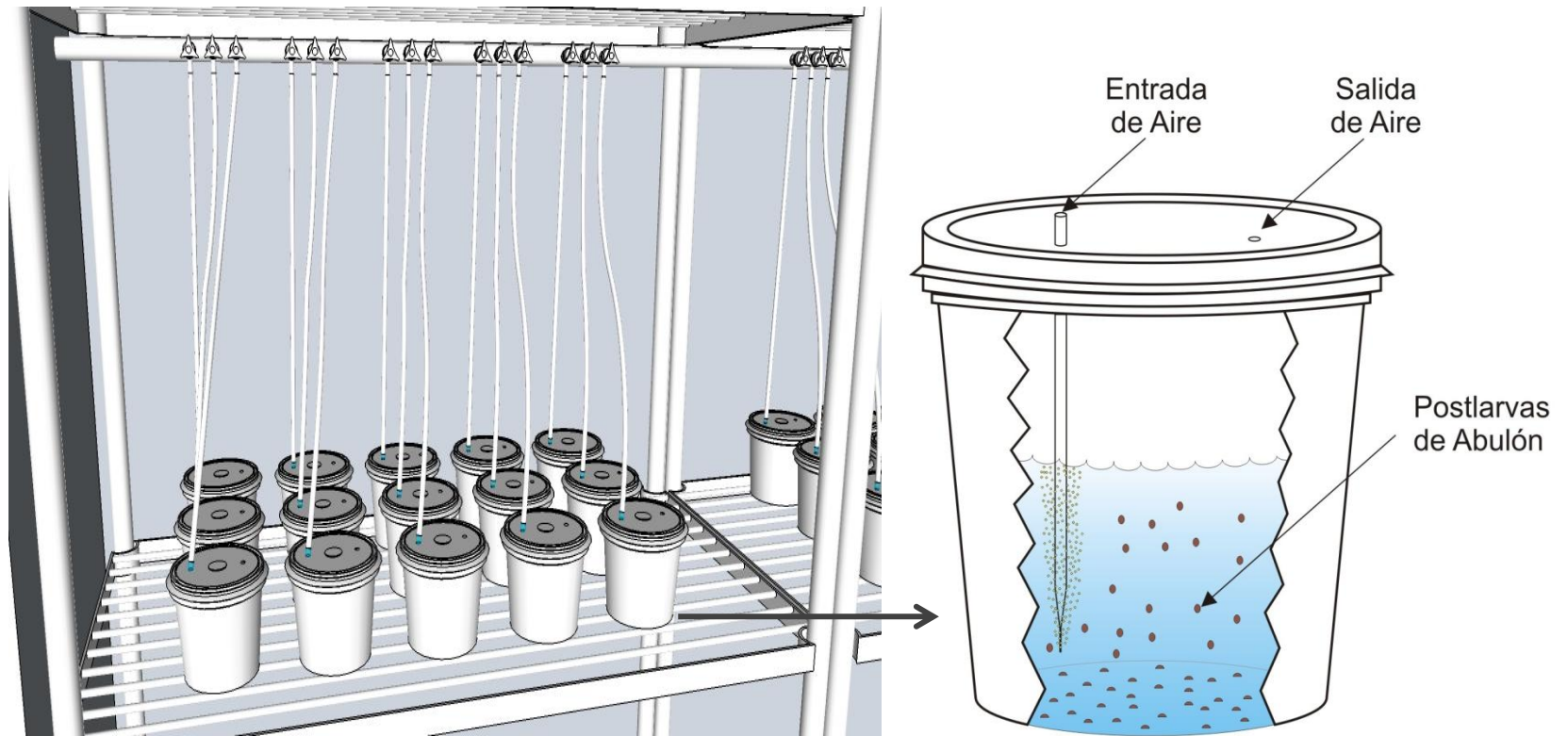


Figura 2. Diagramatización esquemática de la disposición de las unidades experimentales utilizadas en el bioensayo de alimentación con postlarvas de abulón rojo alimentadas con cinco especies de diatomeas preservadas y sin preservar. (Dibujos: Francisco Valenzuela).

III. 3. 4. 1 Dietas monoespecíficas de diatomeas bentónicas

En base a los resultados de viabilidad para el crecimiento de las diatomeas, se eligieron las cinco especies con mayor densidad celular después de ser almacenadas en frío (4 °C) durante ocho semanas. Se utilizaron como alimento los cultivos frescos (control) y los preservados en frío (experimental) de las especies *Nitzschia thermalis* var. *minor*, *Navicula byskanterae*, *N. frustulum* var. *perminuta*, *N. cf. fonticola* var. *pelagica* y *N. incerta*.

Para el bioensayo, se cultivaron las cinco especies de diatomeas de la manera ya mencionada en el inciso III.2 y se cosecharon como se menciona en el inciso III.3. Sin embargo, el total de la cosecha para cada especie fue dividido en alícuotas de 10 ml y colocado en recipientes de plástico de 15 ml en condiciones asépticas. Las alícuotas se utilizaron para que cada semana se extrajera del refrigerador un recipiente y con el cultivo alimentar las poslarvas mantenidas en las unidades experimentales correspondientes. El mantener alícuotas de los cultivos aseguró evitar posible contaminación de las muestras de diatomeas preservadas durante la duración de la fase experimental.

Las poslarvas fueron alimentadas de acuerdo a la ración de alimentación propuesta por Miranda-Saucedo (2009) para *Navicula incerta* (Tabla I). La ración de alimentación se adecuó considerando los valores indicados para *Navicula incerta* y realizando una equivalencia en base al peso seco de cada especie.

Tabla I. Ración y frecuencia de alimentación para poslarvas y juveniles tempranos de *H. rufescens* propuesta por Miranda-Saucedo (2009).

Edad (días)	Inóculo (cel mm⁻²)	Frecuencia de alimentación
0-15	200	Semanal
15-31	300	Tercer día
31-38	500	Dos días
38-45	600	Diaría
45-75	1000	Diaría
75-95	1500	Diaría

Los sistemas de cultivo de las poslarvas se mantuvieron con mínima irradiancia de luz ($\approx 10 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}$), y temperatura controlada a $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. El agua de mar utilizada para los recambios fue filtrada por filtros de cartucho de $1 \mu\text{m}$ e irradiada con luz ultravioleta.

Se evaluó semanalmente la talla de 10 organismos tomados aleatoriamente de cada condición experimental. Las mediciones se realizaron mediante la toma de imágenes utilizando un microscopio Olympus SZ61 con un aumento de 0.67, así como una cámara Infinity 1. El análisis digital de las imágenes y tallas se realizó con el programa ImageJ (NIH). Semanalmente se evaluó la tasa de supervivencia de los organismos por medio de conteo directo de las poslarvas vivas respecto a las evaluadas al inicio del ensayo.

III. 3.6 Análisis de los resultados

El procesamiento preliminar de datos se realizó con el programa Excel 6.0 con el que se ordenaron los datos de producción de biomasa como número de células, peso seco, la tasa de crecimiento y la composición proximal de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas.

Se ordenaron las mediciones de cada poslarva por unidad experimental y se obtuvieron los promedios de talla por semana de cada uno de los tratamientos y las densidades de poslarva para la obtención de la tasa de supervivencia. Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente utilizando un ANOVA con el programa STATISTICA ver 8.0.

Para evaluar las posibles diferencias de la producción de biomasa como número de células, peso seco, la tasa de crecimiento y la composición proximal de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas de cada tratamiento, se aplicó un análisis de varianza de una vía, esto para cada una de las especies con respecto al tiempo.

Los datos de porcentaje de tasa de supervivencia fueron transformados antes de los análisis mediante la relación:

$$\left(Y = \arcsen \sqrt{\frac{P}{100}} \right)$$

Donde P es el porcentaje de supervivencia.

Debido a que los datos de longitud, tasa de crecimiento y supervivencia presentaron homogeneidad de varianza, se aplicó un análisis factorial tomando en cuenta las variables condición de la diatomea y tiempo.

Para todos los análisis estadísticos se realizaron las pruebas de normalidad y homocedasticidad con un $\alpha=0.05$ (diferencias significativas con probabilidad

P<0.05). Para los análisis estadísticos que presentaron diferencias significativas, se realizó un análisis *a posteriori* de Tukey entre las medias de los tratamientos (Sokal y Rohlf, 1979; Zar, 1984).

Capítulo IV

Resultados

IV.1. Ensayo de viabilidad de diatomeas conservadas en frío

IV.1.1 Densidad celular de diatomeas bentónicas

Los valores promedio de la densidad de células de las especies *Nitzschia laevis* cepa A y B, resultaron ser menores y significativamente diferentes ($P < 0.05$) a las cinco especies restantes al final de las ocho semanas de almacenamiento en frío (Figura 3). Estas especies tuvieron una concentración celular mínima de 2.2×10^5 cel ml⁻¹ para la primera cepa (cepa A) y 1.2×10^5 cel ml⁻¹ para la segunda cepa (cepa B), en la cual no hay densidad celular para las semanas tres y cinco ya que resultaron ser iguales a las concentración inicial con la que se realizó el inóculo. En la especie *Navicula byscanterae* (D) se obtuvieron las densidades celulares en una concentración promedio de 1.3×10^6 cel ml⁻¹ si diferencias significativas ($P > 0.05$) durante la mayoría de las ocho semanas de almacenamiento, excepto para la semana cuatro.

Para las siete especies de diatomeas se evaluó un decremento significativo ($P < 0.05$) en la densidad de células durante la semana cuatro de almacenamiento en frío (Figura 3). Sin embargo, hay un incremento de la concentración celular a partir de la semana cinco, excepto para las especies de *N. laevis* cepa A y B. En las especies *Nitzschia thermalis* var. *minor*, *Navicula byscanterae* y *Nitzschia frustulum* no hay diferencias en la densidad celular para las semanas cinco, seis y siete, sin embargo, en la semana ocho de nuevo disminuye la densidad celular llegando a valores similares a los obtenidos durante la semana cuatro. Para la diatomea *N. frustulum* se encontraron las mayores densidades celulares durante el periodo de almacenamiento en frío por ocho semanas.

En la especie *Nitzschia cf. fonticola* no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) en los valores de densidad celular durante las primeras tres semanas de almacenamiento manteniéndose en valores promedio de 2.3×10^6 cel ml^{-1} . Sin embargo, se evaluó un aumento progresivo de la densidad celular a partir de la semana cuatro ($P < 0.05$) (Figura 3 F). En la especie *Navicula incerta* la densidad celular disminuyó durante las primeras cuatro semanas ($P < 0.05$) y posteriormente ésta se incrementó, con una ligera disminución en la semana seis (Figura 3 G).

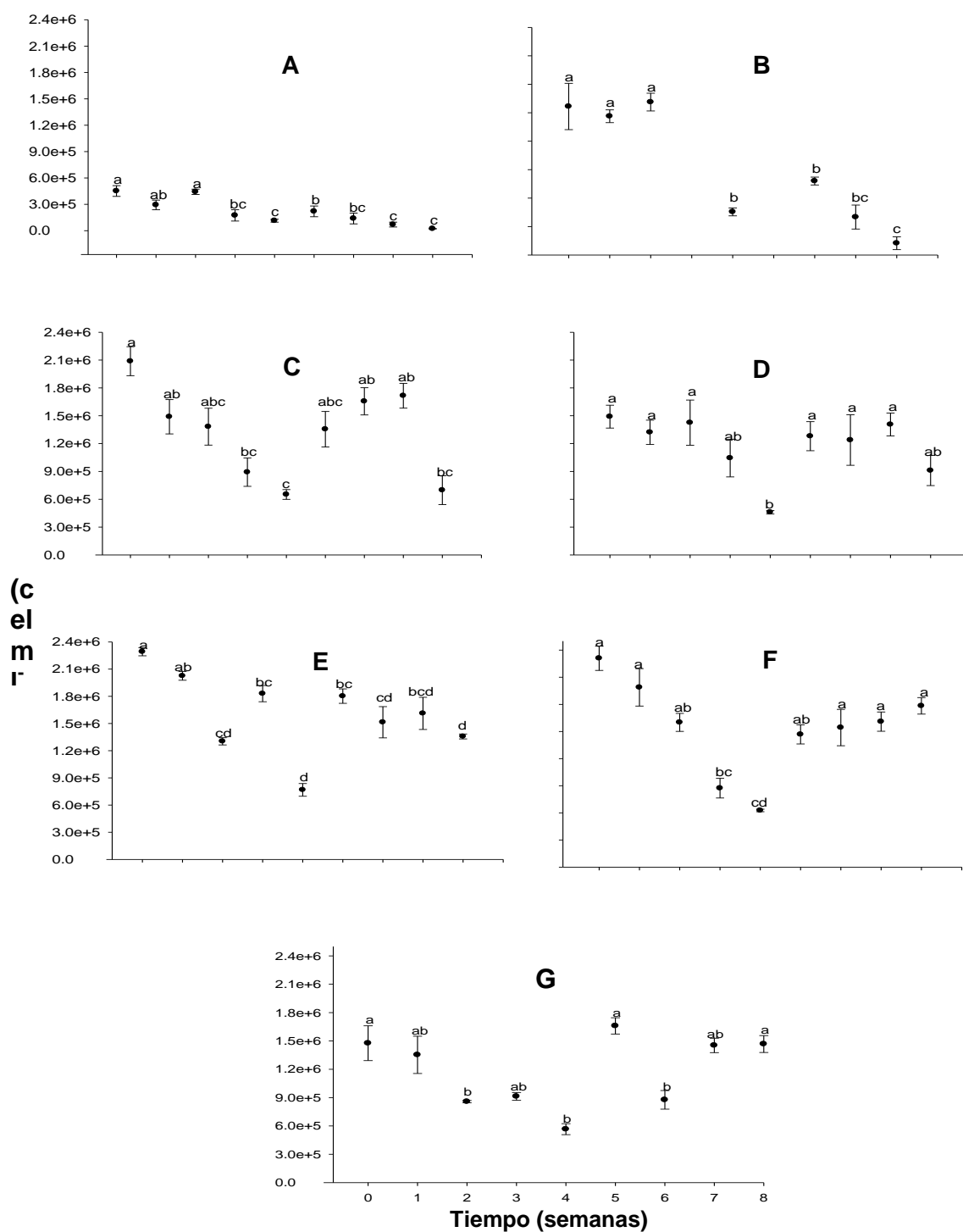


Figura 3. Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (cél ml⁻¹) en las especies A) *Nitzschia laevis* (cepa A); B) *Nitzschia laevis* (cepa B); C) *Nitzschia thermalis* var. *minor*; D) *Navicula biskanterae*; E) *Nitzschia frustulum*; F) *Nitzschia* cf. *fonticola*; G) *Navicula incerta*, durante ocho semanas de almacenamiento en frío Anova de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; a>b>c>d.

IV.1.2 Tasa de crecimiento específica

La tasa de crecimiento específica (μ) de acuerdo a cada una de las semanas de almacenamiento en frío, resultaron ser significativamente menores ($P < 0.05$) para las especies de *N. laevis* cepa A y B (Figura 4), en las cuales se observa que a partir de la semana tres de almacenamiento en frío la viabilidad en el crecimiento disminuyó, incluso para la cepa B no se obtuvo crecimiento de células en las semanas tres y cinco.

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la tasa de crecimiento en cuanto a la especie y el tiempo de refrigeración, Se encontró que la especie *N. laevis* cepa (A) la tasa de crecimiento es significativamente menor ($P < 0.05$) que las especies restantes con respecto al tiempo. No hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en la tasa de crecimiento en las especies *N. thermalis* var. *minor* y *N. frustulum*, a partir de la segunda semana de almacenamiento en frío (Figura 4 C y E).

En la especie *N. frustulum* la tasa de crecimiento fue menor y sin cambios significativos ($P < 0.05$) durante el periodo de almacenamiento en frío, respecto a la tasa de crecimiento del cultivo en fresco (Figura 4 D).

Para la especie *N. incerta* hubo cambios significativos en la tasa de crecimiento ($P < 0.05$) y en todos los casos fue menor en el periodo de almacenamiento en frío con respecto a la tasa de crecimiento en fresco. La tendencia de la tasa de crecimiento fue una disminución hasta la semana cuatro y posteriormente una recuperación en la semana cinco (Figura 4 D y G).

En la especie *N. cf fonticola*, la tasa de crecimiento disminuyó notablemente hasta la semana tres de almacenamiento en frío ($P < 0.05$). Sin embargo, a diferencia de las otras seis especies, ésta especie tuvo una recuperación de la tasa de crecimiento a partir de la semana cuatro teniendo un pequeño decremento en la semana cinco (Figura 4 D).

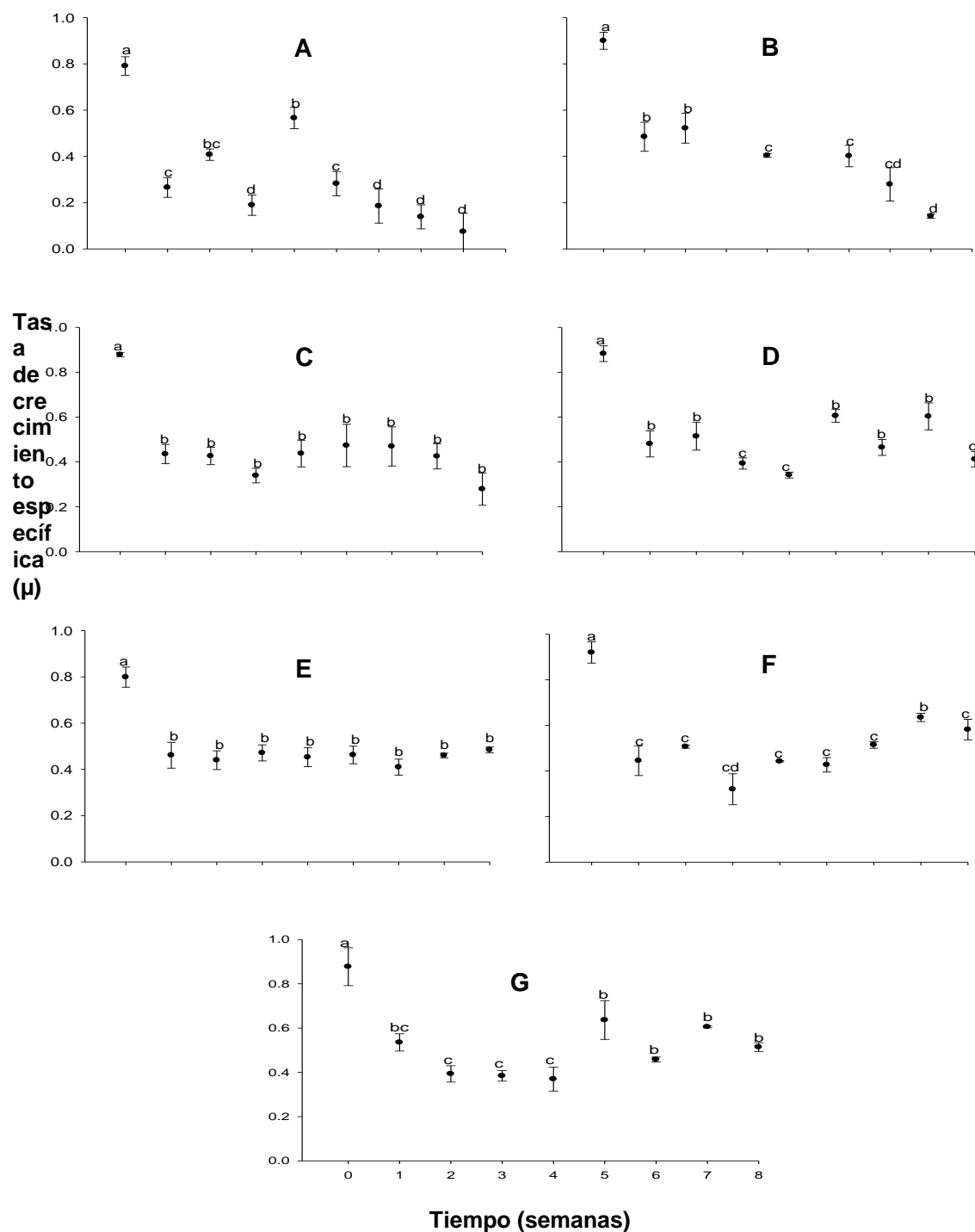


Figura 4. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento específica (μ) en las especies A) *Nitzschia laevis* (cepa A); B) *Nitzschia laevis* (cepa B); C) *Nitzschia thermalis* var. *minor*; D) *Navicula biskanterae*; E) *Nitzschia frustulum*; F) *Nitzschia* cf. *fonticola*; G) *Navicula incerta*, durante ocho semanas de almacenamiento en frío. Anova de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$.

IV.1.3 Medición de diatomeas conservadas en frío

De acuerdo con los resultados de las mediciones longitudinales realizadas a las siete especies de diatomeas almacenadas en frío al inicio y al final del periodo de experimentación, todas las especies a excepción de *N. laevis* cepa B que no resultó con diferencias significativas entre el inicio y final, muestran una tendencia a aumentar en su tamaño (largo y ancho). Se encontraron diferencias significativas de la longitud final con respecto a la inicial, en las especies *N. laevis* cepa A, *N. thermalis* var. *minor*, *N. byskanterae*, *N. frustulum* y *N. fonticola* (Tabla II). Las células de mayor tamaño pertenecen a la especie *N. incerta*, en las cuales no se encontró diferencias significativas entre la longitud inicial y final, sin embargo, hay un ligero aumento del tamaño de las células en la semana ocho. Para *N. laevis* cepa A, se encontró que estas células tienen menor longitud al final de las ocho semanas de almacenamiento en frío (Tabla II).

Tabla II. Mediciones promedio (μm) y desviación estándar del tamaño de las células de las siete especies de diatomeas bentónicas conservadas en frío durante ocho semanas, se indica el valor inicial (semana 0) y final (semana 8). Anova de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b$.

Especie y Semanas de refrigeración	Largo		Ancho	
	Inicial 0	Final 8	Inicial 0	Final 8
<i>Nitzschia laevis</i> (A)	18.71 \pm 2.89 ^a	11.27 \pm 1.00 ^b	2.2 \pm 0.13 ^b	2.7 \pm 0.2 ^a
<i>Nitzschia laevis</i> (B)	9.13 \pm 1.07 ^a	8.52 \pm 0.78 ^a	2.5 \pm 0.09 ^b	2.7 \pm 0.13 ^a
<i>Nitzschia thermalis</i> var. <i>minor</i>	13.91 \pm 1.64 ^b	16.33 \pm 1.34 ^a	2.5 \pm 0.14 ^b	2.7 \pm 0.11 ^a
<i>Navicula byskanterae</i>	12.32 \pm 1.26 ^b	14.24 \pm 0.97 ^a	2.5 \pm 0.21 ^b	2.7 \pm 0.18 ^a
<i>Nitzschia frustulum</i>	12.98 \pm 1.69 ^a	13.80 \pm 1.87 ^a	2.5 \pm 0.12 ^b	2.8 \pm 0.12 ^a
<i>Nitzschia</i> cf. <i>fonticola</i>	12.48 \pm 0.96 ^b	14.63 \pm 1.75 ^a	2.4 \pm 0.16 ^b	2.7 \pm 0.13 ^a
<i>Navicula incerta</i>	15.01 \pm 1.43 ^a	15.12 \pm 1.12 ^a	3.2 \pm 0.17 ^b	3.6 \pm 0.23 ^a

IV.2.1 Pigmentos

La especie *N. incerta* tuvo diferencias significativas ($P < 0.05$) en la cantidad de clorofila *a* durante el almacenamiento en frío. La mayor cantidad de clorofila *a* (0.37 mg m^{-3}) fue durante la semana ocho de almacenamiento en frío y las menores durante la semana dos y siete (Figura 5 D). Para las otras especies estudiadas, se evaluó diferencia de la concentración de clorofila entre las semanas iniciales con respecto al final del periodo de almacenamiento en frío ($P < 0.05$). Para *N. thermalis* se encontró la mayor cantidad de este pigmento en las semanas cuatro, cinco, siete y ocho mientras que las cantidades más bajas en las semanas tres y seis ($P < 0.05$), cabe destacar que en esta especie se encontró una mayor cantidad de clorofila *a* en la semana ocho de almacenamiento en frío con respecto a la semana cero que corresponde a las diatomeas en fresco, una tendencia similar fue evaluada para las especies *N. fonticola* y *N. incerta* (Figura 5).

La mayor cantidad de carotenos se encontró en la especie *N. incerta* con 0.37 mg.m^{-3} , así como la mayor diferencia en la concentración en el periodo de las ocho semanas de almacenamiento en frío, obteniendo las menores cantidades de carotenos en las semanas uno, tres y cuatro ($P < 0.05$). No se encontraron diferencias en la cantidad de carotenos en las especies *N. laevis* cepa A ($P > 0.05$), *N. byskanterae* ($P > 0.05$) y *N. fonticola* ($P > 0.05$). En la especie *N. laevis* cepa B se encontraron las cantidades más bajas de carotenos ($P < 0.05$), teniendo una cantidad de 0.09 mg.m^{-3} en la semana uno de experimentación (Figura 5).

En la especie *N. thermalis* la mayor cantidad de carotenos se encontraron a partir de la quinta semana y hacia el final del almacenamiento en frío siendo significativamente mayores ($P < 0.05$) a los valores encontrados en las primeras cuatro semanas (Figura 5 C).

En la especie *N. frustulum* la mayor cantidad de carotenos se encontró en la semana siete con 0.14 mg m^{-3} , siendo ésta una cantidad tres veces menor a la

encontrada en la especie *N. incerta* donde hay la mayor cantidad de este pigmento ($P < 0.05$) (Figura 5 E).

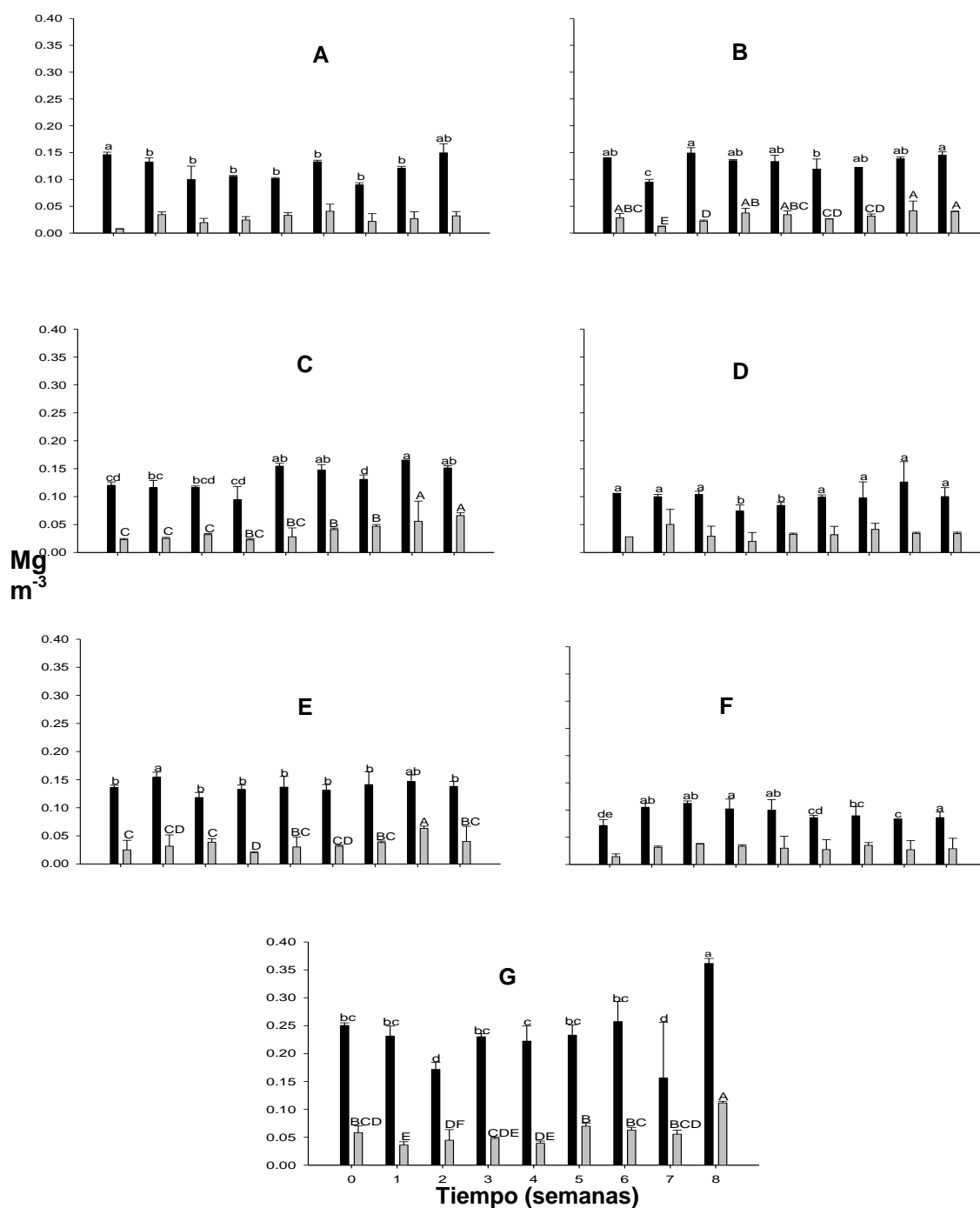


Figura 5. Valores promedio y desviación estándar de la concentración de clorofila *a* (■) y carotenos (■) en las especies A) *Nitzschia laevis* (cepa A); B) *Nitzschia laevis* (cepa B); C) *Nitzschia thermalis* var. *minor*; D) *Navicula biskanterae*; E) *Nitzschia frustulum*; F) *Nitzschia* cf. *fonticola*; G) *Navicula incerta*, durante ocho semanas de almacenamiento en frío. Letras minúsculas-mayúsculas y números diferentes indican diferencias significativas para proteínas, carbohidratos y lípidos. Anova de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$; $A>B>C>D$.

IV.3.1 Análisis proximales de microalgas conservadas en frío

Se encontraron diferencias significativas en la cantidad de cada uno de los componentes de la composición proximal, para cada especie de diatomea durante el tiempo de almacenamiento en frío. La tendencia general de los valores de la composición proximal en las siete especies fue de aumentar a partir de la semana cinco de almacenamiento en frío (Figura 6).

En la especie *N. laevis* cepa A se encontró diferencia en el contenido de proteínas por efecto del tiempo de almacenamiento ($P < 0.05$). Se encontró la mayor cantidad de proteínas en la semana ocho de almacenamiento en frío con 36%, y sin diferencias significativas con los valores evaluados en la semana seis. Para esta especie los menores valores de proteínas se midieron de la semana cero (cultivo sin almacenamiento) a la semana cuatro de almacenamiento en frío (Figura 6 A). En la especie *N. laevis* cepa B, no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en la cantidad de proteínas a partir de la semana cinco, en la cual se cuantificó la mayor cantidad de proteína (14%). En la semana cinco de almacenamiento en frío se encontraron cantidades de proteína significativamente mayores ($P < 0.05$) en las especies *N. thermalis* con 16% (Figura 6 C), *N. byskanterae* con 17% (Figura 6 D), *N. frustulum* con 19% (Figura 6 E), *N. fonticola* con 19% (Figura 6 F) y *N. incerta* con el 14%, en general esta última especie resultó con las menores cantidades de proteína durante las ocho semanas de almacenamiento en frío (Figura 6 G).

La cantidad de carbohidratos resultó ser significativamente ($P < 0.05$) mayor en todas las especies de diatomeas almacenadas en frío a partir de la semana cinco, con respecto a la cantidad de lípidos y proteínas (Figura 6). La especie *N. byskanterae* es la que presentó el mayor porcentaje de carbohidratos con el 52% en la semana cinco, el cual bajó a 28% en la semana seis y se mantuvo sin cambios hasta el final de la semana ocho de almacenamiento en frío (Figura 6 D), ésta misma tendencia la mostró la especie *N. thermalis* (Figura 6 C). Las especies *N. laevis* cepa B y *N. incerta*, son las que resultaron tener menor cantidad de

carbohidratos en su composición proximal. Para *N. laevis* cepa B con valores de 7 a 9% en las primeras cuatro semanas y cantidades de 20% en las semanas cinco y seis disminuyendo a 14% al final de la semana ocho. Para *N. incerta* se obtuvo 14% de carbohidratos en la semana 0 (sin almacenamiento en frío), disminuyendo hasta 8% en la semana cuatro y para la semana cinco y ocho se incrementaron en valores de 28% y 32% respectivamente (Figura 6 G).

Para la especie *N. laevis* cepa A se obtuvo 38% de carbohidratos en la semana cinco, los cuales disminuyeron hasta 27% en las siguientes semanas, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas por efecto del tiempo de almacenamiento en frío ($P > 0.05$) (Figura 6 A).

Los lípidos resultaron ser las biomoléculas con menor cantidad de la composición proximal de las siete especies de diatomeas almacenadas en frío (Figura 6). Las especies de *N. laevis* cepa A y B resultaron con significativamente mayores cantidades de lípidos ($P < 0.05$) (Figura 6 A y B).

En la especie *N. thermalis* se obtuvo 20% de lípidos en la semana ocho y 18% en la semana seis, en las cuales no se obtuvo diferencia significativa ($P > 0.05$) (Figura 6 C). En la especie *N. frustulum* no se obtuvieron diferencias significativas en la cantidad de lípidos los cuales varían de 9 a 16% en el periodo de las ocho semanas de almacenamiento en frío ($P > 0.05$) (Figura 6 E).

N. incerta resultó ser la especie con menor cantidad de lípidos, teniendo 8.9% en la semana ocho y los menores valores en la semana seis (1.7%), no tuvo diferencias significativas en la cantidad de lípidos en las primeras cinco semanas de almacenamiento en frío, pero si con el resto de los valores evaluados ($P < 0.05$) (Figura 6 G).

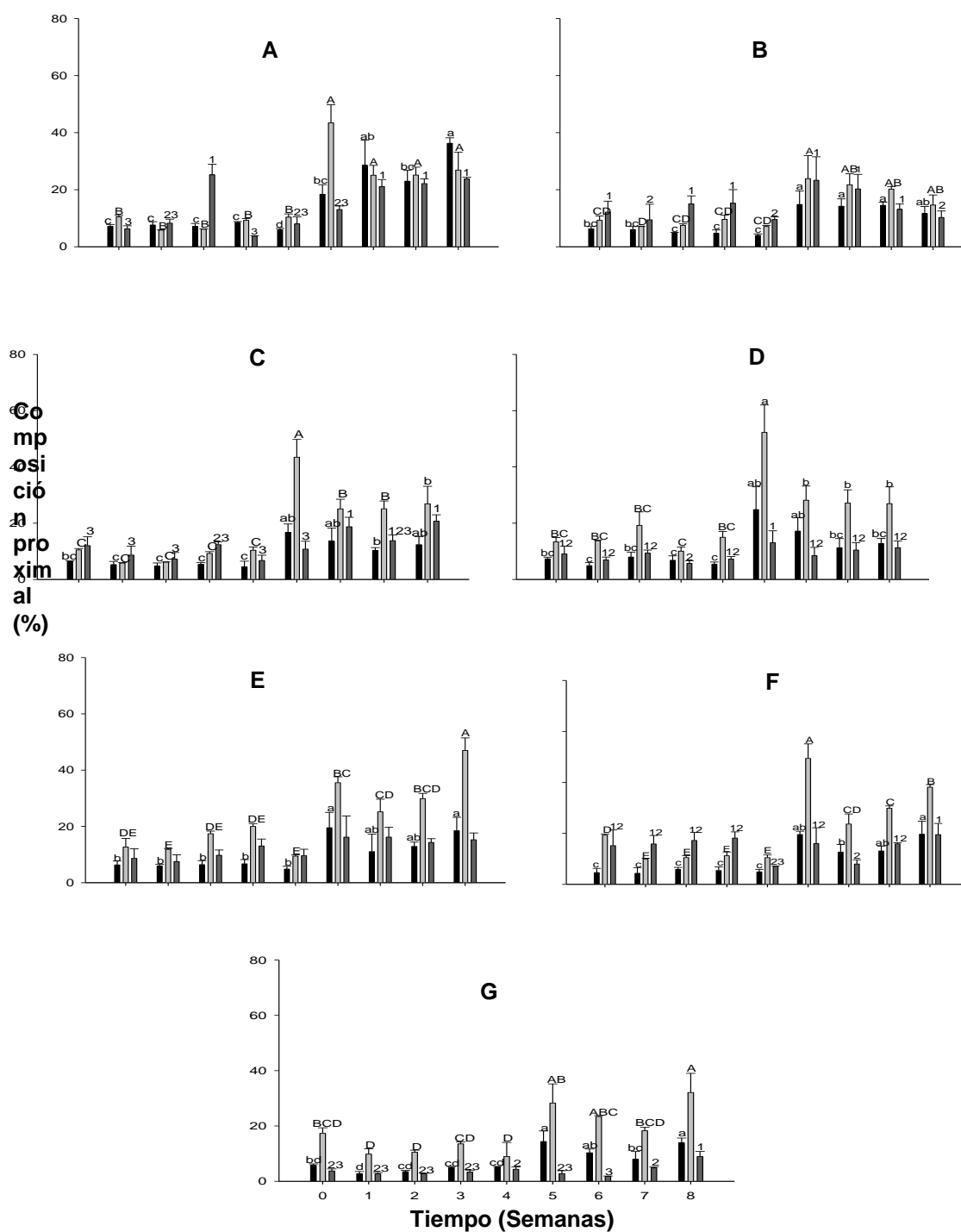


Figura 6. Composición proximal de (■) proteínas, (▒) carbohidratos y (□) lípidos, en las especies A) *Nitzschia laevis* (cepa A); B) *Nitzschia laevis* (cepa B); C) *Nitzschia thermalis* var. *minor*; D) *Navicula biskanterae*; E) *Nitzschia frustulum*; F) *Nitzschia* cf. *fonticola*; G) *Navicula incerta*, durante ocho semanas de almacenamiento en frío. Letras minúsculas-mayúsculas y números diferentes indican diferencias significativas para proteínas, carbohidratos y lípidos. Anova de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$; $A>B>C>D$ y $1>2>3$.

IV.3.2 Peso seco orgánico

Se puede observar en la Figura 7 que para la especie *N. laevis* cepa A hay una disminución significativa ($P < 0.05$), en el peso seco orgánico (PSO) de las células hacia el final de la experimentación, lo cual coincide con la disminución en la densidad celular mencionada al inicio del capítulo (IV.1.1). Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los valores de peso seco medidos en el inicio ($533 \mu\text{g ml}^{-1}$) (sin almacenamiento en frío) y durante las semanas de almacenamiento en frío (Figura 7 A). Esta tendencia de disminución de PSO hacia las últimas semanas se encontró también en las especies *N. thermalis*, *N. frustulum* y *N. fonticola* (Figura 7 C, E, F).

En la especie *N. laevis* cepa B, hay un decremento de los valores respecto al tiempo de almacenamiento hasta la semana cuatro y posteriormente un aumento significativo en el contenido del PSO ($P < 0.05$) (Figura 7 B).

Para *N. byskanterae* durante la semana cinco hay una disminución significativa ($P < 0.05$) en PSO ($169 \mu\text{g ml}^{-1}$) con respecto a los valores obtenidos en las semanas anteriores y con los valores obtenidos en las siguientes semanas (Figura 7 D).

Se evaluó que *N. incerta* es la especie en donde resultaron menos cambios en los valores del PSO en el periodo de las ocho semanas de almacenamiento en frío, en donde el mayor PSO se obtuvo en la semana uno con $630 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Figura 7 G).

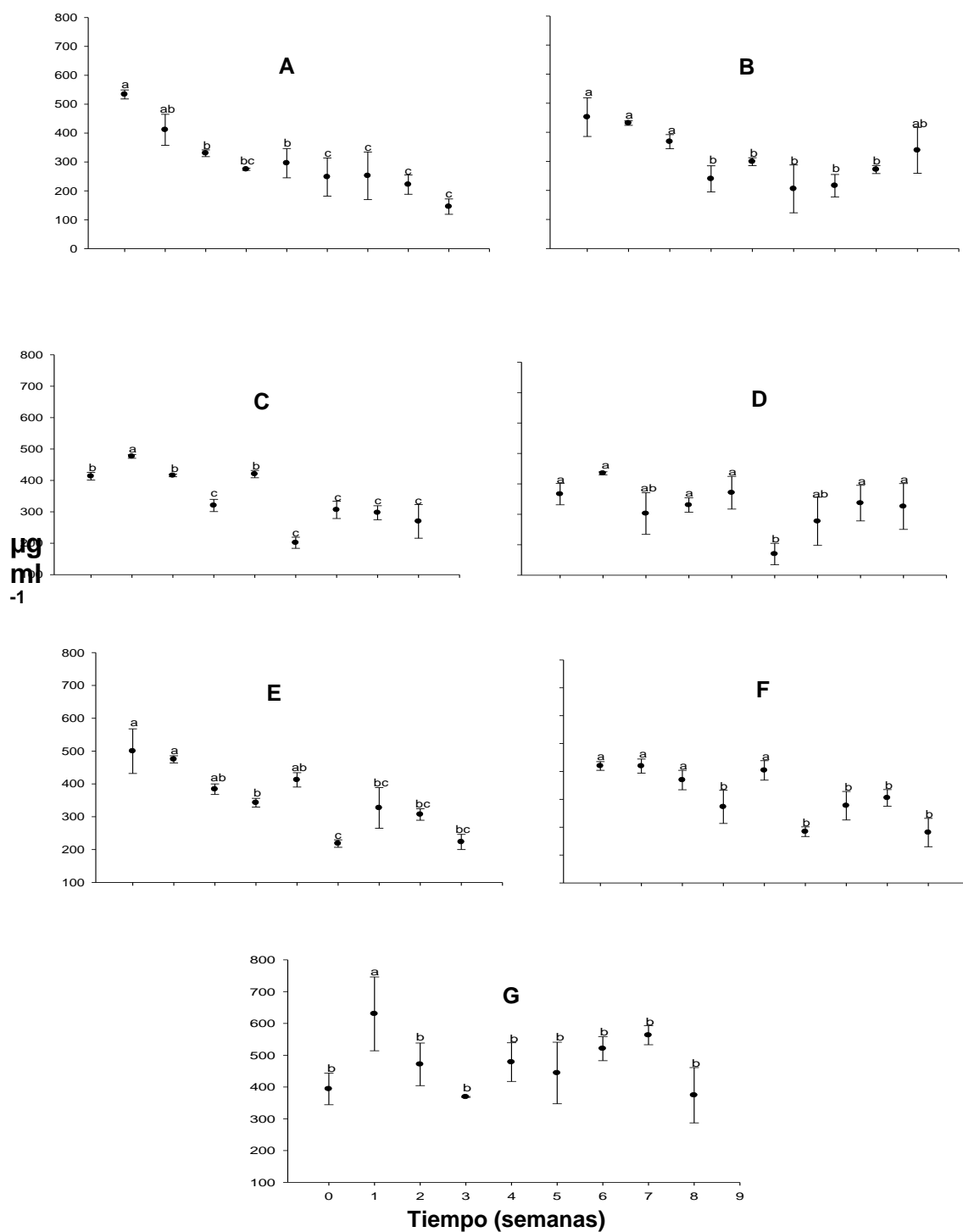


Figura 7. Valores promedio y desviación estándar del peso seco orgánico ($\mu\text{g ml}^{-1}$) en las especies A) *Nitzschia laevis* (cepa A); B) *Nitzschia laevis* (cepa B); C) *Nitzschia thermalis* var. *minor*; D) *Navicula biskanterae*; E) *Nitzschia frustulum*; F) *Nitzschia* cf. *fonticola*; G) *Navicula incerta*, durante ocho semanas de almacenamiento en frío. Anova de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c$.

IV.4. Bioensayo de alimentación de poslarvas de abulón rojo con diatomeas frescas y conservadas en frío

De las siete especies de diatomeas ensayadas originalmente para ser almacenadas en frío, se eligieron cinco de acuerdo a los mejores resultados de viabilidad en el crecimiento, estas fueron: *Nitzschia thermalis* var. *minor*, *Navicula byskanterae*, *Nitzschia frustulum* var. *perminuta*, *Nitzschia* cf. *fonticola* var. *pelagica* y *Navicula incerta*.

La calidad de agua durante el bioensayo se encontró dentro de los valores adecuados para el cultivo de poslarvas de abulón rojo. Los valores promedio y desviación estándar de nitrógeno amoniacal total para todos los tratamientos y durante el periodo experimental se situaron en valores menores a $0.23 \text{ mg l}^{-1} \pm 0.05$, pH fue 8.38 ± 0.31 , oxígeno fue de $5.23 \pm 0.20 \text{ mg l}^{-1}$, temperatura $20 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y salinidad 35 ± 1.08 ups.

IV.4.1 Longitud de poslarvas

Se tomó la longitud inicial al día cero en la cual la edad de las poslarvas era de aproximadamente 68 días. Como se puede observar en la figura 8 las longitudes iniciales tienen un intervalo de tallas entre 1800 a 2500 μm y fueron distribuidas aleatoriamente para ser alimentadas con los cultivos de las cinco especies de diatomeas.

Al utilizar la especie *Nitzschia thermalis* var. *minor* (Figura 8 A) como alimento para las poslarvas no se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.05$), en la longitud de las poslarvas alimentadas con diatomeas frescas y preservadas. Sin embargo, se puede observar que en la semana cuatro al final de la experimentación, hay un mayor aumento en la longitud de las poslarvas alimentadas con diatomeas preservadas en donde la longitud final fue de 2918 μm , mientras que en las poslarvas alimentadas con diatomeas frescas resultó de 2881 μm . Cabe mencionar que mediante un ANOVA factorial tampoco se

encontraron diferencias significativas entre la longitud de las poslarvas en ésta fecha.

En cuanto a la especie *Navicula byskanterae* utilizada como alimento para las poslarvas se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre la longitud de las poslarvas alimentadas con diatomeas frescas y preservadas. Resultaron significativamente mayores las poslarvas alimentadas con diatomeas preservadas (2900 μm), respecto a los obtenidos con diatomeas frescas (2800 μm). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en las longitudes de las poslarvas mantenidas en los distintos tratamientos y el tiempo de experimentación (Figura 8 B).

Los resultados obtenidos con *Nitzschia frustulum* mostraron que las longitudes de las poslarvas alimentadas con diatomeas preservadas fue de 2460 μm que resultó significativamente mayor ($P < 0.05$) a lo obtenido con diatomeas frescas (2162 μm). (Figura 8 F).

Al utilizar como alimento para las poslarvas los cultivos de las tres especies de diatomeas mencionadas anteriormente, se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.05$) en longitud a partir del día 14 de experimentación (Figura 8).

En la especie *Nitzschia cf. fonticola* no se encontró diferencia significativa en la longitud de las poslarvas por efecto de los tratamientos (2130 μm) ($P > 0.05$). Sin embargo, se observó diferenciación en las tallas al día 7, siendo mayor en las poslarvas alimentadas con diatomeas frescas hasta el día 28. No obstante, las longitudes de las poslarvas mantenidas en ambos tratamientos al final de la experimentación resultaron ser iguales con 2920 μm ($P > 0.05$) (Figura 8 D).

Para la diatomea *Navicula incerta* no se encontró diferencia significativa en la longitud de las poslarvas por efecto de los tratamientos. No se evaluó diferencia en la longitud inicial de las poslarvas mantenidas en los tratamientos ($P > 0.05$). A partir del día siete el tamaño de las poslarvas sigue una tendencia similar hasta el

día 28 de experimentación, teniendo una longitud promedio de 3042 μm para las poslarvas alimentadas con diatomeas frescas y de 3072 μm para las alimentadas con diatomeas preservadas (Figura 8 E).

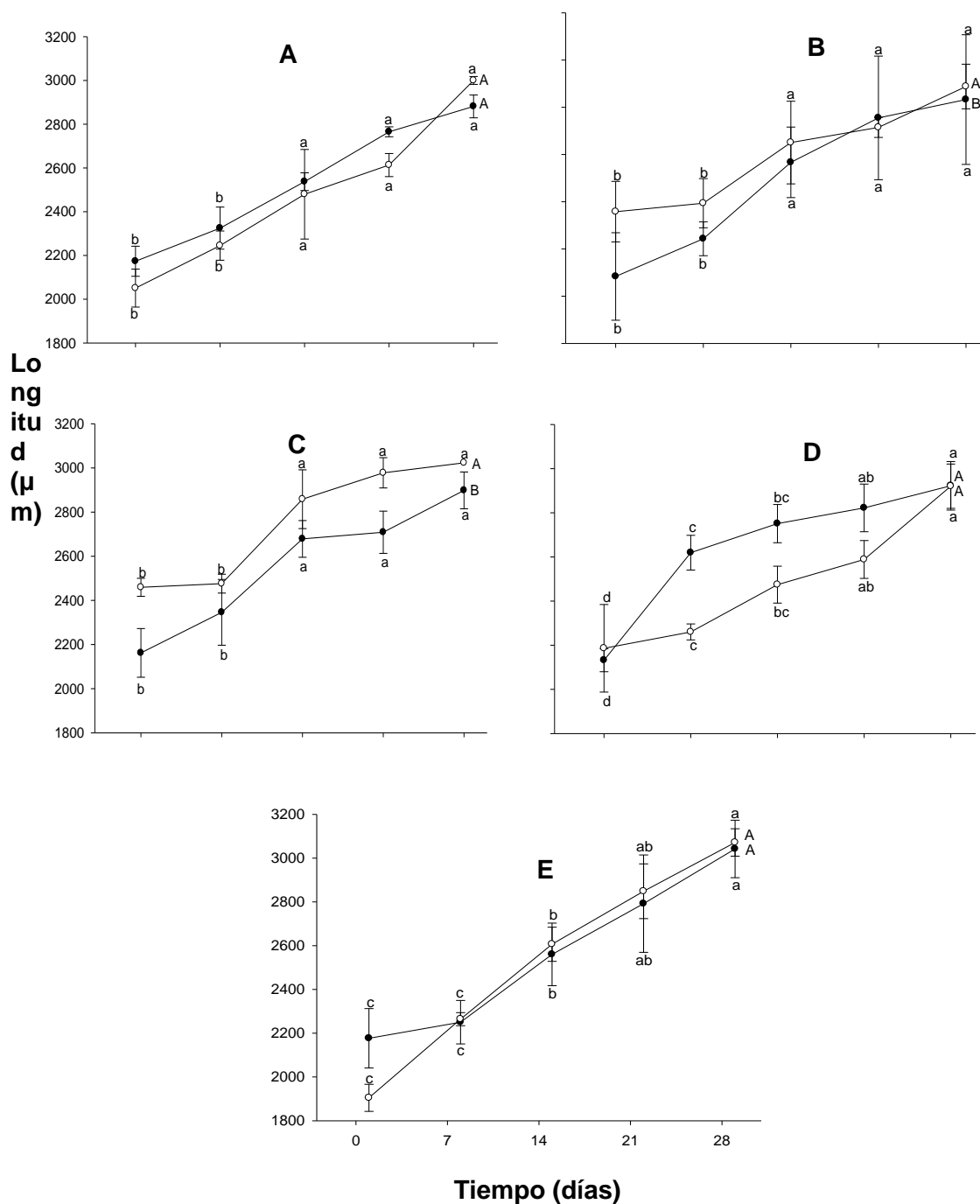


Figura 8. Valores promedio y desviación estándar de la longitud (μm) de poslarvas alimentadas con diatomeas frescas (●) y conservadas en frío (○) en las especies A) *Nitzschia thermalis* var. *minor*; B) *Navicula biskanterae*; C) *Nitzschia frustulum*; D) *Nitzschia* cf. *fonticola*; E) *Navicula incerta*, durante ocho semanas de almacenamiento en frío. Letras minúsculas indican diferencias significativas para longitud con respecto al tiempo y letras mayúsculas indican diferencias por tratamiento de almacenamiento. Anova factorial y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$; $A>B$.

IV.4.2 Tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento de las poslarvas mantenidas en el bioensayo fue muy variable durante el periodo de estudio en todos los tratamientos (Figura 9).

En las cinco especies de diatomeas las tasas de crecimiento son significativamente mayores ($P < 0.05$) en los primeros 14 días de experimentación. En la especie *Nitzschia thermalis* var. *minor* la tasa de crecimiento en las poslarvas alimentadas con diatomeas frescas, presentó un aumento progresivo hasta el día 21 en donde la tasa de crecimiento es de $32.2 \mu\text{m d}^{-1}$ y posteriormente disminuye al final de la experimentación a la mitad ($16.5 \mu\text{m d}^{-1}$). Contrario a esto sucede con las poslarvas alimentadas con diatomeas preservadas, ya que hay un aumento en la tasa de crecimiento desde el inicio hasta el día 14 ($33.5 \mu\text{m d}^{-1}$), después hay una disminución al día 21 y posteriormente un aumento significativo el día 28 finalizando con una tasa de crecimiento de $50.7 \mu\text{m d}^{-1}$. No se encontraron diferencias significativas entre las tasa de crecimiento por tratamiento ($P > 0.05$), pero sí se encontraron diferencias en cuanto al tiempo de experimentación ($P < 0.05$) (Figura 9 A).

La tasa de crecimiento de las poslarvas alimentadas con las diatomeas frescas de la especie *Navicula byskanterae* tuvo su máximo al día 14 de experimentación ($46.2 \mu\text{m d}^{-1}$), y se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre la tasa de crecimiento de las poslarvas alimentadas con la diatomea fresca y almacenada en frío ($26.5 \mu\text{m d}^{-1}$) (Figura 9 B).

Con la especie *Nitzschia frustulum* se obtuvo una tasa de crecimiento mayor en las poslarvas al día 14 de experimentación en ambos tratamientos ($P < 0.05$). La tasa de crecimiento para las poslarvas alimentadas con diatomeas almacenadas en frío fue de $54.6 \mu\text{m d}^{-1}$ y posteriormente disminuyó, finalizando con una tasa de crecimiento de $4.4 \mu\text{m d}^{-1}$. Mientras que para las poslarvas alimentadas con diatomeas frescas, la tasa de crecimiento máxima al día 14 fue de $48.6 \mu\text{m d}^{-1}$

disminuyendo al día 21 a $4.2 \mu\text{m d}^{-1}$ y de nuevo aumentando al día 28 a $27.1 \mu\text{m d}^{-1}$ (Figura 9 C).

En cuanto a la tasa de crecimiento obtenida al utilizar como alimento *Nitzschia cf. fonticola*, se encontraron diferencias significativamente mayores ($P < 0.05$) al día 7 con respecto a los siguientes días, con valores promedio de $69.6 \mu\text{m d}^{-1}$ con diatomeas frescas y de $37.8 \mu\text{m d}^{-1}$ con diatomeas conservadas en frío (Figura 9 D).

Con la diatomea *Navicula incerta* se obtuvieron las tasas de crecimiento significativamente ($P < 0.05$) mayores durante el periodo experimental. Las tasas de crecimiento para las poslarvas alimentadas con *N. incerta* conservada en frío alcanzó su máxima al día 14 con $63.1 \mu\text{m d}^{-1}$, que posteriormente disminuyó a $26 \mu\text{m d}^{-1}$ al día 21 y de nuevo tuvo un aumento a $31.8 \mu\text{m d}^{-1}$ al día 28. Se obtuvo una tendencia similar para las tasas de crecimiento de las poslarvas alimentadas con diatomeas frescas, ya que los valores máximos también fueron al día 14 con $44.3 \mu\text{m d}^{-1}$, disminuyendo posteriormente a $33.1 \mu\text{m d}^{-1}$ al día 21 y finalizando en $35.7 \mu\text{m d}^{-1}$. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) con respecto al tiempo de experimentación y tampoco por efecto de los tratamientos (Figura 9 E).

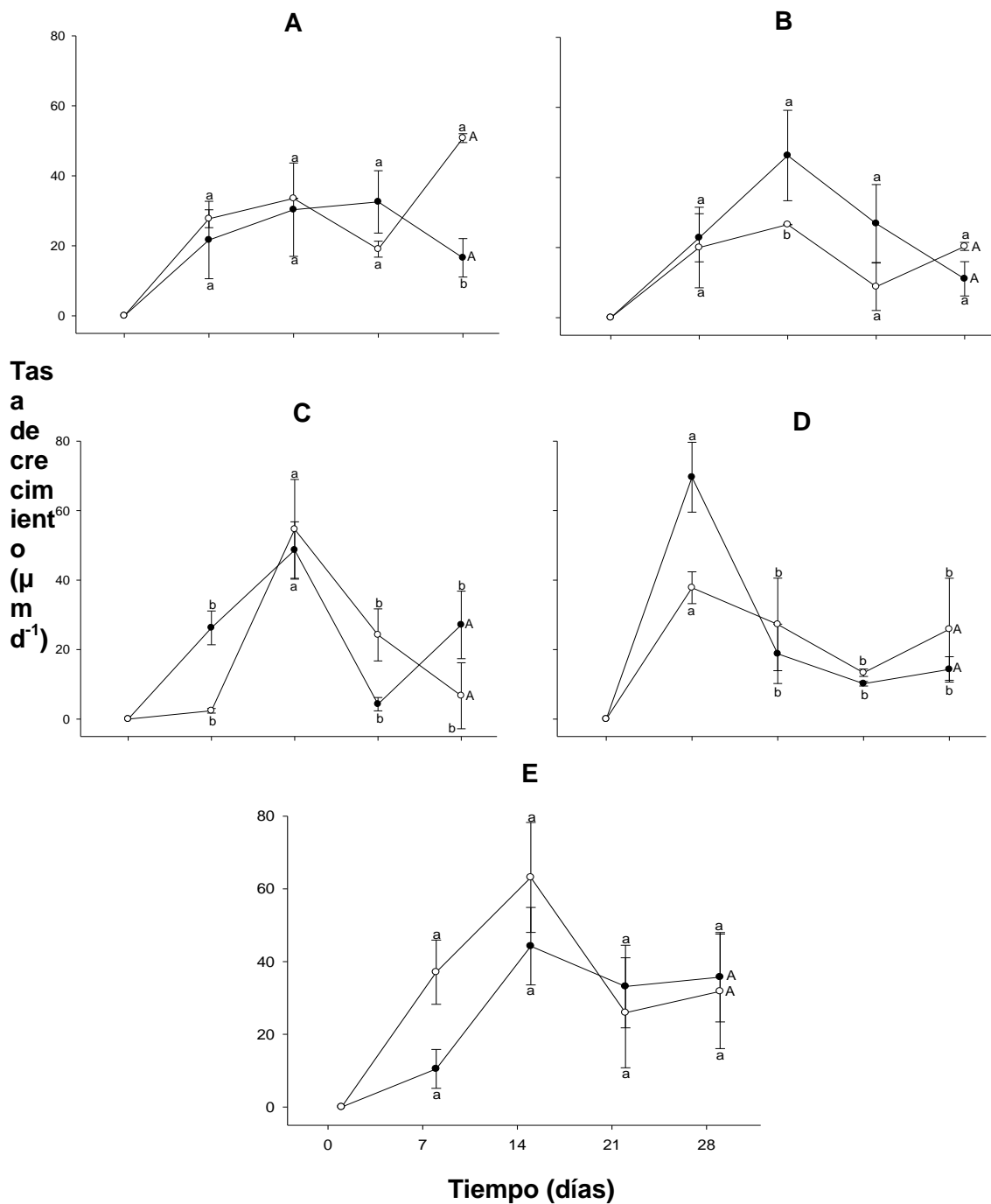


Figura 9. Valores promedio y desviación estándar de la Tasa de crecimiento ($\mu\text{m d}^{-1}$) de poslarvas alimentadas con diatomeas frescas (●) y conservadas en frío (○) en las especies A) *Nitzschia thermalis* var. *minor*; B) *Navicula biskanterae*; C) *Nitzschia frustulum*; D) *Nitzschia* cf. *fonticola*; E) *Navicula incerta*, durante ocho semanas de almacenamiento en frío. Letras minúsculas indican diferencias significativas para longitud con respecto al tiempo y letras mayúsculas indican diferencias por tratamiento de almacenamiento. Anova factorial y prueba a posteriori de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$; $A>B$.

No se encontró diferencia significativa ($P>0.05$) en la longitud inicial de las poslarvas mantenidas en los tratamientos, excepto para la especie *N. frustulum* (Tabla III).

Con la diatomea *N. incerta* se obtuvo una significativamente ($P<0.05$) mayor tasa de crecimiento de poslarvas en ambas condiciones experimentales (diatomeas frescas y preservadas), esto durante 28 días del periodo de alimentación, incluso se alcanzó una tasa de crecimiento de $41.6 \mu\text{m d}^{-1}$ en las poslarvas alimentadas con *N. incerta* preservada (Tabla III). Con la especie *N. thermalis* preservada también se obtuvo una de las tasas de crecimiento mayores ($30.9 \mu\text{m d}^{-1}$), caso contrario sucede con la misma especie en condiciones frescas ya que se obtuvo la menor tasa de crecimiento ($25.2 \mu\text{m d}^{-1}$) (Tabla III).

Tabla III. Longitud inicial (Li), longitud final (Lf) (μm) y tasa de crecimiento (TC, $\mu\text{m d}^{-1}$) de poslarvas alimentadas durante 28 días con cinco especies de diatomeas frescas y conservadas en frío. Letras minúsculas indican diferencias significativas para Li entre frescas y conservadas en frío, letras mayúsculas indican diferencias en Lf y números entre TC. Anova de una vía y prueba a posteriori de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b$; $A>B$; $1>2$.

Especie	Frescas			Conservadas en frío		
	Li	Lf	TC	Li	Lf	TC
<i>Nitzschia thermalis</i> var. <i>minor</i>	2173 \pm 68 ^a	2881 \pm 52 ^A	25.2 \pm 8 ¹	2050 \pm 66 ^a	2917 \pm 22 ^A	30.9 \pm 3 ¹
<i>Navicula byskanterae</i>	2083 \pm 71 ^a	2832 \pm 42 ^A	26.7 \pm 2 ¹	2357 \pm 94 ^a	2888 \pm 56 ^A	18.9 \pm 1 ²
<i>Nitzschia frustulum</i>	2162 \pm 62 ^b	2898 \pm 83 ^B	26.2 \pm 2 ¹	2459 \pm 62 ^a	3023 \pm 0 ^A	20.1 \pm 2 ²
<i>Nitzschia</i> cf. <i>fonticola</i>	2132 \pm 52 ^a	2922 \pm 45 ^A	28.2 \pm 3 ¹	2186 \pm 36 ^a	2920 \pm 40 ^A	26.2 \pm 3 ¹
<i>Navicula incerta</i>	2176 \pm 48 ^a	3042 \pm 35 ^A	30.8 \pm 2²	1904 \pm 61 ^a	3071 \pm 62 ^A	41.6 \pm 1¹

IV.4.3 Tasa de supervivencia

No se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) en la tasa de supervivencia de las poslarvas por efecto del tiempo de medición, a partir del día 14. Posteriormente ésta disminuyó en los tratamientos con diatomeas preservadas (Figura 10).

Se encontraron diferencias significativas ($P<0.05$) en la tasa de supervivencia de las poslarvas entre tratamientos, siendo mayor en las poslarvas alimentadas con diatomeas frescas (Figura 10).

La mayor tasa de supervivencia fue del 97% en las poslarvas alimentadas con diatomea fresca de las especies *Nitzschia thermalis* var. *minor*, *Nitzschia* cf. *fonticola* y *Navicula incerta* (Figura 10 A,D,E). La menor tasa de supervivencia de las poslarvas al utilizar como alimento cultivos de diatomeas frescas fue con la especie *Navicula byskanterae* con el 87% de poslarvas vivas (Figura 10 B).

Para el tratamiento con diatomeas preservadas la mayor tasa de supervivencia (64%) se logró al utilizar como alimento las especies *Nitzschia* cf. *fonticola* (Figura 10 F) y *Nitzschia thermalis* var. *minor* (64%) (Figura 10 C).

Al utilizar como alimento las diatomeas preservadas de las especies *N. incerta* y *N. frustulum* la tasa de supervivencia fue del 46%, siendo la más baja de todos los tratamientos (Figura 10).

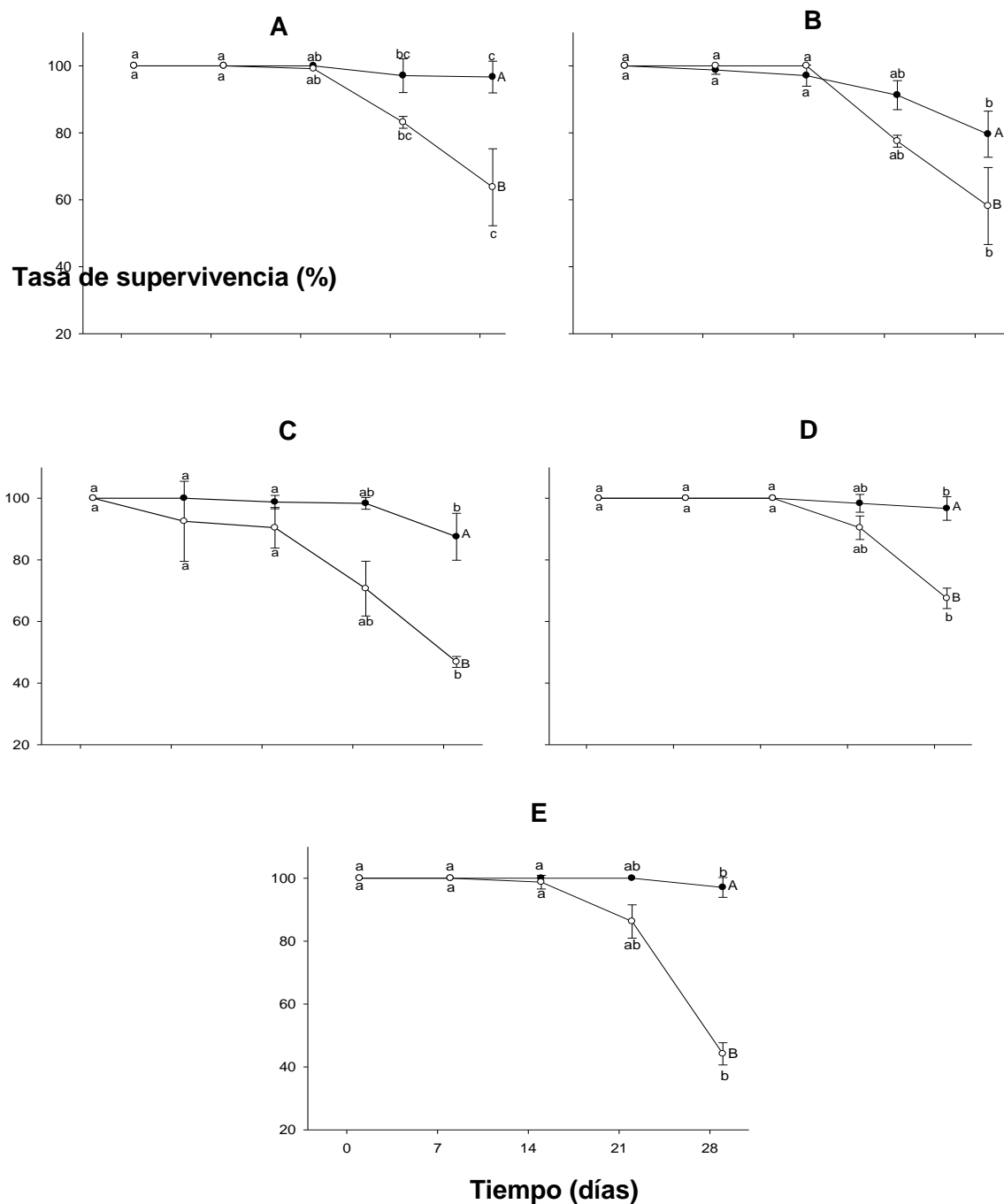


Figura 10. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de supervivencia de postlarvas alimentadas con diatomeas frescas (●) y conservadas en frío (○) en las especies A) *Nitzschia thermalis* var. *minor*; B) *Navicula biskanterae*; C) *Nitzschia frustulum*; D) *Nitzschia* cf. *fonticola*; E) *Navicula incerta*, durante ocho semanas de almacenamiento en frío. Letras minúsculas indican diferencias significativas para longitud con respecto al tiempo y letras mayúsculas indican diferencias por tratamiento de almacenamiento. Anova de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$; $A>B$.

Capítulo V

Discusión

Una de las principales tareas de las colecciones de cultivos de microalgas es proporcionar inóculos viables para la investigación, estudios de ecología y para fines comerciales, como lo son la alimentación con una buena calidad nutricional de larvas y juveniles de moluscos y crustáceos principalmente para fines acuícolas (Becker, 2004; Volkman y Brown, 2006).

V.1 Viabilidad de diatomeas conservadas en frío

Resultados positivos de almacenamiento a bajas temperaturas en distintas especies de microalgas que mantienen su viabilidad para el crecimiento han sido referidos con éxito en distintos trabajos (Molina-Grima *et al.*, 1994; Montaini *et al.*, 1995; Heasman *et al.*, 2000; Sánchez-Saavedra, 2006; Núñez-Zarco y Sánchez-Saavedra, 2011).

La viabilidad para el crecimiento en las siete especies de diatomeas bentónicas estudiadas se vio afectada de forma diferente para cada especie y de acuerdo al tiempo de almacenamiento en frío a 4 °C. *Nitzschia laevis* cepa A y B presentaron viabilidad las primeras cuatro semanas de almacenamiento en frío ($\mu \approx 0.4$). Para ambas especies se encontró que su densidad celular y por lo tanto la tasa de crecimiento específica bajan hasta casi detener su crecimiento. Mientras que durante la semana inicial (cero) y sin almacenamiento en frío la tasa de crecimiento fue mayor a 0.8 divisiones por día. Núñez-Zarco y Sánchez-Saavedra (2011), encontraron viabilidad para el crecimiento de *Nitzschia laevis* después de ocho semanas de almacenamiento en frío a 4 °C con tasas de crecimiento superiores a 0.5 divisiones por día, lo cual indica que la viabilidad para el

crecimiento de las células tiene especificidad de acuerdo a la especie y al tiempo de almacenamiento en frío.

Las cinco especies restantes *Nitzschia thermalis* var. *minor*, *Nitzschia* cf. *fonticola* var. *pelagica*, *Nitzschia frustulum* var. *perminuta*, *Navicula byskanterae* y *Navicula incerta* siguen una tendencia de disminución en la densidad celular hasta la semana cuatro y posteriormente un aumento. Este resultado coincide con lo encontrado en trabajos similares para la especie *N. incerta* por Núñez-Zarco y Sánchez-Saavedra (2011), quienes evalúan una densidad celular menor ya que ellos utilizaron una menor cantidad de nutrientes (medio f/2). Sánchez-Saavedra (2006) menciona una tasa de crecimiento de 0.30 divisiones por día para *N. incerta* en fresco y no obtuvo diferencias significativas al ser almacenada por cuatro semanas en frío a 4 °C. Debido a lo anterior, esta especie fue utilizada como control en el presente estudio, en el cual se obtuvieron tasas de crecimiento mayores a 0.4 divisiones por día durante las ocho semanas de almacenamiento en frío y utilizando una menor cantidad de silicatos (medio f) que la sugerida por Sánchez-Saavedra (2006) (medio 2f).

Correa-Reyes *et al.* (2001) mencionan tasas de crecimiento en divisiones por día de 0.4 (*N. thermalis*), 0.57 (*N. laevis* cepa A), 0.37 (*N. laevis* cepa B), 0.09 (*N. incerta*), 0.02 (*N. fonticola*) y 0.14 (*N. frustulum*) para los primeros seis días de cultivo en fresco, siendo estas menores que las mencionadas en el presente estudio en condiciones de cultivo similares. Se encontró que incluso con menor cantidad de luz y nutrientes, a bajas temperaturas la actividad celular de la diatomea marina *Haslea ostrearia* se detiene y la viabilidad no se pierde debido a que no se requiere de un suministro continuo de nutrientes (Gaudin y Lebeau, 2006).

Se han descrito diversas estrategias fisiológicas que pueden explicar la viabilidad para el crecimiento que mantienen las especies de diatomeas bentónicas estudiadas en esta investigación, si se comparan con especies de microalgas que

están expuestas continuamente a ambientes fríos por encontrarse en mares polares, en nieve sobre montañas como *Thalassiosira antarctica*, *T. rotula*, *Chloromonas* y *Chlamydomonas* spp. Estas son fotosintéticamente activas en un ambiente de menos del 1% de incidencia de luz durante cinco meses (Lizotte y Priscu, 1992; Laybourn, 2002). Además han desarrollado respuestas fisiológicas a la aclimatación por cambios térmicos en el ambiente las cuales son dependientes de sensores y señales moleculares e implican modulaciones en las tasas de transcripción y transducción de enzimas, para compensar la reducción en las tasas de reacción química a bajas temperaturas (Morgan *et al.*, 2006). En general, una reducción de 10 °C en la temperatura de crecimiento de las células, disminuye de dos a tres veces las tasas de reacciones bioquímicas. Por lo tanto, la actividad de una enzima en organismos mesófilos (temperatura óptima de crecimiento entre 20 y 45 °C) pueden reducirse hasta 80 veces cuando la temperatura de crecimiento pasó de 37 °C a 0 °C.

La aclimatación a la vida a bajas temperaturas es vía el estrés, en donde se observa un aumento en la expresión de enzimas desaturasas y ha sido documentada en organismos poiquilotermos tales como bacterias, algas, plantas y animales (Hazel, 1984; Aguliar *et al.*, 1992; Domergue *et al.*, 2003). En estas estrategias de adaptación, los dobles enlaces se introducen post-síntesis en un ácido graso a través de una desaturación vía aeróbica sobre los lípidos de la membrana de ésta manera los organismos aumentan la cantidad de ácidos grasos insaturados y por lo tanto las membranas mantienen su fluidez a bajas temperaturas. En el género de cianobacterias *Synechocystis* la expresión de tres desaturasas (*desA*, *desB* y *desD*) es inducible a bajas temperaturas (Morgan *et al.*, 2006). Posiblemente este tipo de mecanismos ha sido realizado y ha permitido la aclimatación de las especies de diatomeas bentónicas descritas en este estudio las cuales tienen viabilidad en el crecimiento después de ser almacenadas en frío durante ocho semanas.

El tamaño de las células de las siete especies de diatomeas aumentó después de las ocho semanas de almacenamiento en frío, excepto para la especie *N. laevis* cepa A en la cual la longitud de las células en fresco es mayor a la longitud de las células después de ser almacenadas en frío. Sin embargo, el ancho de estas células fue mayor al final de las ocho semanas de almacenamiento, éste cambio celular ya ha sido descrito anteriormente para otras especies de diatomeas al ser almacenadas en frío (Sánchez-Saavedra, 2006; Núñez-Zarco y Sánchez-Saavedra, 2011). Los cambios en el tamaño de las células evaluados para ciertas especies de diatomeas después del almacenamiento en frío (4 °C y oscuridad) puede atribuirse al cambio de metabolismo y almacenamiento de nutrientes dentro de las células (Núñez-Zarco y Sánchez-Saavedra, 2011). El aumento del tamaño de las diatomeas pudo ser debido a la disminución del metabolismo y en consecuencia afectar la reproducción (decreció o no ocurrió), por lo que incrementó el tamaño de las células. El aumento en el tamaño de células del fitoplancton por efecto de carencia de nutrientes está documentado en diversas especies y la respuesta es una disminución del tamaño celular para hacer más eficiente el uso de los nutrientes y de la luz (Sunda y Huntsman, 1997; Hall y Pearl, 2011). En este estudio las células no disminuyeron de tamaño a pesar de haber carencia de luz, posiblemente porque las diatomeas fueron almacenadas con medio de cultivo (medio f, Guillard y Ryther, 1962) y a pesar de encontrarse en altas densidades los requerimientos de nutrientes fueron suficientes para promover el mantenimiento de las células con capacidad de recuperar su crecimiento.

En el caso de las diatomeas mantenidas a bajas temperaturas (4 °C), con poca luz y en oscuridad absoluta se reduce la actividad metabólica y se ha encontrado un aumento en el tamaño de hasta un 20% (Gaudin y Lebeau, 2006).

La especie con mayor contenido de clorofila *a* y carotenos fue *N. incerta*, incluso al final en la semana ocho se obtuvo la mayor cantidad (0.35 mg ml⁻¹). Estos resultados coinciden con los de otros autores, un aumento en la cantidad de

clorofila *a* que oscilo en 10% (Pane *et al.*, 1998) hasta el 200% (Lau *et al.*, 1998), lo cual indica la presencia de células vivas en las condiciones experimentales.

Una de las variables ambientales que puede perturbar el equilibrio entre la entrada y consumo de energía para los procesos fisiológicos y producir alteraciones fotosintéticas es la baja temperatura. Cualquier ajuste fenotípico de las propiedades funcionales o estructurales del aparato fotosintético puede ser modulado por la temperatura y se denomina temperatura de aclimatación a la fotosíntesis (Maxwell *et al.*, 1994).

Las células del fitoplancton mantenidas en oscuridad crecerán lentamente debido a sus condiciones limitadas de luz, pero hará que la mayor parte de esa en energía luminosa sea asequible al producir un sistema más eficiente de captura de luz (Marshall, 1991), esto implica el incremento de 2 a 10 veces más el contenido de clorofila y carotenos en la célula como respuesta al estrés producido. Este tipo de estrategia fisiológica debió de haber ocurrido en las células de las diatomeas almacenadas en oscuridad y a 4 °C, lo que explica que a pesar de mantenerse en oscuridad las células mantuvieron el nivel de clorofila igual que en la semana inicial del experimento (semana cero) e incluso aumentó esta cantidad hacia las semanas siete y ocho.

En un estudio sobre la fisiología de dos especies de *Thalassiosira* que habitan el polo sur, mencionan que se forman diatomeas en reposo o estado de latencia, cuando se encuentran en condiciones de bajas temperaturas y en oscuridad por un largo periodo. Se encontró que éstas diatomeas son morfológicamente iguales a células activas, pero fisiológicamente en latencia, tienen citoplasma más denso y la pigmentación más oscura, los rangos de respiración y la capacidad fotosintética son reducidos rápidamente y retenidos por varios meses (Peters y Thomas, 1996). Esta respuesta de latencia en las células microalgales es muy importante, ya que al bajar su metabolismo no requieren de un continuo aporte de nutrientes y al estar

en oscuridad el proceso metabólico disminuye y aparentemente el proceso reproductivo se detiene o minimiza.

V.2 Análisis proximales

Diversos estudios comprueban la factibilidad de manipular la composición bioquímica de las microalgas variando condiciones de cultivo. Por ejemplo cultivando las microalgas con luz de diferente composición espectral, variando la concentración de nutrientes, cosechando las microalgas en fase exponencial o estacionaria, pero los efectos pueden variar de una especie a otra y aún en la misma especie, con ligeros cambios en las condiciones de cultivo (Whyte, 1987; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1994; Muller-Feuga *et al.*, 2007).

La composición bioquímica de las microalgas es modificada significativamente por el medio en donde crecen y por las técnicas de preservación utilizadas para su conservación (Lourenço *et al.*, 1997; Morist *et al.*, 2001). En las ocho semanas de almacenamiento en frío se observó que la composición bioquímica varió significativamente en las siete especies evaluadas, presentando menor cantidad de proteínas, carbohidratos y lípidos en las primeras cuatro semanas de almacenamiento incluyendo la semana de inicio del ensayo (semana cero) en donde la composición proximal se evaluó con diatomeas frescas. A partir de la quinta semana de almacenamiento se observó un cambio significativo de aumentar la composición bioquímica en todas las especies (Figura 6), por consecuencia en el mecanismo fisiológico el peso seco disminuye a partir de la semana cinco en todas las especies de diatomeas (Figura 7).

Estos resultados difieren de los encontrados por Sánchez-Saavedra (2006) quien encontró una mayor concentración de proteínas, incluso para la especie control *N. incerta*. La concentración de carbohidratos en este estudio es el doble de los mencionados por dicho autor. Mientras que Núñez-Zarco y Sánchez-Saavedra (2011), encontraron mayor cantidad de lípidos para esta especie a partir de la semana cuatro de almacenamiento en frío. Dichas diferencias pueden ser debidas

a la densidad celular que se utilizó para obtener la composición proximal, mayor en el trabajo realizado por Sánchez-Saavedra (2006) para la especie *N. incerta* con una densidad celular de 7×10^6 cel ml⁻¹ y menor en la investigación de Núñez-Zarco y Sánchez-Saavedra (2011) con $\approx 3.5 \times 10^5$ cel ml⁻¹. En este estudio se encontró que la tendencia en la densidad celular, es proporcional a la tendencia que sigue la composición proximal en las siete especies de diatomeas bentónicas preservadas en frío (Figura 6).

Los valores de carbohidratos (15%) y lípidos (10%) en la semana inicial (sin preservación en frío (semana cero), coinciden con los resultados descritos por Simental-Trinidad *et al.*, (2001) y Correa-Reyes *et al.* (2001) para las especies de los géneros *Nitzschia* spp. y *Navicula* spp. que encontraron una mayor concentración de proteínas. Las densidades celulares obtenidas para estas especies de diatomeas en estos trabajos son muy similares a las que se obtuvieron en este estudio. La única diferencia que hay entre estos ensayos es que los autores antes mencionados utilizaron una mayor concentración de silicatos (2f) y pudo ser la causa que contribuyera a una mayor síntesis metabólica de proteínas. El silice es un nutriente muy necesario para las diatomeas, en su ausencia la división de células de *Cyclotella cryptica* cesa y la síntesis de proteínas y ADN se inhibe, la fotosíntesis y la glicólisis se reducen y la síntesis de lípidos se mejora. La disminución de la síntesis de proteínas puede atribuirse a una deficiencia en la síntesis de aminoácidos por el glutamato. Hay evidencia que los silicatos regulan la expresión genética y dos de las cuatro DNA polimerasas en *Cylindrotheca fusiformis* son sintetizadas por suministro de silicato (Round *et al.*, 2000).

La fijación total de CO₂ disminuye a bajas intensidades de luz, el porcentaje del carbono fijado que se incorpora en las proteínas aumenta y disminuye el porcentaje de este elemento que se incorpora en carbohidratos, caso contrario a mayores intensidades de luz donde la síntesis de carbono excede la tasa de síntesis de proteínas y el exceso de carbono se almacena como carbohidrato

(Marshall, 1991). El almacenamiento en frío durante las ocho semanas se realizó en oscuridad, la mayor parte del compuesto que se sintetizan en la fase oscura de la fotosíntesis es glucosa (Marshall, 1991), esto en respuesta a que el mayor componente bioquímico encontrado en las siete especies de diatomeas fueron los carbohidratos. Las células aunque si bien podían encontrarse en una fase baja de metabolismo pudieron sintetizar glucosa para obtener energía y mantener su respiración mitocondrial.

V.3 Crecimiento y supervivencia de poslarvas de abulón *H. rufescens*

Se ha observado una alta tasa de supervivencia y un mejor crecimiento poslarval de *H. rufescens* a 16-18 °C (Martínez-Ponce y Searcy-Bernal, 1998), lo cual está dentro del intervalo de temperatura registrada durante el transcurso de este experimento ($18 \pm 2^\circ\text{C}$) y una concentración de oxígeno no menor a 3 mg l⁻¹ la cual se encuentra en los intervalos considerados como óptimos para el mantenimiento del cultivo larval de esta especie de abulón (Leighton, 1974; Hahn, 1989). Los valores de la calidad de agua y los parámetros ambientales se situaron dentro del rango de valores descritos para el cultivo de poslarvas de abulón rojo (Roberts *et al.*, 2000).

Los cultivos de diatomeas conservadas en frío proporcionados como alimento a las poslarvas de abulón, resultaron estar libres de bacterias tipo *Vibrio* spp. En otros estudios se ha evaluado que pueden alcanzar concentraciones elevadas en las biopelículas de diatomeas y causar altas mortalidades de abulones (Anguiano-Beltrán *et al.*, 1998; Lizárraga-Partida *et al.*, 1998).

Muchos factores intervienen en el crecimiento de las poslarvas y juveniles de abulón, entre ellos se incluye la densidad de cultivo, el tipo y la cantidad del alimento y la temperatura. Un alto rendimiento en el crecimiento y alta tasa de supervivencia son los elementos de mayor importancia económica en el cultivo de abulón, ya que los costos disminuyen mientras mayor es la tasa de crecimiento y de supervivencia (Chen, 1984; Hahn, 1989; Uki, 1989).

En tres de las cinco especies utilizadas para la alimentación de las poslarvas de abulón en este bioensayo (*N. thermalis*, *N. fonticola* y *N. incerta*), no se obtuvieron diferencias significativas en la longitud de poslarvas en cuanto a la condición del alimento (fresco o conservado en frío); en las especies *N. frustulum* y *N. byskanterae* si se presentaron diferencias en la longitud de las poslarvas y resulto mayor la obtenida con la alimentación de diatomeas conservadas en frío a 4 °C. Este es un resultado muy importante, ya que se muestra que es posible utilizar inóculos conservados en frío por un periodo de hasta de ocho semanas para la alimentación de poslarvas de abulón y obtener un buen rendimiento en crecimiento, incluso con la especie *N. byskanterae* la cual no se había utilizado anteriormente para alimentar este tipo de moluscos, ya que es una especie de aguas cálidas (28 °C). Correa-Reyes *et al.* (2001), encontraron una mayor longitud de las poslarvas de abulón rojo alimentadas con las diatomeas en fresco de las especies *N. incerta* y *N. laevis* al ser suministradas durante 50 días de experimentación. Los resultados obtenidos por estos últimos autores mencionados, son similares a los obtenidos en este trabajo, excepto en que la mayor longitud se obtuvo alimentando a las poslarvas de abulón con diatomeas conservadas en frío de las especies *N. incerta* y *N. thermalis*, lo cual sugiere que el valor nutricional de las diatomeas que fueron conservadas en frío afecta de manera directa el crecimiento poslarval.

En este trabajo los valores máximos en las tasa de crecimiento, se detectaron en los primeros 14 días para las cinco especies de diatomeas utilizadas como alimento, y se obtuvieron las mayores tasas de crecimiento de las poslarvas alimentadas con las diatomeas conservadas en frío de las especies *N. incerta* (41.6 $\mu\text{m d}^{-1}$) y *N. thermalis* (30.9 $\mu\text{m d}^{-1}$) comparadas estas con las especies en fresco *N. incerta* (30.8 $\mu\text{m d}^{-1}$) y *N. thermalis* (25.2 $\mu\text{m d}^{-1}$). Los resultados antes mencionados se encuentran cerca del promedio de crecimiento 49.7 $\mu\text{m d}^{-1}$ obtenidos para poslarvas de abulón rojo por Pérez-Muñoz (1995) evaluadas en granjas comerciales de la región. Sin embargo, el valor promedio de crecimiento

antes indicado es considerado a partir del primer día de asentamiento de las poslarvas, en donde las tasas de crecimiento son mayores en los primeros 30 días posasentamiento y las poslarvas con las que se trabajó en este estudio fue a partir de los 40 días después del asentamiento. En la literatura relacionada con crecimiento de poslarvas de abulón, no se encontró un trabajo comparable con la edad de las poslarvas utilizadas en este estudio.

Durante el transcurso del experimento se observó una importante heterogeneidad en el crecimiento de las poslarvas a medida que transcurrió el tiempo, lo cual también ha sido observado por diversos autores (Hooker y Morse, 1985; Hahn, 1989), lo cual pudo haber influido en subestimar las mediciones de crecimiento de las poslarvas, ya que estas se tomaban considerando la selección de los organismos al azar cada semana para llevar a cabo el análisis de esta variable.

La menor tasa de supervivencia se obtuvo alimentando a las poslarvas con las diatomeas conservadas en frío de las especies *N. incerta* y *N. frustulum* (46%). Searcy-Bernal *et al.* (1992) consideran que la tasa de supervivencia de poslarvas de abulón en las granjas de cultivo en general es del 10% en los primeros dos meses después del asentamiento. Mientras que Leighton (2000), menciona tasas de supervivencias del 20 a 40%, por lo que las tasas de supervivencias obtenidas en este trabajo son más altas que estos porcentajes mencionados por otros autores para la misma especie de abulón en condiciones de cultivo. En los cinco tratamientos experimentales con las poslarvas alimentadas con diatomeas conservadas en frío, hubo una tasa de supervivencia menor con diferencias significativas a partir del día 14 respecto a la tasa de supervivencia en poslarvas alimentadas con diatomeas en fresco, esto sucedió con las cinco especies estudiadas.

En las granjas de producción de abulón ubicadas en Eréndira B.C., se utiliza la diatomea bentónica, *Navicula incerta*, como principal aporte de alimento de

poslarvas. Este género es considerado altamente digerible incluso por poslarvas menores a 500 μm Kawamura *et al.* (1998).

Kawamura *et al.* (1995) destacan que el valor nutricional de las diatomeas se relaciona con la capacidad de las poslarvas de romper las células con su rádula durante el pastoreo. Altas tasas de crecimiento en poslarvas de abulón se relacionan con la capacidad para digerir eficientemente las diatomeas a su paso por las paredes del intestino, posiblemente influenciada por la morfología de la diatomea y la dureza de la frústula (Hahn, 1989). Se ha sugerido que las diatomeas bentónicas suministradas como alimento para poslarvas de abulón deben tener tamaños menores a 10 μm y una fuerte adhesión al sustrato (Norman-Boudreaeu *et al.*, 1986). Al analizar el contenido estomacal de poslarvas de abulón, por medio de bioensayos de selectividad, y con el uso de microscopía electrónica se ha demostrado que el tamaño de las diatomeas no es fundamental en la selección del alimento (Kawamura *et al.*, 1995; Daume *et al.*, 1997; Argumedo-Hernández *et al.*, 2010).

La disminución de la tasa de supervivencia, estimada por conteos, se atribuye al daño causado por el oxímetro al momento de hacer la toma de esta variable, ya que en algunas unidades experimentales se observaron poslarvas muertas con rupturas de concha.

Capítulo VI

Conclusiones

Las especies de *Nitzschia laevis* cepa A y *Nitzschia laevis* cepa B, presentan viabilidad para el crecimiento después de ser almacenadas durante cuatro semanas en frío a 4 °C.

Las especies *Nitzschia thermalis* var. *minor*, *Navicula byskanterae*, *Nitzschia frustulum*, *Nitzschia* cf. *fonticola* y *Navicula incerta* tienen viabilidad para el crecimiento después de ser almacenadas durante ocho semanas en frío a 4 °C.

La composición proximal aumenta a partir de la semana cinco de almacenamiento en frío obteniendo una mayor cantidad de carbohidratos en las siete especies estudiadas.

No se obtuvo una amplia variabilidad en el contenido de pigmentos a lo largo de las ocho semanas de almacenamiento en frío en cada una de las siete especies de diatomeas bentónicas.

Las especies *Nitzschia thermalis* var. *minor*, *Navicula byskanterae*, *Nitzschia frustulum*, *Nitzschia* cf. *fonticola* y *Navicula incerta* conservadas en frío durante ocho semanas, tienen alto potencial para ser utilizadas como alimento ya que promueven el crecimiento de las poslarvas de abulón rojo.

Las siete especies de diatomeas bentónicas estudiadas después de ser almacenadas durante ocho semanas en frío (4°C), se encuentran libres de bacterias tipo *Vibrio*, por lo que pueden ser utilizadas como alimento para poslarvas de abulón.

\

Capítulo VII

Recomendaciones

Realizar estudios acerca de la fisiología de las diatomeas después de ser almacenadas en frío a 4 °C durante un largo periodo de tiempo, para conocer el posible daño producido en las células y los mecanismos fisiológicos por los cuales se mantienen viables las células.

Realizar análisis más específicos acerca de la composición proximal de las diatomeas almacenadas en frío, con este conocimiento se podrían satisfacer los requerimientos nutricionales de diversos organismos en cultivo.

Es conveniente realizar bioensayos de alimentación de poslarvas de abulón con las diatomeas conservadas en frío, desde la etapa de asentamiento para conocer las tasas de crecimiento y tasa de supervivencia en etapas tempranas de vida.

Es necesario hacer estudios similares a los ya realizados utilizando diatomeas preservadas como alimento de poslarvas de abulón, pero en una escala comercial y evaluar la aplicación de los resultados de este estudio a la práctica comercial de cultivo de abulón y otros moluscos.

Realizar ensayos de alimentación con otras especies de poslarvas de abulón con diatomeas preservadas en frío a 4 °C.

Hacer un análisis de los costos de producción del cultivo de diatomeas de forma tradicional y con el método alternativo de preservación en frío a 4 °C.

Capítulo VIII

Literatura Citada

- Aguilar-May, B. 2002. Remoción de nutrientes con microalgas marinas en un medio equivalente al efluente tipo promedio de una granja camaronícola. Tesis de Maestría. Departamento de Acuicultura, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, Baja.
- Anguiano-Beltrán, C., Searcy-Bernal, R. y Lizárraga-Partida, M.L. 1998. Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone (*Haliotis rufescens*). *Disease of Aquatic Organisms*, 33: 111-118.
- Araújo, C.V.M., F.R. Díaz, I. Moreno-Garrido, L.M. Lubián y J. Blasco. 2008. Effects of cold-dark storage on growth of *Cylindroteca closterium* and its sensitivity to copper. *Chemosphere*, 72: 1366-1372.
- Argumedo-Hernández, U., D. Siqueiros-Beltrones y M.P. Sánchez-Saavedra. 2010. Non-selective diatom grazing by juveniles of red abalone (*Haliotis rufescens* Swainson, 1822) under experimental culture conditions. *Journal of Shellfish Research*, 29(4):1-8.
- Becker W. 2004. Microalgae for aquaculture, the nutritional value of microalgae for aquaculture. En: Richmond A (ed.). *Microalgae Culture, biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Oxford. 380–391 pp.
- Bligh, E.G. y W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. Journal of Biochemistry and Physiology*, 37:911-917.
- Cabrera, S. y V. Montecino. 1987. Productividad primaria en ecosistemas límnicos. *Archivos de Biología y Medicina Experimental*, 20:105-116.

- Cañabate, J.P. y L.M. Lubián. 1995. Relationship between cooling rates, cryoprotectant concentrations and salinities in the cryopreservation of marine microalgae. *Marine Biology*, 124: 325–334.
- Carbajal-Miranda, M.J. 2002. Evaluación del crecimiento de postlarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) utilizando como alimento una dieta monoespecífica y una dieta mixta de diatomeas bentónicas. Tesis de Maestría. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada Baja California México. 81 pp.
- Carbajal-Miranda, M., M.P. Sánchez-Saavedra y J.A. Simental. 2005. Effect of monospecific and mixed benthic diatom cultures on the growth of red abalone *Haliotis rufescens* (Swainson 1822). *Journal of Shellfish Research*, 24(2):401-405.
- Chen, H.C., 1984. Studies on the aquaculture of small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, in Taiwan. En: Liao, I.C., Hirano, R. (Eds.), *Proceeding of ROC-Japan Symposium on Mariculture*, vol. 1. Tungkang Marine Laboratory Press, Pintung, Taiwan, 143–159 pp.
- Chiaverini, J. 1972. Techniques d'extraction et d'analyse des lipides. Université de Paris et Marie Curie, Paris. Station Zoologique Ville France Sur Mer. Notes de Travail 12: 12 pp.
- Cordero-Esquivel, V. y D. Voltolina-Lobina. 1996. Nutritional value of preserved microalgae for subadult *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27:113-118.
- Correa-Reyes, J.G. 2001. Selección de especies de diatomeas bentónicas para el cultivo del abulón. Tesis de Doctorado. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada Baja California México. 135 pp.

- Correa-Reyes, G., M.P. Sánchez-Saavedra, D. Siqueiros-Beltrones, N. Flores-Acevedo. 2001. Isolation and growth of eight strains of benthic diatoms cultured under two light conditions. *Journal of Shellfish Research*, 20:603-610.
- Correa-Reyes, G., M.P. Sánchez-Saavedra, T. Viana, N. Flores-Acevedo y C. Vásquez-Peláez. 2009. Effect of eight benthic diatoms as feed on the growth of red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae. *Journal of Applied Phycology*, 21(4):387-393.
- Cotteau, P. y P. Sorgeloos. 1992. The use of alga substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve mollusks. *Journal Shellfish Research*, 11:467-476.
- Daume, S., S. Brand y W.J. Woelkerling. 1997. Effects of postlarvae abalone (*Haliotis rubra*) grazing on the epiphytic diatom assemblage of coralline red algae. *Molluscan Research*, 18:119-130.
- DIFCO Manual. 1984. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Tenth Edition, 1155 pp.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28:350-356.
- Domergue, F., P. Spiekermann, J. Lerchl, C. Beckmann, O. Kilian, P. G. Kroth, W. Boland, U. Zahringer, y E. Heinz. 2003. New insight into *Phaeodactylum tricornutum* fatty acid metabolism. Cloning and functional characterization of plastidal and microsomal delta12-fatty acid desaturases. *Plant Physiology*, 131:1648–1660.
- Ebert, E.E. y J.L. Houk. 1984. Elements and innovation in the cultivation of red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture*, 39: 375-392.

- Fogg, G.E. y B.J. Thake. 1978. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. Third Edition. University of Wisconsin Press, London. 269 pp.
- Gaudin, P. y T. Lebeau. 2006. Microalgal cell immobilization for the long-term storage of the marine diatom *Haslea ostrearia*. *Journal of Applied Phycology*, 18: 175-184.
- Guillard, R.L.L y J.H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal Microbiology*, 8:229-239.
- Hahn, K.O. 1989. *Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods*. CRC Press Boca Raton, Florida. 348 pp.
- Hall N. y H. Paerl. 2011. Vertical migration patterns of phytoflagellates in relation to light and nutrient availability in a shallow microtidal estuary. *Marine Ecology Progress Series*, 425: 1-19.
- Hazel, J. R. 1984. Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *American Journal of Physiology*, 246:460–470.
- Heasman, M., J. Diemar, W. Connor, T. Sushames, y L. Foulkes. 2000. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve mollusks. *Aquaculture Research*, 31:637–659.
- Hemerick, G. 1973. Mass culture. 255-273. En: Stein, J.R. (Ed.). *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurement*. Cambridge University Press, New York, USA. 448 pp.
- Hooker, N. y D.E. Morse. 1985. Abalone. The emerging development of commercial cultivation in the United States. En: Hunter, J. V. y E. E. Brown, (Ed.), *Crustacean and Mollusc Aquaculture in the United States*, Avi Publishers, Westport, 356-413 pp.

- Kawamura, T., y H. Takami. 1995. Analysis of feeding and growth rate of newly metamorphosed abalone *Haliotis discus hannai* fed four species of benthic diatom. *Fisheries Science*, 61:357-358.
- Kawamura, T., Rodney, D., R y H. Takami. 1998. A review of the feeding and growth of postlarval abalone. *Journal of Shellfish Research*, 17(3): 615-625.
- Koven, W. M., Kissil, G.W. y A. Tandler. 1989. Lipid and (n-3) requirement of *Sparus aurata* larvae during starvation and feeding. *Aquaculture*, 79: 185-189.
- Knauer, J. y P.C. Southgate. 1999. A review of the nutritional requirements' of bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*, 7: 241-280.
- Lau, P., N. Tam y J. Wong. 1998. Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 63:115–121.
- Laybourn, J. 2002. Survival mechanisms in Antarctic lakes. *Philosophical Transaction Royal Society London Biological Science*, 357:863–869.
- Lourenço, S. O.; U. Marquez.; J. Mancini-Filho; E. Barbarino y E. Aidar. 1997. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparision of two culture media. *Aquaculture*, 148, 153-158.
- Leighton, D.L. 1974. The influence of temperature on larval and juvenile growth in three species of southern California abalones. *Fishery Bulletin*, 72 4: 1137-1145.
- Leighton, L.D. 2000. *The Biology and Culture of the California Abalones*. Pittsburgh Pennsylvania: Dorrance Publishing Co., Inc. 216 pp.
- León-Carballo, G. y M. Muciño-Díaz. 1996. Pesquería del Abulón. En: Casas-Valdez, M. y G. Ponce-Díaz. (Eds.). *Estudios del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Volumen II*. Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, México. 15-41 pp.

- Lizárraga-Partida, M.L., C. Anguiano-Beltrán, R. Searcy-Bernal y E. Vázquez-Moreno. 1998. Bacterial water quality in abalone farms of Baja California. *Journal of Shellfish Research*, 17:689-692.
- Lizotte, M. P., y J. C. Priscu. 1992. Photosynthesis-irradiance relationships in phytoplankton from the physically stable water column of a perennially ice-covered lake (Lake Bonney, Antarctica). *Journal of Phycology*, 28:179–185.
- Lowry, O.H., Rosebrought, N.J., Farr, A.L. y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry*, 193:265-275.
- Malara, G. y R. Charra. 1972a. Dosages des proteines particulaires selon la méthode de Lowry. Université de Paris. Station Zoologique. Villefrenche-Sur-Mer. Notes de Travail 6:11 pp.
- Malara, G. y R. Charra. 1972b. Dosages des glucides particulaires de phytoplankton selon la methode de Dubois. Université de Paris. Station Zoologique. Villefrenche-Sur-Mer. Notes de Travail 6:12 pp.
- Marshall, D. 1991. *Biologia de las algas, enfoque fisiológico*. Limusa. México. 236 pp.
- Martínez-Ponce, D.R. y R. Searcy-Bernal. 1998. Grazing rates of red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae feeding on the benthic diatom *Navicula incerta*. *Journal Shellfish Research*, 17:627-630.
- Maxwell, D., S. Falk, C. Trick, y N. Huner. 1994. Growth at low temperature mimics high-light acclimation in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiology*, 105:535–543.
- McLellan, M. R. 1989. Cryopreservation of diatoms. *Diatom Research*, 4: 301-318.
- Miranda-Saucedo, C.M. 2009. Sobrevivencia y crecimiento de postlarvas y juveniles de *Haliotis rufescens* con diferentes rutinas de alimentación con *Navicula incerta*. Tesis de Licenciatura. Departamento de Biología Marina.

- Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, Baja California, Sur. 56 pp.
- Mock, T., and H. Hock. 2005. Long-term temperature acclimation of photosynthesis in steady-state cultures of the polar diatom *Fragilariopsis cylindrus*. *Photosynthesis Research*, 85:307–317.
- Molina-Grima, E., J.A Sánchez-Pérez, F. García-Camacho, F.G. Acién-Fernández, D. López-Alonso y C.L. Segura-del Castillo. 1994. Preservation of the marine microalga *Isochrysis galbana*; influence on the fatty acid profile. *Aquaculture*, 123: 377-385.
- Montaini E., G. Chini, M.R. Tredici, E. Molina, J.M. Fernández Sevilla y J.A. Sánchez. 1995. Long term preservation of *Tetraselmis suecica*: influence of storage on viability and fatty acid profile. *Aquaculture*, 134: 81-90.
- Morist, A., J. Montesinos, J. Cusidó y F. Gódia. 2001. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochemistry*, 37: 535-547.
- Morgan R., L. Priscu, T. Pockock, L. Gudynaite y N. Huner. 2006. Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70: 222-252.
- Morris, G.J. 1976. The cryopreservation of *Chlorella* 2. effect of growth temperature on freezing tolerance. *Archives of Microbiology*, 107: 309–312.
- Morris, G.J., Clarke K.J. y Clarke A. 1977. The cryopreservation of *Chlorella*. Effect of heterotrophic nutrition on freezing tolerance. *Archives of Microbiology*, 114: 249-254.
- Muller A., J. Maol y R Kass. 2007. The microalgae of aquaculture. 201-252 pp. En: *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Stfftrup J. y L. Mcevov. (Ed.). Blackwell Science Oxford. 318 pp.

- Norman-Boudreau, K., D. Burns, C.A. Cooke y A. Austin. 1986. A simple technique for detection of feeding in newly metamorphosed abalone. *Aquaculture*, 51:313-317.
- Numaguchi, K. y J.A. Nell. 1991. Effects of gelatin acacia microcapsule and alga meal supplementation of alga diets on growth rates of Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* larvae. *Aquaculture*, 94: 65-78.
- Nuñez-Zarco E. y M.P. Sánchez-Saavedra. 2011. Cold storage of six marine benthic diatoms native to the Mexico Pacific Coast. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42: 530-538.
- Pande, S.V., R.P. Khan, y T.A. Venkitasubramanian. 1963. Microdeterminations of lipids and serum total acids. *Analytical Biochemistry*, 6:415-423.
- Pane L, M. Feletti, C. Bertino y A. Carli. 1998. Viability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* grown free and immobilized in alginate beads. *Aquaculture International*, 6:411-420.
- Parsons, T.R., Y. Maita y C.M. Lalli. 1984. *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Pergamon Press, Oxford. 193 pp.
- Pérez-Muñoz, G.E., 1995. El Cultivo de abulón en México: Desarrollo histórico, estado actual y sus perspectivas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Ensenada, Baja California, México. 121 pp.
- Peters, E. y D.N. Thomas. 1996. Prolonged darkness and diatom mortality I: Marine Antarctic species. *Journal Experimental Marine Biology Ecology*, 207: 25-41.
- Ponce-Díaz, G., E. Chávez-Ortíz y M. Ramade-Villanueva. 2000. Evaluation of the green abalone *Haliotis fulgens* fishery in Bahía Asunción, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas*. 26(3): 393-412.

- Ponce-Díaz, G., S. Sánchez-Hernández y E. Yuen-Sánchez. 2003. Alternativas para fortalecer la cadena productiva de la pesquería del abulón. La Paz, México. CONAPESCA-CIBNOR. 157 pp.
- Ponis E., G. Parisia, G. Chini Zittellib, F. Lavistac, R. Robertd y M.R. Tredicic, *Pavlova lutheri*. 2008. Production, preservation and use as food for *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*, 282 (1-4): 97-103.
- Renaud, C.B., K. Kaiser, M. Comba, S. Metcalfe. 1995. Comparison between lamprey ammocoetes and bivalve molluscs as biomonitors of organochlorine contaminants. *Can. Journal Fishery and Aquatic Science* 52:276-282.
- Roberts, R., Kawamura, T., Takami, I., 2000. Diatoms for abalone culture: a workshop for abalone farmers. Prepared for 4th International Abalone Symposium. Capetown, South Africa. February. Cawthron Report No. 547. Cawthron Institute, New Zealand. pp. 28.
- Roland, W.G. y T.A. Boadley. 1990. A manual for producing oyster seed by remote setting. Ministry for Agriculture and Fisheries, Victoria, BC, Canada. 125 pp.
- Round, F., R. Crawford y D. Mann. 2000. The diatoms: biology and morphology of the genera. Cambridge University Press. 751 pp.
- SAGARPA. 2008. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2007. México. 219 pp.
- Salas-Garza, A. y R. Searcy-Bernal. 1992. Desarrollo y estado actual del cultivo del cultivo de abulón en México. pp. 538-545. En: Shepherd S.A.,M..J. Tegner y S.A. Guzmán del Proo (Eds.). *Abalone of the World. Biology, Fisheries and Culture*. Fishing News Books. 645 pp.

- Sánchez-Saavedra, M.P. y D. Voltolina. 1994. Cultures of *Pavlova lutheri* (Droop) Green (Prymnesiophyta) in diluted wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 6(3):285-288.
- Sánchez-Saavedra, M.P. 2006. The effect of cold storage on cell viability and composition of two benthic diatoms. *Aquacultural Engineering*, 34:131-136.
- Searcy-Bernal, R., Salas-Garza, A. E., Flores-Aguilar, R.A. e Hinojosa-Rivera, P.R. 1992. Simultaneous comparison of methods for settlement and metamorphosis induction in the red abalone (*Haliotis rufescens*). *Aquaculture*, 105:241:250.
- Seguineau, C., Laschi-Loquerie, A., Moal, J. y Samain, J., 1996. Vitamin requirements in great scallop larvae. *Aquaculture International*, 4: 315-324.
- Shilling, F.M., O. Hoegh-Guldberg y D.T. Manahan. 1996. Sources of energy for increased metabolic demand during metamorphosis of abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca). *Biology Bulletin*, 191:402-411.
- Simental-Trinidad, J.A. 2002. Enriquecimiento de láminas de *Macrocystis pyrifera* con películas de *Navicula incerta* y su utilización como alimento para abulón (*Haliotis* spp.). Tesis de Doctorado. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada Baja California México. 112 pp.
- Siqueiros-Beltrones, D. y D. Voltolina. 2000. Grazing selectivity of red abalone *Haliotis rufescens* postlarvae on benthic diatom films under culture conditions. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31: 239-246.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1979. *Biometría. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica*. H Blume Ediciones. 832 pp.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-344. En: Stein, J. (Ed.). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge University Press, London. 448 pp.

- Souza, F.M.L.D., R. M. Knuckey, S. Hohmann y R.C. Pendrey. 2002. Flocculated microalgae concentrates as diets for larvae of the tiger prawn *Penaeus monodon* FABRICIUS. *Aquaculture Nutrition*, 8:113–120.
- Sunda W. y S. Huntsman. 1997. Interrelated influence of iron, light and cell size on marine phytoplankton growth. *Nature*, 390: 389-392.
- Uki, N. 1989. Abalone seedling and its theory (1). *International journal of the Aquaculture and Fisheries Technology*, 1: 3-15.
- Volkman J.K. y M. R. Brown. 2006. Nutritional Value of Microalgae and Applications. In: Rao S (ed.). *Algal cultures, analogues of blooms and applications*. Science Publishers Inc New Hampshire. 407–457 pp.
- Voltolina, D. 1994. Cultivos de microalgas bentónicas para alimentación de juveniles de abulón (*Haliotis* spp.). 87-97. En: Siqueiros-Beltrones, D.A., D. Voltolina y A.M. Jaramillo-Lagorreta (Eds.). *Tópicos Selectos sobre Microalgas*. Serie Científica, 21:145.
- Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60: 231-241.
- Zar J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. 3 ed., Prentice-hall, Inc. Englewood Cliffs, N. 662 pp.