

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN  
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
EN ACUICULTURA**

---

**Efecto de dietas monoalgales y mixtas de *Isochrysis* sp. y  
*Chaetoceros calcitrans* en el desarrollo larval de la almeja  
*Panopea generosa***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Vincent Montes Orozco**

Ensenada, Baja California, México  
2014

Tesis defendida por

**Vincent Montes Orozco**

y aprobada por el siguiente Comité

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
Codirector del Comité

---

Dr. Enrique Valenzuela Espinoza  
Codirector del Comité

---

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua  
Chávez  
Miembro del Comité

---

Dra. Bertha Eugenia Lavaniegos  
Espejo  
Miembro del Comité

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
Coordinador del Posgrado en Ciencias  
en Acuicultura

---

Dr. Jesús Favela Vara  
Director de Estudios de Posgrado

*Septiembre 2014*

Resumen de la tesis de **Vincent Montes Orozco**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

**Efecto de dietas monoalgales y mixtas de *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros calcitrans* en el desarrollo larval de *Panopea generosa***

Resumen elaborado por:

---

Vincent Montes Orozco

La almeja generosa del Pacífico (*Panopea generosa*) es un recurso importante en la costa oeste de Baja California, México. Su pesquería inició hace 15 años aproximadamente y a la fecha se ha ido incrementando significativamente. Para prevenir la reducción de las poblaciones naturales debido a la captura intensiva, semillas de almeja generosa han sido producidas a través de la acuicultura para introducirlas en áreas sobreexplotadas. Sin embargo, actualmente la información sobre el uso de mezclas de microalgas en la alimentación de larvas de *Panopea generosa* es limitada. Por lo tanto, El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dietas monoalgales y mixtas de *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros calcitrans* en el crecimiento y supervivencia larval de la almeja *Panopea generosa*. Para ello, cada dos días se tomaron muestras de los cultivos larvarios en los diferentes tratamientos hasta que los organismos alcanzaron la metamorfosis. Además, se obtuvieron muestras de las microalgas *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros calcitrans* para evaluar el peso seco orgánico (PSO) y la composición proximal de las dietas. Los resultados mostraron que *Isochrysis* sp. tuvo mayor PSO, proteínas, carbohidratos y lípidos que *C. calcitrans* y la dieta mixta. La supervivencia observada al día 23 después de la fertilización fue 37% con la dieta mixta, seguida por las dietas monoalgales de *Isochrysis* sp. (26%) y *C. calcitrans* (4%) pero sin diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, sí se encontraron diferencias en la longitud dorso-ventral y antero-posterior, donde las larvas alimentadas con *Isochrysis* sp. y la dieta mixta registraron mayor tamaño que aquellos alimentados solo con *C. calcitrans*. Por lo tanto, se sugiere que la dieta monoalgal de *Isochrysis* sp. y la dieta mixta pueden ser usadas en la alimentación de larvas de *Panopea generosa*.

Palabras clave: **Dietas de microalgas, *Panopea generosa*, Desarrollo larval**

Abstract of the thesis presented by **Vincent Montes Orozco** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

**Monoalgal and mixed diets of *Isochrysis* sp. and *Chaetoceros calcitrans* on larval development of *Panopea generosa***

Abstract by:

---

Vincent Montes Orozco

The Pacific geoduck clam *Panopea generosa* is an important resource of northwestern coast of Baja California, México. The fishery of this species began 15 years ago, progressively increasing until now. To prevent the reduction of natural populations due to intensive harvest, young clams have been produced in hatcheries and introduced in overexploited areas. However, up to date, there are few information about *Panopea generosa* larval development using mixed microalgae diets. Thus, the objective of this study was the evaluation of mono-specific and mixed algal diets of *Isochrysis* sp. and *Chaetoceros calcitrans* on larval growth and survival of larvae of the geoduck clam (*Panopea generosa*). Samples from the different treatments were taken each two days until the metamorphosis of the organisms. In addition, samples of *Isochrysis* sp. and *Chaetoceros calcitrans* were obtained for ash-free dry weight (AFDW) and proximal composition evaluation of the diets. The results showed that *Isochrysis* sp. had AFDW, proteins, carbohydrates and lipids higher than *C. calcitrans* and the mixed diet. Larval survival at 23 day after fertilization was 37% when fed with a mixed diet, followed by the monoalgal diets of *Isochrysis* sp. and *C. calcitrans* (26 and 4% respectively), without significant differences among treatments. However, significant differences were found in dorso-ventral and antero-posterior length, where larvae fed with *Isochrysis* sp. and the mixed diet were larger than those fed with *C. calcitrans*. It is therefore, suggested that mono-specific diet of *Isochrysis* sp. and mixed diet can be used to fed larvae of *Panopea generosa*.

**Keywords: Microalgae diets, *Panopea generosa*, Larval development**

## **Dedicatorias**

### **María de Jesús Flores Bernal**

En este momento tan importante de mi vida me gustaría que estuvieras a mi lado y aunque no puedo verte ni oírte, puedo sentir tu presencia en mi corazón. Comprendo que no te has ido del todo y puedo ver algo de ti en cada uno de mis seres queridos. En este día especial te dedico este trabajo y todo lo que él representa.

Te amo mamá María ♥

### **Denzel, Camila, Génesis y Mauro**

Vivo recuerdo de mama maría, los llevo a cada uno dentro de mi corazón, lamento mucho el tiempo que he estado ausente en sus vidas. Sin embargo, quiero que sepan que siempre los amaré. Cuento los días para poder estar juntos.

Ustedes son mi motivación gorditos ♥

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca nacional para la realización de mis estudios de posgrado y la presente tesis.

Al Centro de investigación Científica y de Educación de Ensenada, Baja California (CICESE), al Posgrado en Ciencias en Acuicultura y en particular al Laboratorio de microalgas.

A mi directora Dra. Beatriz Cordero Esquivel, por aceptarme en su grupo de trabajo, por su paciencia, por buscar los medios para motivarme, por estar SIEMPRE disponible para cuestiones académicas y personales, por creer en mí más de lo que yo mismo he llegado a creer, sin ti no hubiera podido cumplir en tiempo y forma este compromiso. Muchas gracias Bety!!!

A mi director Dr. Enrique Valenzuela Espinoza, por ser un modelo a seguir, por fomentarme el gusto e iniciarme en la ciencia, por motivarme y por toda la sabiduría que ha compartido conmigo, por soportar mi comportamiento infantil, bueno por ser como un padre para mí. Gracias Enrique!!!

A mis sinodales, Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez y Dra. Bertha Eugenia Lavaniegos Espejo, por sus observaciones y sugerencias en la realización de este trabajo, además por la motivación dada para continuar trabajando, por sus consejos y recomendaciones. Gracias Doctoras!!!

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (UABC) por permitirme realizar la parte experimental de mi tesis en sus instalaciones, en especial al Laboratorio de producción de microalgas y medios de cultivo por recibirme y formarme.

Al Laboratorio Oceánica, por proporcionar los organismos para la realización de esta tesis, especialmente a José Carlos Garduño Franco, Enrique Valenzuela Wood y Ricardo Valenzuela Wood por la asesorías técnicas relativas al cultivo larvario de *P. generosa*, por sus consejos y recomendaciones.

Al Ocean. Filiberto Núñez Cebrero, por su apoyo en la realización de la parte experimental de mi tesis, por su comprensión, empatía y por aconsejarme en los momentos difíciles. Gracias Fily!!!

A los técnicos Biol. Mar. Adrián Celaya y Carlos Carballo, por su apoyo en la realización de análisis proximales, por la compañía y por salvar mi información de tesis. Muchas gracias!!!

A todo el personal académico, administrativo, de intendencia y de seguridad del Departamento de Acuicultura, por su apoyo, palabras de aliento y consejos dados en mi estancia por este Departamento, por soportarme y ayudarme en lo que necesitaba. Muchas gracias.

A mi madre Rosa María Orozco Flores, por enseñarme que mi único trabajo es estudiar, por criarme y aguantarme todos estos años, por todas las muestras de cariño, preocupación y motivación, por apoyarme en la realización de mi proyecto de vida.....en fin, por ser la mejor madre que uno podría pedir. Te amo mamá!!!

A mi padre Vicente Montes Torres, por su apoyo y palabras de aliento, por ser ejemplo de humildad y coraje, por enseñarme que siempre se puede comenzar de nuevo. Gracias papá!!!

A mis hermanas Evelin y Danely, por ser ejemplo de fuerza, voluntad, valor y amor, por inculcar valores y actitudes en mí, las cuales han sido vitales para que pudiera enfrentar el reto de vivir en un lugar nuevo, por la motivación ofrecida en forma de tan lindos niños (Denzel, Camila, Génesis y Mauro). Muchas gracias!!!

A mis hermanas de laboratorio Paty, Araceli y Miriam, por ser las mejores compañeras de laboratorio, por regañarme y obligarme a trabajar, por fungir como mis asesoras en tan importante etapa de mi vida, por todos los momentos agradables que pasé junto a ustedes, por muy sabias observaciones y recomendaciones. Gracias Betitas!!!

A Sofía León (Chequelete) y Brenda Bonet, por el apoyo brindado en la parte experimental de mi tesis, por soportarme, entenderme y haberme brindado su amistad, por ayudarme a sacar adelante esta tesis. Gracias chicas!!! Sin ustedes no lo habría logrado.

A mis compañeros de generación: Miguel, Melissa, Brenda, Montserrat, Anaid, Fabiola, Julio, Salvador, Jorge y Manolo, por todos los momentos de alegría, tristezas, frustraciones y porque no, de sana competencia. Gracias porque sin ustedes no podría haber concluido este proceso con éxito. Sé que a partir de estos momentos nuestros caminos se separan. Sin embargo, siempre los recordaré. Gracias Aqua runners!!!

A todos mis compañeros de posgrado y especialmente a Stefany, Lucia, Caro, Edgar, Candy, Robert, Rigo, por apoyarme y hacer más amena mi estancia en Acuicultura. Gracias!!!

A mis amigos Sr. Badillo, Fernando, Mireny, Romy, Ceres, Selene y Augusto, por aguantarme en mi estadía por la Green house, por sus consejos y por hacerme sentir en familia.

A la familia Dávila López (Alexis, Jona, Isabel y Doña Domi), por acogerme en su hogar y por tratarme como un miembro más de ellos, por esas tardes de café y noches de películas. Muchas Gracias!!!

A doña Chabelita, por la amistad ofrecida durante mis estudios de licenciatura y de grado, por decirme no lo que quería oír, sino lo que necesitaba escuchar, por sus regaños y recomendaciones.

A todos mis familiares, amigos y conocidos que directa o indirectamente han colaborado en que culmine esta etapa de mi vida con éxito. Gracias a todos!!!

# Contenido

	Página
<b>Resumen español</b> .....	iii
<b>Resumen inglés</b> .....	iv
<b>Dedicatorias</b> .....	v
<b>Agradecimientos</b> .....	vi
<b>Lista de Figuras</b> .....	x
<b>Lista de Tablas</b> .....	xi
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1 Producción mundial de bivalvos.....	1
1.1.1 Microalgas en la alimentación de moluscos bivalvos.....	2
1.1.2 Otras especies de interés comercial.....	4
1.2 Generalidades del género <i>Panopea</i> .....	4
1.2.1 Importancia económica.....	5
1.2.2 Clasificación taxonómica.....	5
1.2.3 Historia de vida .....	6
1.2.4 Distribución.....	7
1.2.5 <i>Panopea generosa</i> .....	8
1.3 Antecedentes.....	8
1.3.1 Estudios en almejas del género <i>Panopea</i> .....	8
1.3.1.1 Estudios en biología reproductiva.....	9
1.3.1.2 Estudios del desarrollo larval.....	10
1.3.2 Uso de dietas mixtas en el cultivo de moluscos bivalvos.....	12
1.4 Justificación.....	14
1.5 Objetivos.....	15
1.5.1 General.....	15
1.5.1.1 Particulares.....	15
1.6 Hipótesis.....	15
<b>2. Materiales y Métodos</b> .....	16
2.1 Cultivo de microalgas.....	16
2.1.1 Cultivo semicontinuo.....	16
2.1.2 Evaluación del cultivo de microalgas.....	17
2.1.2.1 Determinación de la densidad celular.....	17
2.1.2.2 Peso seco orgánico (PSO).....	17
2.1.2.3 Composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos).....	18



## Contenido (continuación)

	Página
2.2 Cultivo larvario de <i>Panopea generosa</i> .....	18
2.2.1 Observación del desarrollo temprano.....	18
2.2.2 Recepción y aclimatación de organismos.....	19
2.2.3 Ensayo de alimentación.....	20
2.2.4 Evaluación de la supervivencia.....	20
2.2.5 Evaluación de crecimiento (longitud y peso seco).....	21
2.3 Análisis estadístico.....	22
<b>3. Resultados</b> .....	<b>23</b>
3.1 Cultivo de microalgas.....	23
3.1.1 Peso seco orgánico.....	23
3.1.2 Contenido de proteínas.....	24
3.1.3 Contenido de carbohidratos.....	25
3.1.4 Contenido de lípidos totales.....	27
3.2 Cultivo larvario de <i>Panopea generosa</i> .....	27
3.2.1 Supervivencia larval.....	29
3.2.2 Crecimiento larval.....	30
3.2.2.1 Longitud.....	30
3.2.2.1.1 Tasa de crecimiento.....	32
3.2.2.1.2 Relación morfométrica DV/AP.....	33
3.2.2.2 Peso seco.....	34
3.2.2.2.1 Peso seco total.....	34
3.2.2.2.2 Peso seco orgánico.....	34
<b>4. Discusión</b> .....	<b>36</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>45</b>
<b>Lista de referencias</b> .....	<b>46</b>

## Lista de Figuras

Figura		Página
1	Distribución de los bancos pesqueros de la almeja <i>Panopea</i> spp. en México.....	7
2	Diseño experimental para el ensayo de alimentación larval de <i>Panopea generosa</i> . ISO-Cc: <i>Isochrysis</i> sp. y <i>Chaetoceros calcitrans</i> .....	20
3	Larva pediveliger de almeja <i>Panopea generosa</i> .....	21
4	Historia de vida de la almeja <i>Panopea generosa</i> .....	28
5	Supervivencia promedio (%) de larvas de <i>Panopea generosa</i> alimentadas con las microalgas <i>Isochrysis</i> sp., <i>Chaetoceros calcitrans</i> y la mezcla ISO-Cc. Las barras verticales indican el error estándar (n=3).....	29
6	Longitud dorso-ventral promedio ( $\mu\text{m}$ ) de larvas de <i>Panopea generosa</i> alimentadas con las microalgas <i>Isochrysis</i> sp., <i>Chaetoceros calcitrans</i> y la mezcla ISO-Cc. Las barras verticales indican el error estándar (n=3).....	30
7	Longitud antero-posterior promedio ( $\mu\text{m}$ ) de larvas de <i>Panopea generosa</i> alimentadas con las microalgas <i>Isochrysis</i> sp., <i>Chaetoceros calcitrans</i> y la mezcla ISO-Cc. Las barras verticales indican el error estándar (n=3).....	31
8	Tasa de crecimiento dorso-ventral de larvas de <i>Panopea generosa</i> alimentadas con las microalgas <i>Isochrysis</i> sp., <i>Chaetoceros calcitrans</i> y la mezcla ISO-Cc. Las barras verticales indican el error estándar (n=3).....	32
9	Tasa de crecimiento antero-posterior ( $\mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$ ) de larvas de <i>Panopea generosa</i> alimentadas con las microalgas <i>Isochrysis</i> sp., <i>Chaetoceros calcitrans</i> y la mezcla ISO-Cc. Las barras verticales indican el error estándar (n=3).....	33

## Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Estudios relacionados con la biología reproductiva y alimentación de almejas del género <i>Panopea</i> .....	9
2	Estudios relacionados con el desarrollo larval de almejas del género <i>Panopea</i> .....	11
3	Peso seco orgánico promedio ( $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ) de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp., <i>Chaetoceros calcitrans</i> y la mezcla ISO-Cc. Error estándar entre paréntesis ( $n=3$ ).....	24
4	Contenido de proteínas promedio ( $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ) de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp., <i>Chaetoceros calcitrans</i> y la mezcla ISO-Cc. Error estándar entre paréntesis ( $n=3$ ).....	25
5	Contenido de carbohidratos promedio ( $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ) de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp., <i>Chaetoceros calcitrans</i> y la mezcla ISO-Cc. Error estándar entre paréntesis ( $n=3$ ).....	26
6	Contenido de lípidos promedio ( $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ) de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp., <i>Chaetoceros calcitrans</i> y la mezcla ISO-Cc. Error estándar entre paréntesis ( $n=3$ ).....	27
7	Resumen del crecimiento y supervivencia promedio de larvas de <i>Panopea generosa</i> alimentadas con <i>Isochrysis</i> sp., <i>C. calcitrans</i> y la mezcla ISO-Cc. DV: eje dorso-ventral, AP: eje antero-posterior.....	34
8	Peso seco total ( $\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$ ) y peso seco orgánico ( $\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$ ) de larvas de <i>Panopea generosa</i> alimentadas con <i>Isochrysis</i> sp., <i>C. calcitrans</i> y la mezcla ISO-Cc. DDF: días después de la fertilización. A: Peso seco total. B: Peso seco orgánico. Error estándar entre paréntesis.....	35

# 1. Introducción

---

## 1.1 Producción mundial de bivalvos

La acuicultura es una de las actividades económicas con mayor crecimiento en el mundo con un crecimiento anual del 8.6%. Como producto de esta actividad, en el 2012 se reportó un volumen total de 66.6 millones de toneladas provenientes de la acuicultura y de este volumen el 22.8 % correspondió al cultivo de moluscos (FAO, 2014).

Los principales grupos de moluscos bivalvos que comúnmente se cultivan son ostiones, almejas y mejillones. Pero, para realizar cultivos comerciales de estos organismos, la disponibilidad de semilla ha sido una de las principales limitantes de esta industria. Por tal motivo desde el siglo pasado se han desarrollado laboratorios de producción de semilla o “hatcheries”, los cuales aseguran el abasto de este insumo biológico durante todo el año (Helm *et al.*, 2006).

El éxito en la producción de semilla de bivalvos radica en lograr una significativa supervivencia, ya que, en los primeros estadios de desarrollo de estos organismos se presentan altas mortalidades (Farías, 2008). Entre los principales factores que modifican la supervivencia de larvas de bivalvos se encuentra: la calidad y cantidad de alimento (Whyte *et al.*, 1989; Riisgard, 1988), temperatura (Marshall, 2012), salinidad (Buitimea-Álvares, 2011), nutrición de los reproductores (Utting y Millican, 1997; Wilson *et al.*, 1996; García-Esquivel *et al.*, 2013), calidad de agua (Magnesen y Jacobsen, 2012) y densidad de cultivo (Yan *et al.*, 2006). De los anteriores, la alimentación ha sido ampliamente estudiada debido a que ésta explica en mayor medida la variación en la supervivencia de bivalvos (His *et al.*, 1989).

En condiciones de laboratorio y en el ambiente marino, las microalgas constituyen el principal alimento de los distintos estadios de crecimiento de bivalvos (Helm *et al.*, 2006). El costo de producción de microalgas en un laboratorio comercial representa hasta el 50% de los costos totales de operación de esta actividad (Sarkis y Lovatelli, 2007). Por tal motivo, se han realizado investigaciones dirigidas a reemplazar parcial o

totalmente el alimento vivo por microalgas preservadas, levaduras, microencapsulados, emulsiones lipídicas y harinas de macroalgas (Cordero-Esquivel y Voltolina, 1996; Caers *et al.*, 1999; Hendriks *et al.*, 2003; Badillo-Salas *et al.*, 2009; Marshall *et al.*, 2010). Sin embargo, dichos productos no han podido igualar todavía los resultados obtenidos con las dietas de microalgas vivas (Voltolina *et al.*, 2000).

### 1.1.1 Microalgas en la alimentación de moluscos bivalvos

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos unicelulares o coloniales. Se utilizan en la acuicultura como alimento directo de moluscos bivalvos, poslarvas de abulón, estadios larvarios de crustáceos, distintas especies de zooplancton e indirectamente como alimento de larvas de peces (Brown, 2002). Las especies de microalgas que se usan con mayor frecuencia en el cultivo de moluscos bivalvos son: *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros calcitrans*, *Thalassiosira pseudonana* y *Tetraselmis suecica* entre otras (Ponis *et al.*, 2006). Estas especies son utilizadas como alimento para moluscos debido a que tienen el tamaño apropiado para ser ingeridas, son de fácil digestión, presentan altas tasas de crecimiento, es posible cultivarlas en altas densidades y tienen un alto valor nutricional (Brown, 2002).

El valor de una microalga como alimento de bivalvos depende de la cantidad y la calidad de la misma (Marshall *et al.*, 2010). Su calidad es determinada por la composición bioquímica, el tamaño, la forma y la digestibilidad (Brown, 2002). Los principales constituyentes orgánicos de una microalga son proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, representando el 95% de la materia orgánica total (Sarkis y Lovatelli, 2007).

Las proteínas son el constituyente orgánico más abundante en las microalgas que se encuentran en la fase de crecimiento exponencial (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002). Este nutriente orgánico es utilizado para sintetizar nuevo tejido somático, como catalizadores de reacciones metabólicas y como fuente de energía (Randall *et al.*, 1997). Marshall *et al.* (2010) indicaron que los bivalvos no tienen un requerimiento de proteínas *per se*, pero sí un requerimiento específico de los aminoácidos de los cuales

están compuestas. También se ha observado que los perfiles de aminoácidos no varían considerablemente entre las distintas especies de microalgas empleadas en acuicultura (Brown, 2002). Por lo tanto, el factor que determina la calidad proteica de la microalga es la proporción de este nutriente en la misma (Farías, 2008).

A diferencia de las proteínas, los carbohidratos en microalgas son de mayor abundancia en la fase estacionaria del cultivo (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002). Este nutriente es utilizado como reserva de energía (Randall *et al.*, 1997) y a diferencia de las proteínas, los carbohidratos son de menor importancia en la nutrición larval de bivalvos (Marshall *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha observado que organismos juveniles y adultos tienen elevados requerimientos de carbohidratos (Uttin y Millican, 1997).

Los lípidos son compuestos orgánicos con elevado contenido energético y al igual que los carbohidratos, se expresan en mayor cantidad en la fase estacionaria del cultivo microalgal (Brown *et al.*, 1997). Los fosfolípidos y triglicéridos son dos clases de lípidos que se encuentran en mayor proporción en las microalgas, los cuales son empleados como elementos estructurales de la membrana plasmática y como la primera fuente energética respectivamente (Randall *et al.*, 1997). Además, ambos tipos de lípidos son fuentes de ácidos grasos esenciales (Pernet *et al.*, 2003).

Diversas investigaciones demuestran la importancia de los lípidos y de los ácidos grasos esenciales, específicamente los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's por sus siglas en inglés) son de gran importancia en el correcto desarrollo de larvas de bivalvos (Whyte *et al.*, 1989; Thompson y Harrison, 1992; Jonsson *et al.*, 1999; Labarta *et al.*, 1999). Los HUFA's más importantes para moluscos bivalvos son el ácido docosahexaenoico (DHA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido araquidónico (ARA), los cuales son precursores de las prostaglandinas, constituyentes de membranas plasmáticas y requeridos para la formación de tejido nervioso (Farías, 2008).

### 1.1.2 Otras especies de interés comercial

La mayor parte de la producción de moluscos bivalvos se encuentra representada por los ostréidos (Helm *et al.*, 2006), particularmente *Crassostrea gigas* es la especie de bivalvo que más se produce a nivel mundial (Lovatelli *et al.*, 2008), además, es la especie de ostión que ha recibido un importante número de estudios (Farías, 2008). La tecnología para su cultivo se ha importado a diversos lugares alrededor del mundo y representa un ingreso importante para los productores (Uriarte, 2008). Sin embargo, es conveniente promover el cultivo de especies endémicas, las cuales están mejor adaptadas a las condiciones locales y además tienen un elevado costo en el mercado (Maeda-Martínez, 2008). En el noroeste de México se encuentran las almejas del género *Panopea*, las cuales se comenzaron a pescar a partir del 2002 y representan uno de los recursos más importantes en la costa noroeste de nuestro país (Aragón-Noriega *et al.*, 2012).

## 1.2 Generalidades del género *Panopea*

Las almejas del género *Panopea* son moluscos bivalvos pertenecientes a la familia Hiatellidae, Se encuentran entre las especies de almejas excavadoras más grandes del mundo y se caracterizan por presentar un sifón prolongado fusionado con el manto y que no puede ser retraído totalmente en la concha. Ésta es delgada, de forma rectangular y con periostraco de color café claro (Goodwin y Pease, 1989).

En México, las almejas del género *Panopea* son conocidas como almeja generosa, almeja de sifón y almeja chiluda, mientras que en Estados Unidos de Norteamérica y Canadá estos organismos reciben el nombre de “geoduck”. Esta palabra es originaria de una lengua indígena norteamericana y significa “que cava profundo” (Breen *et al.*, 1991).

Las almejas generosas viven enterradas más de 1 m en sustratos arenosos y lodo-arenosos dependiendo de la longitud del sifón, habitan desde el submareal hasta profundidades mayores a 100 m (Goodwin y Peace, 1989).

### 1.2.1 Importancia económica

La almeja *Panopea generosa* se comenzó a explotar en 1970 en Estados Unidos de Norteamérica y en 1976 en Canadá (Goodwin y Peace, 1989). Anteriormente, la mayor producción de almeja generosa provenía de dichos países, específicamente de Columbia Británica, Canadá y Washington, Estados Unidos, en estos países se reportaron ingresos anuales de 37 millones de dólares canadienses en el año 2005 y 50 millones de dólares americanos en el 2007 (Marshall, 2012). En México la pesca de *Panopea* inició en el año 2000 para su investigación y en el 2004 con fines comerciales (Ramírez-Félix *et al.*, 2012). Actualmente la producción de almeja generosa en México es mayor a lo reportado en Estados Unidos y Canadá, superando las 2 mil toneladas por año (Aragón-Noriega *et al.*, 2012).

El mercado de este recurso se encuentra en Asia, principalmente China, Japón y Taiwan (Chew, 1998). Cada almeja generosa llega a cotizarse en alrededor de 30 dólares, sin embargo, el precio varía en función de la oferta, la demanda y de la zona de procedencia del producto (Aragón-Noriega *et al.*, 2012), así como de la especie, donde *P. globosa* tiene un precio 40% menor que *P. generosa* (Ramírez-Félix *et al.*, 2012).

### 1.2.2 Clasificación taxonómica

Phylum: Mollusca

Clase: Bivalvia

Subclase: Heterodonta

Orden: Myoida

Superfamilia: Hiatelloidea

Familia: Hiatellidae

Género: *Panopea*



### 1.2.3 Historia de vida

*Panopea* es un organismo gonocorista, sin embargo, se tienen registros que indican que las almejas de este género pueden ser protándricas (Aragón-Noriega *et al.*, 2007). *Panopea* es un desovador sincrónico por grupos, que sigue un proceso de maduración anual con liberación de gametos a principios de verano (Goodwin y Peace, 1989), no obstante, se han encontrado organismos maduros a lo largo del año dependiendo de las condiciones ambientales (Guadamud-Mejía, 2012; Calderón-Aguilera *et al.*, 2014).

*P. generosa* presenta fertilización externa y los estadios de desarrollo típicos de los moluscos bivalvos (Goodwin y Pease, 1989), cuya duración se relaciona con factores físico-químicos y/o nutricionales (Marshall, 2012). Alrededor de las 24 h post-fertilización se observa la aparición del primer estadio larvario. Este se denomina larva trocófora y se caracteriza por la presencia de una corona de cilios y por carecer de una concha que lo recubra.

Posteriormente, se desarrolla la larva veliger, en la cual se distingue el velo (órgano asociado a la locomoción y a la ingesta de alimento). La larva veliger temprana es también conocida como larva de charnela recta, larva “D” o prodisoconcha I, mientras que la larva veliger tardía es llamada veliger umbada, pediveliger o prodisoconcha II (Goodwin y Pease, 1989; Helm *et al.*, 2006; Sarkis y Lovatelli, 2007). Este estadio se caracteriza por la presencia de un umbo en la región dorsal, además se puede observar un pie desarrollado con cilios y quimiorreceptores que le indican al organismo el mejor lugar para realizar el asentamiento y la metamorfosis (Zardus y Martel, 2006).

El asentamiento y metamorfosis son dos procesos críticos en la vida de los moluscos bivalvos asociados con altas mortalidades (Sarkis y Lovatelli, 2007). Una vez que se cumplen estos procesos, la postlarva se mueve activamente en el sustrato utilizando el pie, posteriormente, se comienza a desarrollar el sifón y la postlarva se convierte en un juvenil. Después de 2 a 3 años el organismo se considera que se encuentra maduro sexualmente. Se tiene registro de ejemplares maduros de *Panopea generosa* con más 100 años de edad (Goodwin y Peace, 1989).

### 1.2.4 Distribución

El género *Panopea* se distribuye a través de las costas templadas alrededor del mundo y además de Norteamérica se le ha encontrado en Nueva Zelanda (*P. zelandica* y *P. smithae*), Japón (*P. japonica*) Brasil y Argentina (*P. abbreviata*) (Breen *et al.*, 1991; Morsán y Ciocco, 2004; Straus *et al.*, 2009; Zaidman *et al.*, 2012).

En México se encuentran dos especies del género *Panopea*, en la costa noroeste de la península de Baja California se localiza *Panopea generosa*, mientras que *Panopea globosa* se encuentra en las aguas del Golfo de California y en Bahía Magdalena, en el Océano Pacífico (Fig. 1). Aunque morfológicamente son muy similares entre sí, *P. generosa* y *P. globosa* difieren en que la concha de la segunda especie presenta el seno paleal (la unión entre el manto y la concha) muy marcado (Arámbula-Pujól *et al.*, 2008).

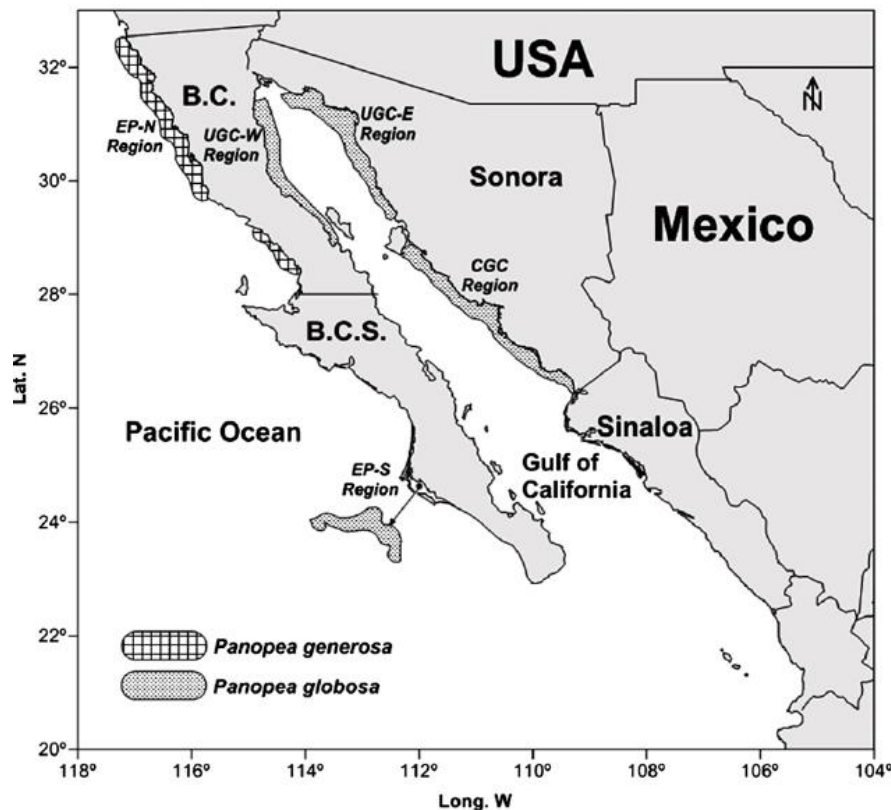


Figura 1. Distribución de los bancos pesqueros de la almeja *Panopea* spp. en México. Extracto de Aragón-Noriega *et al.* (2012).

La almeja *Panopea generosa* se distribuye a través de la costa oeste de Norteamérica, desde Alaska, Estados Unidos hasta Baja California, México (Goodwin y Peace, 1989). Existen estudios que indican la presencia de esta especie en aguas japonesas (Coan *et al.*, 2000), sin embargo, dichos especímenes podrían corresponder a la especie *Panopea japonica* (Straus *et al.*, 2009).

### **1.2.5 *Panopea generosa***

Anteriormente, el nombre científico de la almeja generosa era *Panope abrupta* o *Panopea abrupta* (Conrad, 1849), sin embargo, investigaciones demostraron que dicha especie era un fósil (Vadopalas *et al.*, 2010).

La almeja generosa del pacífico (*Panopea generosa* Gould, 1850) llega a medir 212 mm de longitud de concha y pesar 3.25 kg (Goodwin y Peace, 1989), no obstante, se ha encontrado que la longitud de esta especie en Baja California varía considerablemente comparada con la reportada para las poblaciones de Estados Unidos de Norteamérica y Canadá (Guadamud-Mejía, 2012; Calderón-Aguilera *et al.*, 2014).

## **1.3 Antecedentes**

### **1.3.1 Estudios en almejas del género *Panopea***

A pesar de la importancia económica que posee *Panopea*, los estudios sobre estos organismos son limitados, la mayoría de la información de este género se encuentra en forma de reportes técnicos elaborados por las agencias gubernamentales respectivas de Estados Unidos y Canadá (Straus *et al.*, 2009). Recientemente se han llevado a cabo estudios para conocer aspectos de biología y ecología de *Panopea* en México (Calderón-Aguilera *et al.*, 2010; Guadamud-Mejía, 2012; Aragón-Noriega *et al.*, 2012; Calderón-Aguilera *et al.*, 2014).

### 1.3.1.1 Estudios en biología reproductiva

Las primeras investigaciones sobre *Panopea* se llevaron a cabo en los Estados Unidos de Norteamérica y Canadá. Goodwin y Pease (1989) hicieron una de las primeras recopilaciones de información sobre este género, en esta revisión, se incluye una descripción detallada de su historia de vida y ecología (Tabla 1).

**Tabla 1. Estudios relacionados con la biología reproductiva y alimentación de almejas del género *Panopea*.**

Tema	Especie	Autores	Observaciones
Información general	<i>P. generosa</i>	Goodwin y Pease (1989)	-
Ciclo Reproductivo	<i>P. globosa</i>	Calderón-Aguilera <i>et al.</i> (2010)	Desarrollo gonadal
	<i>P. generosa</i>	Guadamud-Mejía (2012)	Desarrollo gonadal
	<i>P. generosa</i>	Calderón-Aguilera <i>et al.</i> (2014)	-
Acondicionamiento reproductivo	<i>P. generosa</i>	Marshall <i>et al.</i> (2012)	Temperatura
	<i>P. globosa</i>	García-Esquivel <i>et al.</i> (2013)	Suplementación harina de kelp
	<i>P. generosa</i>	Marshall <i>et al.</i> (2014)	Ración alimenticia

En México se han realizado estudios para analizar el ciclo reproductivo de *P. globosa* en el Golfo de California (Calderón-Aguilera *et al.*, 2010), así como el desarrollo gonádico de *P. generosa* en Punta Canoas, B.C, México (Guadamud-Mejía, 2012) y su ciclo reproductivo en bahía San Quintín e Islas Coronado, B.C., México (Calderón-Aguilera *et al.*, 2014).

En estos estudios encontraron tallas promedio de *P. generosa* significativamente menores (131.9 y 113 mm) a las reportadas en Estados Unidos y Canadá (100–200

mm). Además, se encontraron diferencias en los ciclos de reproducción de *P. generosa* y *P. globosa*. En Baja California *P. generosa* comienza el proceso de gametogénesis en invierno y desova a finales de primavera y principios del verano. Por otra parte, *P. globosa* presenta picos de desove durante otoño e invierno, asociados a una disminución de la temperatura y a un incremento en la productividad primaria (Calderón-Aguilera *et al.*, 2010).

Recientemente, investigadores canadienses han estudiado la maduración de la almeja generosa en condiciones de laboratorio. Marshall *et al.* (2012) evaluaron el efecto de la temperatura en el desarrollo gonádico de *P. generosa*. Encontraron que la temperatura óptima de acondicionamiento de esta especie es 11 °C. Posteriormente, Marshall *et al.* (2014) evaluaron el efecto de la ración alimenticia en el acondicionamiento reproductivo de *P. generosa* y encontraron que la ración óptima para la realización de este proceso es de  $4 \times 10^9 \text{ cél} \cdot \text{ind}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ .

En nuestro país se ha estudiado el acondicionamiento de reproductores de *Panopea globosa* en laboratorio. García-Esquivel *et al.* (2013), proporcionaron suplementos alimenticios de harina de sargazo (kelp) y aceite de pescado a la dieta de microalgas vivas y evaluaron su efecto en el acondicionamiento reproductivo de *P. globosa*. No encontraron diferencias significativas en las variables observadas con las tres dietas, además, encontraron que se pueden madurar exitosamente reproductores de *P. globosa* en un periodo de 6 a 8 semanas empleando una temperatura efectiva acumulada de 230°D.

### **1.3.1.2 Estudios del desarrollo larval**

Goodwin *et al.* (1979) describieron por primera vez el desarrollo larval de *P. generosa* mediante microfotografías (Tabla 2). Estos autores reportaron el uso de microalgas en forma monoalgal o mixta en la alimentación de esta especie, sin embargo, no evalúan el efecto de las mismas sobre la supervivencia y crecimiento de esta especie. Por su parte, Gribben y Hay (2003) describieron por primera vez el desarrollo larval de la almeja *Panopea zelandica* cultivada en condiciones de laboratorio, mediante

mediciones morfométricas de las conchas, microfotografías y microscopía electrónica de barrido. Encontraron una talla de metamorfosis para esta especie de 250  $\mu\text{m}$  y se alcanza a los 16 días de cultivo (Tabla 2).

**Tabla 2. Estudios relacionados con el desarrollo larval de almejas del género *Panopea*.**

<b>Tema</b>	<b>Especie</b>	<b>Autores</b>	<b>Observaciones</b>
Información general	<i>P. generosa</i>	Goodwin y Pease (1989)	-
Desarrollo larval	<i>P. generosa</i>	Goodwin <i>et al.</i> (1979)	Uso de mezclas de microalgas
	<i>P. generosa</i>	Tapia-Morales (2011)	Antibióticos
	<i>P. generosa</i>	Buitimea-Álvarez (2011)	Temperatura y salinidad
	<i>P. generosa</i>	Marshall (2012)	Densidad y ración alimenticia
	<i>P. globosa</i>	Buitimea-Álvarez (2011)	Temperatura
	<i>P. globosa</i>	Ferreira-Arrieta (2012)	Tasas de ingestión
	<i>P. zelandica</i>	Gribben y Hay (2003)	-

Como parte de las investigaciones realizadas en el laboratorio de Biotecnología de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC, Buitimea-Álvarez (2011) evaluó el efecto de la temperatura en el crecimiento y supervivencia larval de *Panopea globosa*, así como el efecto de la temperatura y salinidad en el desarrollo ontogénico de *Panopea generosa*. En el primer bioensayo encontró mejores resultados a temperaturas de 22 y 26 °C, mientras que temperaturas de 18 y 30 °C afectaron de manera negativa el crecimiento y supervivencia de *P. globosa*. Por otra parte el desarrollo embrionario de *P. generosa* tiene menor duración a temperaturas de 14 a 16 °C. No obstante, el desarrollo larval se lleva a cabo en menor tiempo a temperaturas de 18 a 20 °C. También reporta que salinidades altas (36 ups) influyen negativamente en

el crecimiento de *P. generosa*. Por otra parte, la adición de antibióticos como el cloranfenicol y la gentamicina pueden afectar el crecimiento y supervivencia larval de *P. generosa* (Tapia-Morales, 2011). Sus resultados mostraron que el cloranfenicol mejoró el crecimiento y supervivencia larval en todas las concentraciones utilizadas, sin embargo, la gentamicina solo incrementó la supervivencia larval en las concentraciones de 6 y 9 mg•L<sup>-1</sup>.

Se han realizado estudios para conocer la densidad óptima de cultivo y la ración alimenticia en el crecimiento, supervivencia y tasas de ingestión de larvas de *P. generosa* (Marshall, 2012). Este autor encontró que las tres variables de respuesta son afectadas significativamente por la densidad y ración alimenticia, con una interacción significativa entre los dos factores sobre la supervivencia al día 23 (P<0.01) y una interacción significativa sobre el crecimiento y tasas de ingestión (P<0.001).

Ferreira-Arrieta (2012) analizó la supervivencia, el crecimiento (longitud y peso seco) y tasas de ingestión de *P. globosa* durante su desarrollo larval en condiciones de laboratorio, encontró que el periodo larval es de 13 a 14 días, por lo que tiene la mayor tasa de crecimiento y la mayor supervivencia larval entre las almejas del género *Panopea*. Además, a partir del estadio D, *P. globosa* es capaz de regular su tasa de ingestión en función de la concentración de alimento.

### **1.3.2 Uso de dietas mixtas en el cultivo de moluscos bivalvos.**

Como se mencionó anteriormente, la mayor parte de los costos de producción en un laboratorio comercial se asocian al cultivo de microalgas, ésto ha originado el desarrollo de estudios para hacer más eficiente y rentable el uso de éstas en la producción de bivalvos (Farías y Uriarte, 2002). Los estudios se han enfocado en la evaluación de la composición bioquímica de las microalgas para la alimentación de bivalvos en sus distintos estadios de desarrollo (Sarkis y Lovatelli, 2007). También se ha observado que existe un alto grado de variabilidad en la composición bioquímica entre las distintas especies de microalgas y entre las distintas condiciones que se usan para su cultivo. Además se ha observado que existen deficiencias específicas en el perfil nutricional de

cada especie (Brown, 2002), por lo que al utilizar mezclas de dos o tres especies de microalgas se mejora la calidad de la dieta, optimizando el desempeño de los organismos cultivados (Sarkis y Lovatelli, 2007).

Entre los estudios sobre las dietas mixtas de microalgas que han mejorado el crecimiento y supervivencia de larvas de distintos tipos de bivalvos se pueden mencionar los de ostión (Rico-Villa *et al.*, 2006; Kheder *et al.*, 2010), mejillón (Pettersen *et al.*, 2010; Sánchez-Lazo y Martínez-Pita, 2014), pectínidos (Carvalho *et al.*, 2013; Saucedo *et al.*, 2013) y almejas (Liu *et al.*, 2009; Contreras *et al.*, 2014). Estos estudios demuestran que la mezcla de al menos una microalga Haptofita y una Bacilariofita (conocidas comúnmente como flageladas y diatomeas respectivamente) producen óptimo crecimiento en larvas de moluscos bivalvos (Helm *et al.*, 2006; Pettersen *et al.*, 2010).

Particularmente, *Isochrysis* spp. y *Chaetoceros* spp. son las microalgas mayormente utilizadas en la producción comercial de bivalvos (Brown, 2002), esto se debe a que ambas especies son ricas en HUFA's, (DHA y EPA respectivamente), por lo cual, la mezcla de ambas especies completa los requerimientos nutricionales de las larvas de bivalvos (Farías y Uriarte, 2002). Sin embargo, actualmente los cultivos comerciales de *Panopea generosa* son alimentados exclusivamente con *Isochrysis* sp. Por tal motivo, es de esperarse que el uso de dietas mixtas compuestas por *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros calcitrans* podría incrementar la supervivencia y el crecimiento larval de dicha especie.



## 1.4 Justificación

Generalmente el desarrollo larval de moluscos bivalvos está directamente influenciado por las condiciones de cultivo, en donde el estudio sobre su alimentación es uno de los principales aspectos a considerar, ya que ésta repercute directamente en la supervivencia y crecimiento de los organismos; por lo cual, en los laboratorios dedicados a la producción de invertebrados marinos se enfatiza en el control de su cultivo y la selección de las microalgas adecuadas que aseguren el buen desempeño de éstos.

Una de las especies de bivalvos que actualmente ha adquirido gran importancia en la zona noroeste del país es la almeja *Panopea generosa*, ya que es un recurso pesquero valioso, llegando a alcanzar los 30 dólares por organismo. Por tal motivo, en los últimos años la pesquería de esta especie se ha extendido en la región, lo que ha provocado que los bancos naturales hayan disminuido debido a la sobreexplotación ya que estos organismos alcanzan su madurez sexual hasta los 2 años. Lo anterior hace necesario la producción de semilla en condiciones de laboratorio con fines de acuicultura o repoblamiento.

Actualmente existen pocos estudios sobre la biología y el cultivo de *P. generosa*, por lo cual es de vital importancia conocer aspectos básicos sobre su alimentación. En este trabajo se plantea estudiar el efecto de diferentes dietas de microalgas sobre el crecimiento y supervivencia de esta especie, con el propósito de aportar conocimiento para su cultivo en Baja California.

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 General**

Evaluar la supervivencia y crecimiento de larvas de *Panopea generosa* alimentadas con las micralgas *Isochrysis* sp., *Chaetoceros calcitrans* y su mezcla.

#### **1.5.1.1 Particulares**

Evaluar la biomasa producida (número de células, peso seco orgánico y composición bioquímica) de *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros calcitrans* en cultivo semicontinuo y su mezcla.

Evaluar la supervivencia y crecimiento (longitud y peso seco orgánico) de larvas de *Panopea generosa* alimentadas con *Isochrysis* sp., *Chaetoceros calcitrans* y su mezcla.

## **1.6 Hipótesis**

La dieta mixta compuesta por *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros calcitrans* producirá un mayor crecimiento y supervivencia de larvas de *Panopea generosa* que sus respectivas dietas monoalgales.

## 2. Materiales y Métodos

---

### 2.1 Cultivo de microalgas

Las microalgas *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros calcitrans* fueron obtenidas de la Colección de Microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Estas especies se mantuvieron en el laboratorio a temperatura de  $19 \pm 1$  °C, salinidad de 32 ups y medio f/2 (Guillard, 1975) adicionando silicatos para los cultivos de *C. calcitrans*.

Se realizaron escalamientos sucesivos de *Isochrysis* sp. y *C. calcitrans* en 0.15, 1.8 y 18 L por triplicado, con una densidad inicial de  $5 \times 10^5$  cél•mL<sup>-1</sup>. El escalamiento de cada nivel se realizó al cuarto día. Los cultivos recibieron una irradiancia de  $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  en los volúmenes de 0.15 y 1.8 L, mientras que aquellos de 18 L fueron expuestos a  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . La luz se proporcionó por lámparas fluorescentes Osram de 75 W y se midió con un irradiómetro (Biospherical Instruments Inc. Modelo QSL-100, con sensor  $4\pi$ ). Además, los cultivos de 18 L recibieron un flujo de aire de  $5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  y adición puntual de CO<sub>2</sub> cada 24 horas a razón de  $5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  por 1:15 min para mantener el pH entre 7.5 y 8.0 unidades.

El agua de mar empleada para el cultivo de *Isochrysis* sp. y *C. calcitrans* fue previamente filtrada a  $1 \mu\text{m}$  e irradiada con luz ultra violeta. En el caso de los niveles de 0.15 y 1.8 L, el agua se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 libras•pulgada<sup>-2</sup> de presión durante 15 minutos. Para el volumen de 18 L, el agua se trató con hipoclorito de sodio y se neutralizó con tiosulfato de sodio de acuerdo a Valenzuela-Espinoza *et al.* (1999). Posteriormente se adicionaron los nutrientes correspondientes al medio “f/2”.

#### 2.1.1 Cultivo semicontinuo

En el nivel de 18 L, se realizó una dilución diaria del 20% del volumen total a partir del cuarto día. Este volumen se renovó con agua de mar estéril y se añadieron nutrientes. Se prepararon las dietas experimentales requeridas para alimentar a las larvas de

*Panopea generosa*. La dieta mixta de *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros calcitrans* se hizo en una proporción de 1:1.2 respectivamente para realizar la alimentación de los organismos.

## 2.1.2 Evaluación del cultivo de microalgas

### 2.1.2.1 Determinación de la densidad celular

Diariamente se tomó 1 mL de muestra de cada cultivo de microalgas, esta se diluyó en función de la concentración esperada y se fijó con lugol. Se contó el número de células empleando un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad bajo un microscopio compuesto. La densidad celular se calculó con la siguiente ecuación:

$$N = C * 10^4 * F.D \quad (1)$$

Dónde:

N = células•mL<sup>-1</sup>

C = promedio de las células contadas en los cuadrantes

10<sup>4</sup> = factor de conversión dado por la profundidad de la cámara

F.D. = factor de dilución

### 2.1.2.2 Peso seco orgánico (PSO)

Muestras por triplicado de 300 mL fueron tomadas del cultivo de *Isochrysis* sp. (ISO) y *C. calcitrans* (Cc). Adicionalmente se preparó la mezcla (ISO-Cc). Volúmenes conocidos de cultivo microalgal se filtraron a través de filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio (47 mm de diámetro y 1.2 µm de retención) previamente lavados, precalcinados en una mufla a 490 °C y pesados. Las microalgas retenidas se enjuagaron con formiato de amonio al 3% para eliminar sales. Los filtros se colocaron en una estufa a 60 °C por 24h

para obtener el peso seco total (PST). Posteriormente, se calcinaron en una mufla a 490 °C por 4 horas para obtener el peso de cenizas. Finalmente, por diferencia entre PST y el peso de cenizas, se obtuvo el peso seco orgánico (PSO).

### **2.1.2.3 Composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos)**

Para analizar la composición proximal, cada tercer día se filtraron volúmenes conocidos de cada cultivo de microalgas y su mezcla a través de filtros Whatman GF/C, de 25 mm de diámetro y 1.2 µm de retención, se lavaron como se mencionó anteriormente y se almacenaron a -32 °C en un ultra congelador para su posterior análisis.

Previo al análisis de proteínas se realizó su extracción mediante el método de Raush (1981) utilizando como agente extractor NaOH 0.1 N, para después cuantificarlas mediante el método de Lowry *et al.* (1951). Los carbohidratos fueron extraídos con el método de Whyte (1987), el cual utiliza H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M como agente extractor, posteriormente se cuantificaron siguiendo la metodología de Dubois *et al.* (1956). Los lípidos se extrajeron por el método descrito por Blight y Dyer (1959) y se cuantificaron según Pande *et al.* (1963). Para cada análisis se realizaron curvas de calibración mediante estándares de albumina bovina para proteínas, glucosa anhidra para carbohidratos y tripalmitina para lípidos.

## **2.2 Cultivo larvario de *Panopea generosa***

### **2.2.1 Observación del desarrollo temprano**

Para esta etapa del experimento la empresa “Laboratorio Oceánica” de Ensenada B.C proporcionó una muestra de huevos recién fertilizados, los cuales fueron transportados al laboratorio de microalgas del IIO en la UABC. Inmediatamente la muestra se filtró a través de un tamiz de 45 µm y se lavó con agua de mar filtrada (poro de 1 µm), clorinada y neutralizada. Después se colocaron en un recipiente con 750 mL de agua de mar a 17 °C. Se suministró aireación suave para evitar la sedimentación de los

huevos. Se revisaron al microscopio a intervalos para identificar el estadio de desarrollo hasta que se observaron larvas en estadio “D”.

### **2.2.2 Recepción y aclimatación de organismos**

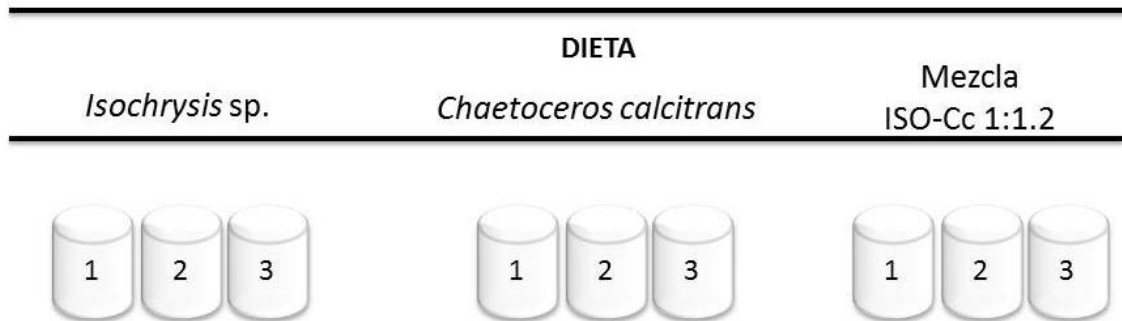
Con base a los resultados de las observaciones antes mencionadas, la empresa “Laboratorio Oceánica” proporcionó larvas en estadio de charnela recta o “D” (3 días post-fertilización), las cuales, fueron transportadas al laboratorio de microalgas del IIO en la UABC dentro de recipientes plásticos de 18 L. Inmediatamente los organismos se tamizaron utilizando una malla de 64  $\mu\text{m}$  para eliminar el agua de transporte y se enjuagaron con agua filtrada a 1  $\mu\text{m}$ , irradiada con luz ultravioleta, clorinada y neutralizada.

Realizado lo anterior, las larvas se colocaron en un recipiente de 15 L y se homogenizaron con un agitador de plástico. Se tomaron muestras de 1 mL por triplicado con una micropipeta, se colocaron en una cámara de conteo Sedgewick-Rafter, se fijaron con formol salino y se contaron en un microscopio compuesto Marca Zeiss modelo Axiostar. El promedio de los conteos se multiplicó por el volumen total donde se encontraban las larvas (15 L). La cantidad total de larvas se trasvasaron a una columna de fibra de vidrio de 400 L que contenía agua de mar filtrada a 1  $\mu\text{m}$ , irradiada con U.V., clorinada, neutralizada.

En este volumen de cultivo, las larvas fueron acondicionadas a una temperatura de  $17 \pm 1$  °C y 32 ups por cuatro días. Se alimentaron diariamente con *Isochrysis* sp. a razón de  $2.5 \times 10^4$  cél·mL<sup>-1</sup> y se realizó un recambio total de agua al segundo día del periodo de acondicionamiento.

### 2.2.3 Ensayo de alimentación

Previo al inicio del experimento, las larvas se concentraron en 15 L y se cuantificaron de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente. Cada unidad experimental contenía 17 L de agua de mar filtrada y una densidad de  $5.7 \text{ larvas} \cdot \text{mL}^{-1}$ , a temperatura de  $17 \pm 1^\circ \text{C}$  y 32 ups. Las dietas experimentales fueron *Isochrysis* sp., *Chaetoceros calcitrans* y la mezcla de ambas (ISO-Cc) en proporción 1:1.2 (Fig. 2). El alimento se suministró diariamente en una ración que se incrementó de  $3.5 \times 10^4$  a  $1.8 \times 10^5 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$  en función del tamaño de los organismos (Garduño-Franco com. pers.)



**Figura 2.** Diseño experimental para el ensayo de alimentación larval de *Panopea generosa*. ISO-Cc: *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros calcitrans*.

### 2.2.4 Evaluación de la supervivencia

Cada 2 días se renovó el volumen total de los cultivos de larvas en cada uno de los tratamientos. Los organismos fueron retenidos en un tamiz colocado sobre una charola con agua de mar a la misma temperatura y salinidad que el agua de cultivo. Durante el proceso de evaluación se utilizaron tamices de diferente luz de malla (64, 75, 105, 150 y 200  $\mu\text{m}$ ). Las larvas retenidas en el tamiz respectivo se concentraron en 9 L al cabo de 9 días después de la fertilización (DDF), en 8 L los días 11, 13, 15 y 17 DDF y en 4 L los días 19, 21 y 23 DDF. La suspensión se homogenizó con un agitador de acrílico, se tomaron tres muestras y se colocaron en cámaras Sedgewick-Rafter de 1 mL. El promedio de los conteos se multiplicó por el volumen del recipiente para conocer la

cantidad de larvas. Al final del experimento, se evaluó la cantidad total de larvas competentes para realizar el proceso de fijación y metamorfosis.

### 2.2.5 Evaluación del crecimiento (longitud y peso seco)

Muestras por triplicado fueron tomadas para evaluar supervivencia, posteriormente fueron almacenadas en viales de 6 mL para medir su longitud. Una vez terminado el ensayo de alimentación, se tomaron las muestras y se midieron en un microscopio compuesto con un micrómetro ocular. Las mediciones se realizaron en el objetivo de 5X con una precisión de  $\pm 8 \mu\text{m}$ . Se midió el crecimiento de la concha en los ejes dorso-ventral y antero-posterior (Fig. 3).

Se tomó una muestra de 3000 organismos de cada unidad de cultivo larvario para evaluar el peso seco total y orgánico de las larvas. Se filtraron a través de filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio (47 mm de diámetro y  $1.2 \mu\text{m}$  de retención) previamente lavados, precalcinados en una mufla a  $490^\circ\text{C}$  y pesados. Después de filtrar las muestras, se enjuagaron con formiato de amonio al 3% para eliminar sales. El PSO se calculó con la metodología mencionada anteriormente.

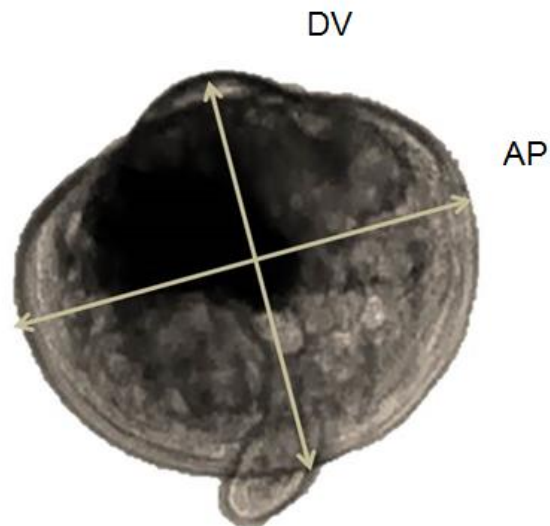


Figura 3. Larva pediveliger de almeja *Panopea generosa*. DV: eje dorso-ventral, AP: eje antero-posterior.



### 2.3 Análisis estadístico

En este estudio se empleó un diseño completamente aleatorizado (DCA). Por lo tanto, se utilizó un Análisis de varianza (ANOVA) de una vía para conocer si existían diferencias significativas en el crecimiento entre dietas. Previo a todos los análisis estadísticos se analizó la normalidad y la homogeneidad de varianzas de los datos. Cuando se encontraron diferencias significativas se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey para localizar dichas diferencias. Para la supervivencia se realizó un ANOVA. Previo a este análisis se transformaron los datos mediante la función arco-seno con la siguiente relación:

$$Y = \text{arc sen } \sqrt{\frac{P}{100}} \quad (2)$$

Donde Y = Valor del porcentaje de supervivencia transformado

P = Porcentaje de supervivencia calculado

Se realizó un Análisis de Covarianza para conocer si existen diferencias significativas en la tasa específica de crecimiento (longitud dorso-ventral y antero-posterior) entre las dietas con respecto al tiempo.

## 3. Resultados

---

### 3.1 Cultivo de microalgas

Aunque se tuvieron los cuidados al momento de realizar los cultivos semicontinuos de microalgas, se presentaron protozoarios en los cultivos de 18 L. por tal motivo en los días 7 y 9 fue necesario suministrar *C. calcitrans* proveniente del nivel de 1.8 L. A partir del día 11 todo el alimento suministrado a las unidades de evaluación procedía de cultivos en nivel de 1.8 L.

#### 3.1.1 Peso seco orgánico

Las células de *Isochrysis* sp. presentaron valores de 14.1 a 72.8 pg•cél<sup>-1</sup>, las de *C. calcitrans* de 11.6 a 37.2 y las de ISO-Cc de 19.7 a 34.8 pg•cél<sup>-1</sup>. El análisis de varianza mostró diferencias significativas en la mayoría de los días del experimento ( $P < 0.05$ ). Las células de *Isochrysis* sp. presentaron valores más elevados que *C. calcitrans* y la mezcla ISO-Cc, mientras que, entre *C. calcitrans* y la mezcla ISO-Cc no se encontraron diferencias significativas (Tabla 3).

Se encontraron diferencias significativas entre los distintos días de muestreo de PSO en las dietas de *Isochrysis* sp y *C. calcitrans* ( $P < 0.001$ ) y en la mezcla ISO-Cc ( $P < 0.05$ ). Al realizar la prueba de comparación de medias se observó que en *Isochrysis* sp. las diferencias significativas se encontraban en los días 3 y 7, en los cuales la media era superior a los 70 pg•cél<sup>-1</sup>, mientras que en los demás días no hubo diferencias significativas.

En la dieta de *C. calcitrans* las diferencias se observaron en los días 5, 7 y 13. En el primero de los cuales se presentó una media de 37.2 pg•cél<sup>-1</sup>, mientras que en los otros se registró una media inferior a los 10 pg•cél<sup>-1</sup>.

En la mezcla ISO-Cc se identificaron diferencias en los días 3 y 7. En el primero de los cuales la media fue de 34.8 pg•cél<sup>-1</sup>, mientras que en el segundo fue de 17.7 pg•cél<sup>-1</sup>. El resto de los días no presentaron diferencias significativas (Tabla 3).

Tabla 3. Peso seco orgánico promedio ( $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ) de las microalgas *Isochrysis* sp., *Chaetoceros calcitrans* y la mezcla ISO-Cc. Error estándar entre paréntesis ( $n=3$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas entre días de muestreo y subíndices numéricos indican diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha=0.5$ ). El asterisco indica  $n=1$ . La letra P de la última fila indica la probabilidad asociada a los días de muestreo.

Tiempo (días)	Especie									
	<i>Isochrysis</i> sp.			<i>C. calcitrans</i>			Mezcla ISO-Cc		P	
1	29.2	(5.80)	b	18.2	(0.18)	bc	19.7	(0.48)	ab	0.1841
3	70.0	(13.62)	a 1	16.1	(1.14)	bc 2	34.8	(8.19)	a 1	0.0162
5	19.3	(3.25)	b 2	37.2	(0.48)	a 1	21.8	(1.01)	ab 2	0.0006
7	72.8	(3.09)	a 1	8.7	(1.27)	c 2	17.7	(2.05)	b 2	0.0000
9	33.8	(3.43)	b 1	13.8	(1.04)	bc 2	33.7	(2.10)	ab 1	0.0015
11	30.2	(1.66)	b 1	17.8	(1.38)	bc 2	21.0	(0.76)	ab 2	0.0077
13	14.1	(1.84)	b 2	11.6	(0.60)	c 2	19.7	(0.82)	ab 1	0.0088
15	14.6	(0.00)	-	18.8	(0.00)	-	18.0	(0.00)	-	*
17	36.2	(1.86)	b	23.0	(4.73)	b	28.5	(0.47)	ab	0.0514
P	0.0000			0.0000			0.0108			

### 3.1.3 Contenido de proteínas

El contenido proteico en las microalgas varió a lo largo del ensayo de alimentación. El ANOVA mostró diferencias significativas entre el contenido proteico de las tres dietas ( $P<0.05$ ). La prueba de Tukey indicó que las células de *Isochrysis* sp. presentaron un mayor contenido de proteínas que la mezcla ISO-Cc y estas a su vez mayor cantidad de este componente que *C. calcitrans*. La cantidad promedio de proteína de todos los días del experimento fue mayor en *Isochrysis* sp. ( $4.7 - 17.6 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ), seguida por la mezcla ISO-Cc ( $5.2 - 10.3 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ) y *C. calcitrans* ( $3.0 - 8.8 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ; Tabla 4).

Los resultados mostraron diferencias significativas ( $P<0.01$ ) entre los distintos días de muestreo en las dietas de *Isochrysis* sp., *C. calcitrans* y la mezcla. Al realizar la prueba de comparación de medias se observó que las diferencias en *Isochrysis* se encontraban en los días 5 y 15. En el día 5 se registró una media superior ( $17.6 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ) y una media menor en el día 15 ( $4.3 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ). Entre los demás días no hubo diferencias significativas. En *C. calcitrans*, las diferencias se encontraron principalmente en los días 13 y 15 con medias de  $8.8$  y  $6.6 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  respectivamente. Aunque en los demás días

también se encontraron diferencias, la mayor variación de los datos se atribuye a los dos últimos muestreos.

Al comparar los distintos días de muestreo en la mezcla ISO-Cc se identificaron tres grupos de datos. El primer grupo comprende los tres primeros muestreos (días 1, 3 y 5), el segundo del día 7 al 15 y el tercer grupo lo constituye el día 17, en el cual, se registró la mayor cantidad promedio de proteína ( $10.3 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ).

**Tabla 4. Contenido de proteínas promedio ( $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ) de las microalgas *Isochrysis* sp., *Chaetoceros calcitrans* y la mezcla ISO-Cc. Error estándar entre paréntesis ( $n=3$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas entre días de muestreo y subíndices numéricos indican diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha=0.5$ ). La letra P de la última fila indica la probabilidad asociada a los días de muestreo.**

Tiempo (días)	Especie				P
	<i>Isochrysis</i> sp.	<i>C. calcitrans</i>	Mezcla ISO-Cc		
1	8.2 (1.81) bc	5.3 (0.65) bc	6.7 (0.02) c		0.3100
3	10.3 (0.74) b 1	4.3 (0.19) cd 3	7.9 (0.10) b 2		0.0002
5	17.6 (1.72) a 1	3.4 (0.27) d 3	7.9 (0.14) b 2		0.0001
7	8.6 (0.17) b 1	4.3 (0.22) cd 2	5.2 (0.34) e 2		0.0002
9	7.3 (0.24) bc 1	3.1 (0.10) d 3	5.3 (0.10) e 2		0.0000
11	6.9 (0.65) bc 1	3.0 (0.22) d 3	5.6 (0.16) de 2		0.0003
13	8.1 (0.89) bc 1	3.8 (0.25) cd 2	6.5 (0.08) c 1		0.0041
15	4.3 (0.08) c 3	8.8 (0.12) a 1	6.2 (0.03) cd 2		0.0000
17	13.7 (1.19) ab 1	6.6 (0.37) b 3	10.3 (0.15) a 2		0.0014
P	0.0000	0.0784	0.0005		

### 3.1.2.2 Contenido de carbohidratos

El contenido promedio de carbohidratos en las microalgas *Isochrysis* sp., ISO-Cc y *C. calcitrans* fue menor que su contenido proteico y lipídico. Sin embargo, presentó la misma tendencia que los componentes anteriores, ya que se encontraron valores significativamente más altos en *Isochrysis* sp. comparado con ISO-Cc y *C. calcitrans*. Este a su vez fue mayor en la mezcla ISO-Cc que en *C. calcitrans* ( $P<0.05$ ). El contenido promedio de carbohidratos en los diferentes días varió de 2.0 a  $5.1 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  para *Isochrysis* sp., la mezcla ISO-Cc tuvo un promedio entre 0.8 y  $1.7 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ , mientras que *C. calcitrans* de 0.3 a  $1.1 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  (Tabla 5).

Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) entre los distintos días de muestreo en las dietas de *Isochrysis* sp. y la mezcla ISO-Cc, mientras que, en *C. calcitrans* no hubo diferencias significativas entre los muestreos realizados ( $P > 0.05$ ).

La prueba *pos-hoc* mostró que las diferencias en el contenido de carbohidratos en *Isochrysis* sp. se encontraron constituidas por tres grupos de datos, el primero conformado por los días 5 y 17, los cuales presentaron la media mayor (4.4 y 5.1  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ), el segundo grupo por los días 9 y 15 con las medias menores (2.0 y 2.4  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  respectivamente), mientras que en el tercer grupo quedaron los días restantes, los cuales no difieren con los grupos anteriores.

Las diferencias encontradas en la mezcla se atribuyeron a los días 13 y 17, los cuales presentaron las medias mayores (1.7 en ambos casos), las medias menores se identificaron en los días 5, 7, 9 y 11, mientras que los días 3, 5 y 17 no presentaron diferencias significativas con los dos grupos mencionados anteriormente.

**Tabla 5. Contenido de carbohidratos promedio ( $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ) de las microalgas *Isochrysis* sp., *Chaetoceros calcitrans* y la mezcla ISO-Cc. Error estándar entre paréntesis ( $n=3$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas entre días de muestreo y subíndices numéricos indican diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha=0.5$ ). El asterisco indica  $n=1$ . La letra P de la última fila indica la probabilidad asociada a los días de muestreo.**

Tiempo (días)	Especie			P
	<i>Isochrysis</i> sp.	<i>C. calcitrans</i>	Mezcla ISO-Cc	
1	3.0 (0.92) -	1.1 (0.00) -	1.1 (0.00) -	*
3	4.4 (0.13) a 1	1.0 (0.14) 2	1.3 (0.04) ab 2	0.0000
5	3.3 (0.45) ab 1	0.7 (0.06) 2	0.8 (0.08) b 2	0.0007
7	2.6 (0.02) ab 1	1.2 (0.48) 2	0.8 (0.06) b 2	0.0083
9	2.0 (0.28) bc 1	0.3 (0.02) 2	0.8 (0.25) b 2	0.0046
11	4.2 (0.23) ab 1	0.6 (0.06) 2	1.0 (0.04) b 2	0.0000
13	3.9 (0.20) ab 1	0.9 (0.12) 2	1.7 (0.31) a 2	0.0001
15	2.4 (0.58) bc 1	0.6 (0.02) 3	1.1 (0.08) ab 2	0.0241
17	5.1 (0.78) a 1	0.8 (0.08) 2	1.7 (0.16) a 2	0.0008
P	0.0002	0.0784	0.0005	

### 3.1.2.3 Contenido de lípidos totales

La cantidad promedio de lípidos presente en las microalgas fue menor que las proteínas pero mayor que los carbohidratos (Tabla 6). Las células de *Isochrysis* sp. presentaron mayor cantidad de lípidos que la mezcla ISO-Cc y estas a su vez tuvieron mayor cantidad de este componente que las células de *C. calcitrans* ( $P < 0.05$ ). Se registraron valores promedio de  $7.4 \pm 0.52 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  en el caso de *Isochrysis* sp., de  $5.2 \pm 0.10 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  en la mezcla ISO-Cc y de  $3.3 \pm 0.30 \text{ pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  en *C. calcitrans*. Por otra parte, no se registraron diferencias significativas entre los distintos días de muestreo ( $P > 0.05$ ).

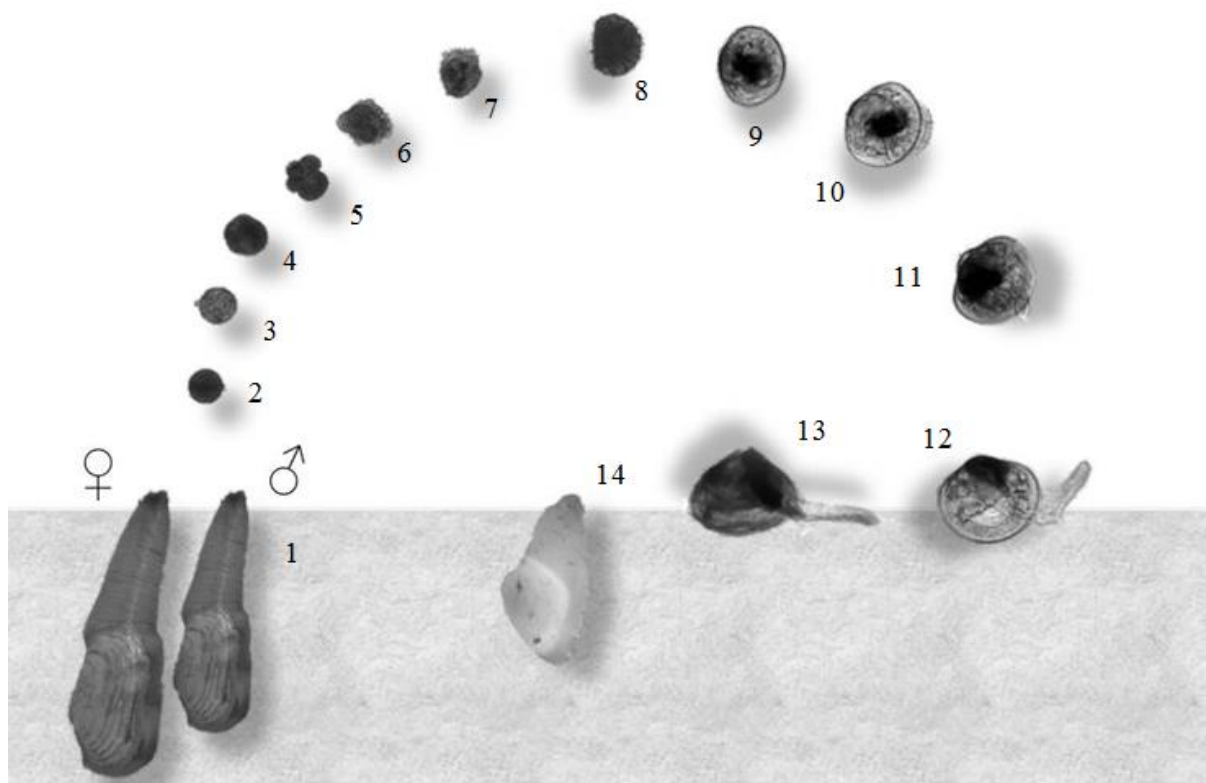
**Tabla 6.** Contenido de lípidos promedio ( $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ ) de las microalgas *Isochrysis* sp., *Chaetoceros calcitrans* y la mezcla ISO-Cc. Error estándar entre paréntesis ( $n=3$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas entre días de muestreo y subíndices números indican diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha=0.5$ ). La letra P de la última fila indica la probabilidad asociada a los días de muestreo.

Tiempo (días)	Especie			P
	<i>Isochrysis</i> sp.	<i>C. calcitrans</i>	Mezcla ISO-Cc	
1	8.9 (3.62)	2.8 (0.41)	4.8 (0.00)	0.2500
3	7.9 (0.77) <sup>1</sup>	2.6 (0.30) <sup>3</sup>	5.3 (0.12) <sup>2</sup>	0.0030
5	8.7 (0.74) <sup>1</sup>	2.4 (0.48) <sup>3</sup>	5.5 (0.80) <sup>2</sup>	0.0020
7	8.6 (0.67)	5.2 (1.42)	5.2 (0.17)	0.1096
9	7.1 (0.78) <sup>1</sup>	3.1 (0.56) <sup>2</sup>	5.1 (0.60) <sup>2</sup>	0.0150
11	6.4 (0.65) <sup>1</sup>	2.4 (0.71) <sup>2</sup>	5.4 (0.70) <sup>2</sup>	0.0147
13	5.8 (0.56)	3.6 (1.56)	5.0 (1.82)	0.5748
15	4.5 (1.02)	3.8 (0.30)	4.6 (0.95)	0.7504
17	8.7 (2.39)	3.4 (0.56)	5.5 (0.07)	0.1560
Promedio	7.4 (0.52)	3.3 (0.30)	5.2 (0.10)	
P	0.4131	0.4328	0.9978	

### 3.2 Cultivo larvario de *Panopea generosa*

La historia de vida de *Panopea generosa* se describe en la figura 8. Se observaron las primeras 2 divisiones mitóticas a las 1.5 h después de la fertilización (HDF), la quinta división mitótica a las 9 HDF, la larva trocófora a las 24 HDF y la larva D durante las primeras 48 HDF. Durante del ensayo de alimentación se identificaron los estadios veliger, veliger umbada y pediveliger. El ensayo concluyó cuando la mayor parte de la

población se encontraba lista (presencia del pie y búsqueda de sustrato) para realizar el asentamiento y la metamorfosis. Sin embargo, fue posible observar algunas postlarvas en la parte final del experimento (Fig. 4).



**Figura 4.** Historia de vida de la almeja *Panopea generosa*. 1: Adultos, 2: huevo fertilizado, 3: expulsión del segundo cuerpo polar, 4: primera división mitótica, 5: segunda división mitótica, 6: quinta división mitótica, 7: larva trocófora, 8: larva veliger de charnela recta o larva "D", 9: larva veliger, 10: larva veliger umbada, 11: larva pediveliger, 12: postlarva, 13: postlarva de 2 semanas y 14: juvenil.

### 3.2.1 Supervivencia larval

No se encontraron diferencias significativas en la supervivencia en larvas alimentadas con *Isochrysis* sp., *Chaetoceros calcitrans* y la mezcla ISO-Cc ( $P>0.05$ ). Las pruebas estadísticas se realizaron hasta el día 19 de cultivo larvario, lo anterior debido a que en el día 21 se registró una mortalidad del 100% en una de las unidades experimentales en cada tratamiento. La cual, se atribuyó a la presencia de protozoarios ciliados. En el día 23 después de la fertilización se obtuvo un 37% de supervivencia con la mezcla ISO-Cc, un 26% con *Isochrysis* sp. y solo un 4% con *C. calcitrans* (Fig. 5). Lo anterior equivale a  $7.3 \times 10^4$  larvas competentes con Iso-Cc,  $5 \times 10^4$  con *Isochrysis* sp. y  $4 \times 10^3$  con *C. calcitrans*.

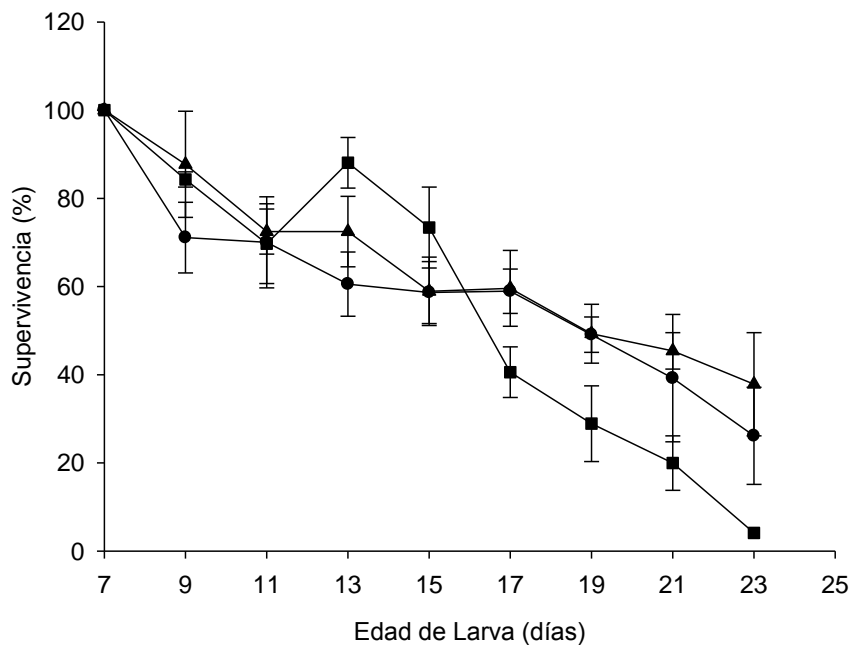


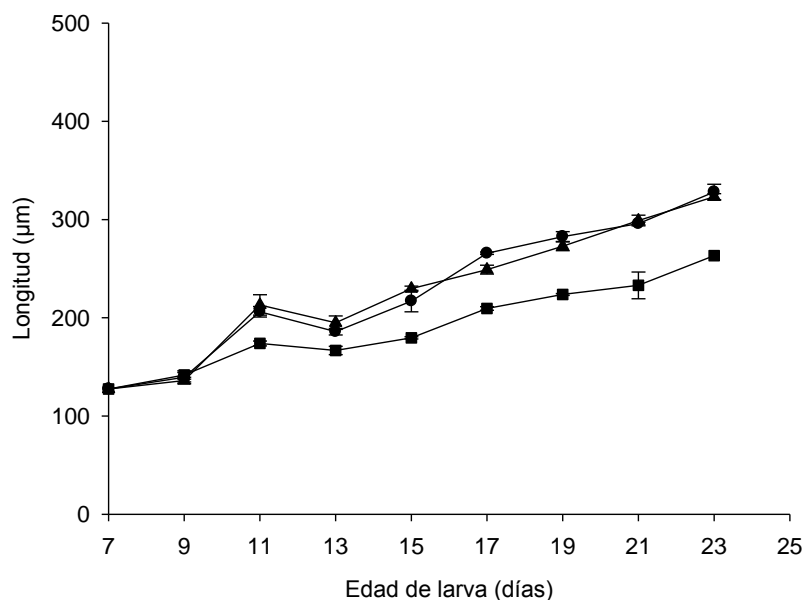
Figura 5. Supervivencia promedio (%) de larvas de *Panopea generosa* alimentadas con las microalgas *Isochrysis* sp. (●), *Chaetoceros calcitrans* (■) y la mezcla ISO-Cc (▲). Las barras verticales indican el error estándar (n=3).



### 3.2.2 Crecimiento larval

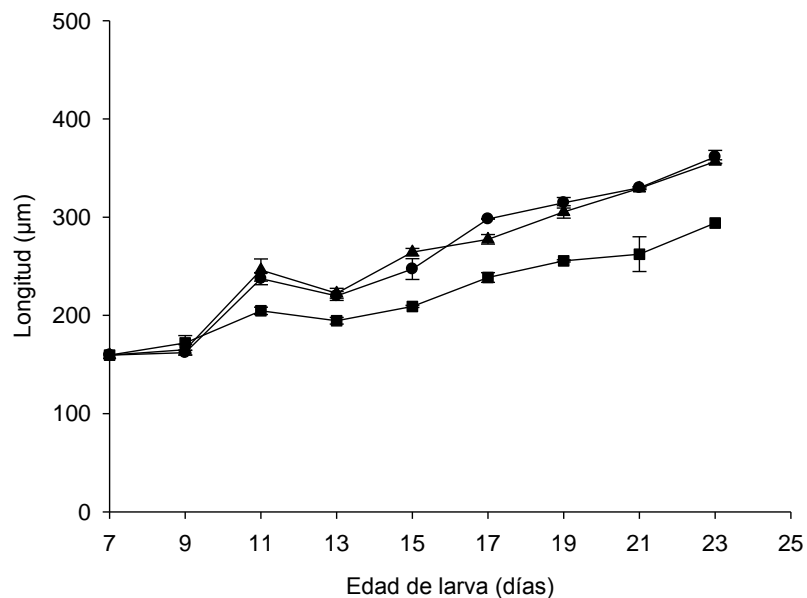
#### 3.2.2.1 Longitud

La longitud dorso-ventral inicial de los organismos era  $127 \pm 1.5 \mu\text{m}$ . Esta se incrementó conforme transcurrió el tiempo de cultivo (Fig. 6). Se presentaron diferencias significativas en la longitud promedio de las larvas a partir del día 11 después de la fertilización ( $P < 0.05$ ). La comparación de medias indicó diferencias significativas con los organismos de menor tamaño que fueron alimentados con *C. calcitrans*, que aquellos alimentados con *Isochrysis* sp. y la mezcla ISO-Cc. Sin embargo, no hubo diferencias entre la longitud antero-posterior de los organismos alimentados con estas dos últimas dietas. Las diferencias encontradas se mantuvieron hasta el final del experimento. Los organismos alimentados con *Isochrysis* sp. y la mezcla alcanzaron una longitud final de  $328 \pm 11.3$  y  $323 \pm 3.2 \mu\text{m}$ , mientras que aquellos alimentados con *Chaetoceros calcitrans* registraron una longitud final de  $263 \pm 10.9 \mu\text{m}$ .



**Figura 6.** Longitud dorso-ventral promedio ( $\mu\text{m}$ ) de larvas de *Panopea generosa* alimentadas con las microalgas *Isochrysis* sp. (●), *Chaetoceros calcitrans* (■) y la mezcla ISO-Cc (▲). Las barras verticales indican el error estándar ( $n=3$ ).

La longitud antero-posterior inicial de las larvas fue  $159 \pm 2.0 \mu\text{m}$ . El incremento en tamaño presentó la misma tendencia que la longitud dorso-ventral (Fig. 7). Se encontraron diferencias significativas a partir del día 11 (después de la fertilización) entre la longitud promedio de las larvas alimentadas con las distintas dietas. Las larvas alimentadas con *C. calcitrans* crecieron en menor proporción que aquellas alimentadas con *Isochrysis* sp. y la mezcla ISO-Cc ( $P < 0.05$ ). La longitud antero-posterior promedio al día 23 (después de la fertilización) fue de  $361 \pm 6.5 \mu\text{m}$  para las larvas alimentadas con *Isochrysis* sp.,  $356 \pm 1.5 \mu\text{m}$  para aquellas alimentadas con la mezcla ISO-Cc y  $294 \pm 9.8 \mu\text{m}$  para larvas alimentadas con *C. calcitrans*.



**Figura 7.** Longitud antero-posterior promedio ( $\mu\text{m}$ ) de larvas de *Panopea generosa* alimentadas con las microalgas *Isochrysis* sp. (●), *Chaetoceros calcitrans* (■) y la mezcla ISO-Cc (▲). Las barras verticales indican el error estándar ( $n=3$ ).

### 3.2.2.1.1 Tasa de crecimiento

El análisis de covarianza realizado para comparar las tasas de crecimiento dorso-ventral y antero-posterior indicó diferencias significativas. Los organismos alimentados con *C. calcitrans* presentaron menor tasa de crecimiento que los alimentados con *Isochrysis* sp. y la mezcla ISO-Cc, pero no hubo diferencias entre estos últimos (Fig. 8 y 9). Las tasas de crecimiento encontradas para las larvas alimentadas con *C. calcitrans* fueron de 7.8 y 7.9  $\mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$ , para los organismos alimentados con *Isochrysis* sp. fueron de 12.4 y 12.9  $\mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$  y para los alimentados con la mezcla ISO-Cc fueron de 11.9 y 12.1  $\mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$  para los ejes dorso-ventral y antero-posterior respectivamente.

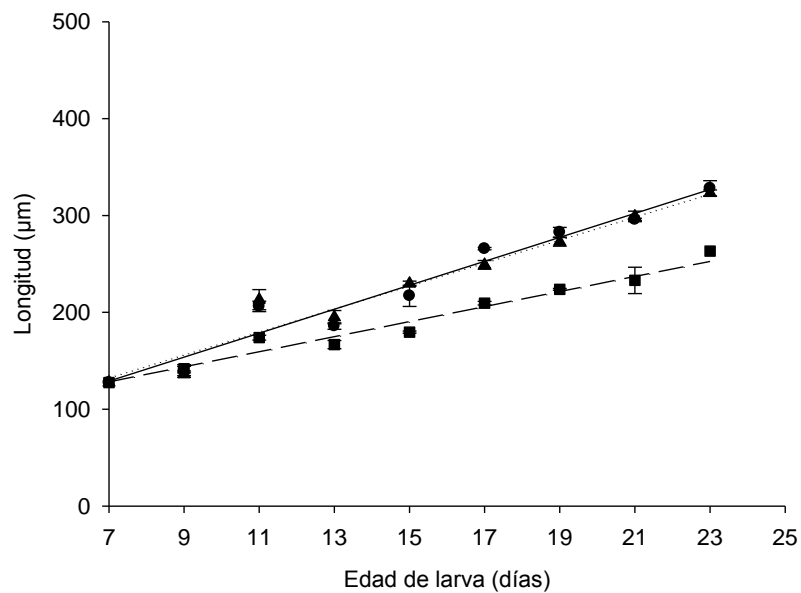


Figura 8. Tasa de crecimiento dorso-ventral ( $\mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$ ) de larvas de *Panopea generosa* alimentadas con las microalgas *Isochrysis* sp. (—●—), *Chaetoceros calcitrans* (- -■- -) y la mezcla ISO-Cc (···▲···). Las barras verticales indican el error estándar (n=3).

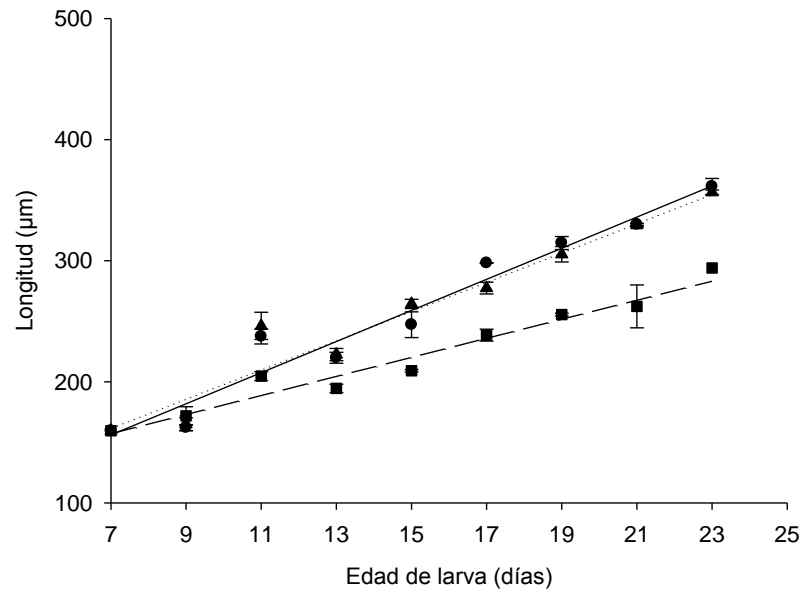


Figura 9. Tasa de crecimiento antero-posterior ( $\mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$ ) de larvas de *Panopea generosa* alimentadas con las microalgas *Isochrysis* sp. (—●—), *Chaetoceros calcitrans* (—■—) y la mezcla ISO-Cc (···▲···). Las barras verticales indican el error estándar (n=3).

### 3.2.2.1.2 Relación morfométrica DV/AP

Se realizó una comparación morfométrica entre las longitudes dorso-ventral y antero-posterior de los organismos alimentados con *Isochrysis* sp., *C. calcitrans* y la mezcla ISO-Cc. Esta relación es una medida de calidad de las larvas. Donde valores anómalos indican un crecimiento anormal de los organismos. Se encontraron variaciones en esta relación con las distintas dietas. Los organismos alimentados con *Isochrysis* sp. y la mezcla ISO-Cc presentaron una relación de 1.03 y 1.00 respectivamente. Sin embargo, las larvas alimentadas con *C. calcitrans* presentaron una relación de 0.98 (Tabla 7).

Tabla 7. Resumen del crecimiento y supervivencia promedio de larvas de *Panopea generosa* alimentadas con *Isochrysis* sp., *C. calcitrans* y la mezcla ISO-Cc. DV: eje dorso-ventral, AP: eje antero-posterior.

Variable	Especie		
	<i>Isochrysis</i> sp.	<i>C. calcitrans</i>	Mezcla ISO-Cc
Longitud DV inicial ( $\mu\text{m}$ )	127	127	127
Longitud AP inicial ( $\mu\text{m}$ )	159	159	159
Longitud DV final ( $\mu\text{m}$ )	328	263	323
Longitud AP final ( $\mu\text{m}$ )	361	294	294
Tasa de crecimiento AP ( $\mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$ )	12.3	7.7	11.8
Tasa de crecimiento DV ( $\mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$ )	12.8	7.8	12.0
Relación DV/AP	1.03	0.98	1.03
Supervivencia día 23 (%)	37	4	26

### 3.2.2.1 Peso seco

#### 3.2.2.1.1 Peso seco total

El peso seco total de las larvas de *Panopea generosa* se incrementó conforme transcurrió el cultivo. El valor inicial para los tres tratamientos fue de  $0.63 \mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$ . Al día 13 de cultivo, las larvas alimentadas con *Isochrysis* sp. y la mezcla ISO-Cc presentaron  $2.19$  y  $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$  respectivamente. Mientras que los organismos alimentados con *C. calcitrans* presentaron  $1.17 \mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$ , sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el PST de las larvas alimentadas con las tres dietas ( $P > 0.05$ ). Al día 19 los valores encontrados fueron de  $3.15$ ,  $3.01$  y  $1.73 \mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$  para los organismos alimentados con *Isochrysis* sp., la mezcla ISO-Cc y *C. calcitrans* respectivamente.

#### 3.2.2.1.2 Peso seco orgánico

El peso seco orgánico inicial de las larvas fue de  $0.44 \mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$ . No se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos en el día 13 de cultivo ( $P > 0.05$ ). Los organismos alimentados con *Isochrysis* sp. presentaron  $1.13 \mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$ , con *C. calcitrans*  $0.50 \mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$  y con la mezcla ISO-Cc  $1.08 \mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$ . Se registró un menor

incremento en la biomasa expresado en PSO que lo encontrado para el PST (Tabla 8). Al día 19 se encontraron valores de 1.15, 1.20 y 0.39  $\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$  para los organismos alimentados con *Isochrysis* sp., la mezcla ISO-Cc y *C. calcitrans* respectivamente.

**Tabla 8. Peso seco total ( $\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$ ) y peso seco orgánico ( $\mu\text{g}\cdot\text{org}^{-1}$ ) de larvas de *Panopea generosa* alimentadas con *Isochrysis* sp., *C. calcitrans* y la mezcla ISO-Cc. DDF: días después de la fertilización. A: Peso seco total. B: Peso seco orgánico. Error estándar entre paréntesis.**

DDF	Especie											
	<i>Isochrysis</i> sp.				<i>C. calcitrans</i>				Mezcla ISO-Cc			
	A		B		A		B		A		B	
7	0.63	(0.02)	0.44	(0.01)	0.63	(0.02)	0.44	(0.01)	0.63	(0.02)	0.44	(0.01)
13	2.19	(0.07)	1.13	(0.64)	1.16	(0.13)	0.50	(0.01)	2.50	(0.67)	1.08	(0.22)
19	3.58	(0.55)	1.15	(0.05)	1.73	(0.00)	0.38	(0.00)	3.01	(0.28)	1.20	(0.12)

## 4. Discusión

---

Los estudios sobre las poblaciones mexicanas de *Panopea generosa* son limitados (Aragón-Noriega *et al.*, 2012), por lo cual es necesario ampliar el conocimiento concerniente a su cultivo y particularmente al desarrollo larval de esta especie, en donde el relativo a la alimentación es de vital importancia.

Para la producción de *P. generosa*, al igual que para otros organismos filtradores de interés comercial, se depende del cultivo de microalgas, por tal motivo, muchas investigaciones se han centrado en la selección de especies adecuadas para su cultivo, ya sea en forma monoespecífica o en la mezcla de una o más especies.

Cuando se utilizan dietas mixtas de microalgas para moluscos bivalvos es necesario conocer la cantidad de materia orgánica presente en las mismas, ya que algunas especies tienen un contenido inorgánico hasta del 50%, como en el caso de las diatomeas (por su pared de sílice), lo cual podría ocasionar subestimaciones en el suministro de alimento. En este trabajo se formuló la dieta mixta en base al peso seco orgánico (PSO) y esta variable se evaluó en las dietas experimentales a través del ensayo de alimentación.

La tendencia de los datos de PSO indicó una mayor cantidad de materia orgánica para *Isochrysis* sp., seguido de la mezcla ISO-Cc y *C. calcitrans*, esto podría mostrar una mayor cantidad de nutrientes que pueden ser incorporados por las larvas de *P. generosa*. Por otra parte las diferencias significativas en el PSO entre los distintos días de muestreo en las tres dietas experimentales podrían ser atribuidas a la utilización de distintos lotes.

El PSO de la mezcla ISO-Cc obtenido en este trabajo fue menor a lo reportado por Cerón-Ortiz *et al.* (2009), quienes cultivaron microalgas con el medio f (Guillard y Rhyter, 1962), mientras que en el presente estudio se utilizó el medio f/2 (Guillard, 1975). Ambos medios difieren en que el medio f contiene el doble de nutrientes que el medio f/2. Sin embargo, si se compara el PSO de la mezcla ISO-Cc con el reportado

por Cerón-Ortiz *et al.* (2009), se puede observar que la diferencia entre los valores no es proporcional a la concentración de nutrientes en los medios utilizados, por lo que se puede sugerir el cultivar *Isochrysis* sp. y *C. calcitrans* con el medio f/2.

Comúnmente la calidad de las microalgas empleadas para alimentar a moluscos bivalvos se encuentra estrechamente relacionada con la composición bioquímica de las mismas. La cantidad de los constituyentes orgánicos obtenidos en este trabajo mostró la misma tendencia en las tres dietas experimentales, las proteínas se encontraron en mayor proporción que los lípidos y estos fueron mayores que los carbohidratos.

La tendencia de mayor cantidad de proteína en la dieta de *Isochrysis* sp. que en la mezcla ISO-Cc y en *C. calcitrans* se mantuvo a través del ensayo de alimentación. El contenido proteico de *Isochrysis* sp., de 4.3 a 17.6 pg•cél<sup>-1</sup> es similar a lo reportado por diversos autores en cultivos estáticos y semicontinuos de 2, 15, 18 y 200 L (Velazco-Blanco, 1997; Renaud *et al.*, 2002; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2008).

Cerón-Ortiz *et al.* (2009) reportaron mayor contenido proteico para la mezcla ISO-Cc (11.9 pg•cél<sup>-1</sup>) que en el presente trabajo, estas diferencias pueden ser debidas a que en este trabajo, durante el periodo de alimentación de *P. generosa* se recurrió a cultivos de distintos lotes, por la aparición continua de protozoarios, sin embargo, en todas las ocasiones se utilizaron cultivos en la fase exponencial, ya que se tiene documentado que cultivos en esta fase de crecimiento presentan entre el 30 y 40% de proteínas.

La cantidad de carbohidratos promedio observada en este estudio fue mayor en *Isochrysis* sp. (3.4 pg•cél<sup>-1</sup>) que en la mezcla ISO-Cc (1.1 pg•cél<sup>-1</sup>) y que en *C. calcitrans* (0.8 pg•cél<sup>-1</sup>). Diversos autores han reportado concentraciones superiores para *Isochrysis* sp. (Velazco-Blanco, 1997; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2008), para *C. calcitrans* (Velazco-Blanco, 1997) y para la mezcla ISO-Cc (Cerón-Ortiz *et al.*, 2009). El bajo contenido de carbohidratos encontrado en las dietas experimentales indica que los cultivos se encontraban en la fase de crecimiento exponencial, como era lo esperado, sin embargo esto no sería una limitante para la



alimentación larval de *Panopea*, ya que, como se mencionó anteriormente, en esta etapa de crecimiento los organismos no requieren grandes cantidades de carbohidratos (Marshall *et al.*, 2010).

El contenido lipídico de *Isochrysis* sp. y *C. calcitrans* se encuentra dentro de los valores reportados para esta especie en la fase exponencial de cultivo (Velazco-Blanco, 1997; Renaud *et al.*, 2002; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2008). Por otro lado, Cerón-Ortiz *et al.* (2009) reportaron mayor contenido de lípidos para la mezcla ISO-Cc que en el presente estudio. Las diferencias en el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos presentes en la mezcla ISO-Cc con respecto a lo reportado por Cerón-Ortiz *et al.* (2009) puede ser debido, como ya se mencionó anteriormente, a los diferentes medios empleados en ambos trabajos.

De acuerdo a Marshall *et al.* (2010) la calidad nutricional de las microalgas se debe evaluar en función de la supervivencia y el crecimiento de los organismos que son alimentados con éstas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, indicaron que la mezcla ISO-Cc no mejoró de manera significativa la supervivencia larval de *P. generosa*, aunque puede ser debido a la gran variabilidad de datos observada. También los resultados mostraron que los organismos alimentados con *C. calcitrans* presentaron una menor supervivencia que aquellos alimentados con *Isochrysis* sp. y la mezcla ISO-Cc (4, 26 y 37% respectivamente) en el día 23 DDF (día después de la fertilización). Marshall (2012) encontró un porcentaje de supervivencia del 32 % en larvas de *Panopea generosa* alimentadas con *Isochrysis* sp. para este mismo día de cultivo y bajo condiciones similares de densidad y alimentación. Este porcentaje es ligeramente mayor al obtenido en este trabajo (26%) con la misma dieta, estas diferencias podrían atribuirse a las diferentes raciones alimenticias utilizadas en ambos trabajos. Sin embargo en ese día de cultivo (23 DDF), Marshall (2012) reporta tallas entre 160 y 200  $\mu\text{m}$ , mientras que, en este estudio, estas tallas se observaron desde los 11 y los 13 DDF. Las supervivencias encontradas en esos días de cultivo son cercanas al 70%, lo cual es dos veces mayor a lo reportado por Marshall (2012).

Debido a la falta de estudios donde se evalúen mezclas de microalgas en el crecimiento y la supervivencia larval de *P. generosa*, se podrían comparar los resultados obtenidos con los de otras especies de bivalvos. Resultados similares al presente estudio han sido reportados por Yan *et al.* (2006), quienes evaluaron dietas monoalgales y mixtas para la almeja *Ruditapes decussatus* y encontraron que no hubo diferencias en la supervivencia y el crecimiento entre la dieta de *Isochrysis* sp. y la mezcla, por lo que concluyeron que el 50% de la dieta en base a *Isochrysis* spp. puede ser sustituido por *Chlorella* spp. sin afectar la supervivencia de esta especie.

Por otra parte, se ha encontrado que en Pteridos, Pectinidos y Mitílidos, el uso de la mezcla de las microalgas *Isochrysis* spp. y *Chaetoceros* spp. mejora la supervivencia larval de estos organismos (Martínez-Fernández *et al.*, 2006; Velazco-Blanco, 1997; Sánchez-Lazo y Martínez-Pita, 2014). Además Cerón-Ortiz *et al.* (2009) reportaron que las mezclas de microalgas que contenían *C. calcitrans* dieron mejores resultados en el cultivo de la escalopa *Nodipecten subnodosus*, los cuales se pueden atribuir a los altos niveles de EPA que contienen las microalgas del género *Chaetoceros*, los cuales pueden ser más del 30% del total de los ácidos grasos presentes en la diatomea (Cerón-Ortiz *et al.*, 2009; Rico-Villa *et al.*, 2006).

En contraste, los resultados obtenidos indicaron que las larvas alimentadas con la dieta monoalgal de *C. calcitrans* presentaron la menor supervivencia de las tres dietas experimentales (4%). Sin embargo, existen estudios que muestran que las microalgas *C. calcitrans* forma *pumilum* y *C. muelleri* proporcionados en forma monoespecífica son una dieta adecuada para larvas de *Crassostrea gigas* y *Ruditapes decussatus* respectivamente (Rico-Villa *et al.*, 2006 y Aranda-Burgos *et al.* 2014). El único estudio realizado con la almeja *Panopea generosa* fue el de Ren *et al.* (2014), quienes evaluaron el efecto de dietas monoalgales y mixtas de *Isochrysis* sp. y *C. muelleri* en la supervivencia y crecimiento de juveniles de *P. generosa*, encontraron que los organismos alimentados con *Isochrysis* sp. presentaron menor crecimiento que aquellos alimentados con *C. muelleri* y con la mezcla de ambas, esto podría indicar que en el caso de *P. generosa* podría presentarse un cambio en los requerimientos nutricionales de larvas a juveniles.

La tasa de crecimiento es otra variable de respuesta que se utiliza como indicador de calidad del desarrollo larval. Esta tasa es específica para cada especie y se utiliza comúnmente para comparar: a) los diferentes estadios de desarrollo, b) las distintas especies y/o c) condiciones de cultivo. En este trabajo se observaron mayores tasas de crecimiento en los organismos alimentados con *Isochrysis* sp. ( $12.8 \mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$ ) y la mezcla ISO-Cc ( $12.0 \mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$ ) que con *C. calcitrans* ( $7.7 \mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$ ). Pero éstas son menores a las reportadas por Tapia-Morales (2011) ( $6\text{-}17 \mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$ ). No obstante, en este estudio se evaluó el crecimiento hasta los días 34 y 38 DDF, por lo que estos resultados incluyen la etapa postlarval. Se ha descrito que una vez que los bivalvos completan la metamorfosis, las reacciones metabólicas se aceleran y por consiguiente el crecimiento se ve incrementado en igual medida (García-Esquivel *et al.*, 2001).

Gribben y Hay (2003) cultivaron larvas de *P. zelandica* y obtuvieron tasas de crecimiento menores ( $8.9 \mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$ ) a las reportadas en el presente estudio y también son menores a lo reportado para *Panopea globosa* del Golfo de California, la cual presenta las mayores tasas de crecimiento larval reportadas (hasta  $21.9 \mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$ ), hasta ahora, para el género *Panopea* (Ferreira-Arrieta, 2012).

Además de la calidad nutricional de las microalgas, al alimentar larvas de bivalvos se debe tomar en cuenta la cantidad de las mismas (Helm *et al.*, 2006). Marshall (2012) encontró que, con una densidad de  $5 \text{ larvas}\cdot\text{mL}^{-1}$  la ración alimenticia puede llegar a limitar de manera significativa el crecimiento larval de *P. generosa*. De acuerdo a Marshall (2012) la ración óptima es  $4 \times 10^4 \text{ cél}\cdot\text{larva}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$  (equivalente a  $2 \times 10^5 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ya que produjo los mejores resultados, mientras que, valores inferiores y superiores resultaron en un crecimiento larval significativamente menor. En este estudio se ajustó la ración alimenticia en función del tamaño de los organismos y para las tallas reportadas por Marshall (2012), se utilizó una ración menor (entre  $2.5$  y  $5 \times 10^4 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Por lo que, de utilizar una ración similar a la utilizada por Marshall (2012) se podría esperar un mejor crecimiento.

Las larvas de *P. globosa* y *P. generosa* presentan tasas de ingestión y de clareo similares con respecto a otras especies de moluscos bivalvos (Ferreira-Arrieta, 2012; Marshall, 2012). La tasa de aclaramiento es inversamente proporcional a la concentración de partículas en suspensión, mientras que la tasa de ingestión es directamente proporcional a ésta. A una concentración de  $200 \text{ cél}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (equivalente a  $2 \times 10^5 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) se alcanza la máxima capacidad gástrica del organismo, está varía en función de la tasa de aclaramiento, concentración de alimento, tamaño de partícula y tiempo de evacuación del tubo digestivo (Ferreira-Arrieta, 2012). En el presente estudio no se evaluó la tasa de aclaramiento ni la de ingestión, sin embargo, la ración suministrada a través del ensayo de alimentación fue inferior a la capacidad máxima mencionada por los autores anteriores, lo que podría sugerir que *P. generosa* pudo ingerir eficientemente el suministrado.

La almeja *Panopea generosa* es un organismo poiquilotermo. Por lo tanto, la temperatura influye en gran medida sobre sus procesos fisiológicos tales como la respiración, locomoción, alimentación y crecimiento (Fry, 1947). Dichos procesos, se aceleran conforme se incrementa la temperatura hasta rebasar el límite térmico de la especie, a partir del cual se presentan daños estructurales a nivel molecular, inactivación enzimática y de disponibilidad de oxígeno (Arney, 2013).

El efecto de la temperatura sobre las tasas de crecimiento de *P. generosa* se puede observar comparando aquellas reportadas por Marshall (2012) para la densidad de 5 larvas $\cdot\text{mL}^{-1}$  con respecto a las encontradas en este estudio con una densidad similar ( $2.8\text{-}3.9 \mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$  a  $14^\circ\text{C}$  y  $7.9\text{-}12.9 \mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$  a  $17^\circ\text{C}$  respectivamente). Estas diferencias pueden ser debidas a las temperaturas empleadas en cada estudio. Al respecto, Arney (2013) evaluó el efecto de la temperatura ( $7, 11, 15$  y  $19^\circ\text{C}$ ) en el crecimiento de juveniles de *P. generosa*. Este autor encontró que la temperatura de  $19^\circ\text{C}$  produjo el mejor crecimiento en longitud. Sin embargo, los organismos mantenidos a esta temperatura disminuyeron su PSO. Por lo cual, recomienda la temperatura de  $15^\circ\text{C}$  para el cultivo de juveniles de *P. generosa*.

También, la calidad de los gametos determina el éxito del desarrollo larval de los moluscos bivalvos (Utting y Millican, 1997). Buitimea-Álvarez (2011) observó tasas de crecimiento de 1.0 a 3.7  $\mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$  en *Panopea generosa*, las cuales son menores a las encontradas en el presente estudio. Estos valores se atribuyen a que, este autor utilizó gametos obtenidos mediante la técnica de raspado gonadal, razón por la cual, observó bajas tasas de fertilización, de crecimiento y de supervivencia, mientras que en esta tesis los gametos fueron obtenidos de desoves inducidos por tratamiento hormonal.

Se ha documentado que en *Panopea generosa* es necesario que los ovocitos pasen a través del oviducto para que se reanude el proceso de maduración final (García-Esquivel *et al.*, 2013). Caso contrario ocurre con *P. globosa*, *P. zelandica* y otras especies de bivalvos como el ostión japonés *Crassostrea gigas*, en los cuales, se ha utilizado la técnica de raspado gonadal con éxito (Buitimea-Álvarez, 2011; Ferreira-Arrieta, 2012; Gribben y Hay, 2003; Rico-Villa *et al.*, 2006). Para estas especies, el agua de mar promueve el proceso de maduración final de los ovocitos y de liberación del folículo ovárico, obteniéndose tasas de fertilización adecuadas.

Aunado a los factores mencionados anteriormente, la selección por tallas influye en el crecimiento y la supervivencia larval de *P. generosa*. En las empresas de producción comercial de bivalvos ésta es una práctica común, ya que, al retirar aquellas larvas deformes y que tienen lento crecimiento, se disminuye la mortalidad de los organismos que se desarrollan adecuadamente. Lo anterior se debe a que la muerte inevitable de los organismos no aptos, promueve el desarrollo bacteriano y de otros organismos que podrían ser perjudiciales para las larvas restantes.

Debido a que uno de los objetivos fue evaluar la supervivencia larval, no se pudieron retirar los organismos deformes y de bajo crecimiento de las unidades de evaluación, lo que probablemente contribuyó a las mortalidades observadas a lo largo del bioensayo. Por lo cual, para estudios posteriores se recomienda separar larvas deformes y de bajo crecimiento, cuantificarlas y monitorearlas en una unidad de evaluación independiente para comparar la supervivencia y el crecimiento de las mismas con aquellos organismos de crecimiento normal.

Cuando se evalúan dietas de microalgas en larvas de moluscos bivalvos se analiza comúnmente la calidad de las microalgas (Martínez-Fernández y Southgate, 2007), así como también la supervivencia y crecimiento larval (Marshall *et al.*, 2010; Carreño-Hernández *et al.*, 2012). Normalmente el crecimiento se evalúa en función de la longitud de la concha. Sin embargo, el incremento en masa es más preciso (Saucedo y Southgate, 2008). Lo anterior se debe a que los organismos pueden crecer en longitud pero no en materia orgánica. Esto se observó en los organismos alimentados con *C. calcitrans*, los cuales presentaron una disminución en el PSO del día 13 al 19, mientras que la longitud se incrementó. Esto implica que aunque la larva crezca en longitud, no necesariamente tiene las reservas energéticas para realizar el proceso de metamorfosis. Este aspecto es un cuello de botella en la producción de semilla de bivalvos (Helm *et al.*, 2006).

Los procesos de asentamiento y metamorfosis son un punto crítico en la historia de vida de bivalvos (Helm *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2013). Estos son regulados por diversos factores extrínsecos e intrínsecos (Hadfiel, 1984) e implican el cambio de una vida pelágica a una bentónica, además del cambio anatómico en las estructuras alimenticias (Zardus y Martel, 2006). Lo anterior significa que durante la metamorfosis, el organismo no se alimenta y depende de sus reservas endógenas acumuladas durante su vida larvaria.

La talla a la cual los organismos son aptos para la metamorfosis es particular a la especie. Los organismos alimentados con *Isochrysis* sp. y la mezcla ISO-Cc alcanzaron una talla de  $361 \pm 6.5$  y  $356 \pm 1.5$   $\mu\text{m}$  respectivamente al día 23 DDF. Estos resultados coinciden con lo descrito por Goodwin y Pease (1989), los cuales mencionan que la talla de metamorfosis para *P. generosa* se encuentra ente los 350 y 400  $\mu\text{m}$ . Por otra parte los organismos alimentados con *C. calcitrans* no alcanzaron la talla de metamorfosis ( $294 \pm 9.8$   $\mu\text{m}$ ).

Se ha documentado que *P. globosa* se metamorfiza a tallas similares que *P. generosa* (Ferreira-Arrieta, 2012), mientras que *P. zelandica* tiene tallas de metamorfosis de 250

$\mu\text{m}$  (Gribben y Hay, 2003). En estudios de desarrollo larval de moluscos bivalvos se ha utilizado al ostión japonés (*Crassostrea gigas*) como modelo. Esta especie se asienta a las 280  $\mu\text{m}$  de longitud (Rico-Villa *et al.*, 2006).

El día de metamorfosis es otra variable influenciada por la calidad larval y depende de la especie. La talla de metamorfosis se encontró al día 23 DDF en los organismos alimentados con *Isochrysis* sp. y la mezcla ISO-Cc. Goodwin y Peace (1989) mencionan que la duración del desarrollo larval de *P. generosa* es influenciada en mayor medida por la temperatura, a 14 °C se ha observado que la talla de metamorfosis se alcanza hasta los 47 DDF, mientras que a 16 °C se redujo a solo 16 DDF.

El periodo larval descrito por Tapia-Morales (2011) es mayor al reportado en el presente estudio, ya que reporta que el día de metamorfosis de *P. generosa* varió desde los 25 hasta los 36 DDF en función del tipo y de la concentración de antibiótico utilizado. Este periodo larval más largo se puede atribuir a las diferencias en las condiciones experimentales. Otros estudios realizados con *P. globosa* indicaron que alcanza la talla de metamorfosis de los 11 a los 15 DDF según Buitimea-Álvarez (2011) y de los 13 a 14 DDF de acuerdo a Ferreira-Arrieta (2012). Estas diferencias se pueden atribuir a las altas tasas de crecimiento de *P. globosa* y a la temperatura a la cual se cultiva (22 °C). Por otra parte, Gribben y Hay (2003) reportaron que *P. zelandica* alcanza la talla de metamorfosis a los 16 DDF. Esta duración del periodo larval coincide con lo reportado para el ostión japonés *Crassostrea gigas* por Rico-Villa *et al.*, (2006).

Los resultados encontrados en esta tesis crean un marco de referencia sobre el uso de dietas mixtas de microalgas en el desarrollo larval de *P. generosa*, las cuales permiten mejorar la producción de semilla de esta especie en laboratorio, así como también brindan información básica sobre la biología de la especie que puede ser de utilidad en la formulación de nuevos proyectos de investigación o en procesos productivos. Con lo cual se promueve el aprovechamiento del recurso con fines de acuicultura y/o repoblamiento.

## Conclusiones

- La dieta monoalgal de *Isochrysis* sp. presentó mayor PSO, proteínas, carbohidratos y lípidos que la mezcla ISO-Cc y la dieta monoalgal de *Chaetoceros calcitrans*.
- La supervivencia y el crecimiento larval de *Panopea generosa* fue mayor con la dieta monoalgal de *Isochrysis* sp.
- La dieta monoalgal de *Isochrysis* sp. y la mezcla ISO-Cc son adecuadas para la alimentación de *Panopea generosa*.
- Se recomienda continuar los estudios con la inclusión de otras especies de microalgas ampliamente usadas en acuicultura para la alimentación de *P. generosa*.



## Lista de referencias

- Aragón-Noriega, E. A., Chávez-Villalba, J., Gribben, P. E., Alcántara-Razo, E., Maeda-Martínez, A. N., Arambula-Pujol, E. M., García-Juárez, A. R. y Maldonado-Amparo, R. (2007). Morphometric relationships, gametogenic development and spawning of the geoduck clam *Panopea globosa* (Bivalvia: Hiatellidae) in the central Gulf of California. *Journal of Shellfish Research*. 26(2), 423-431.
- Aragón-Noriega, E. A., Alcántara-Razo, E., Calderón-Aguilera, L. E. y Sánchez-Fourcade, R. (2012). Status of geoduck clam fisheries in México. *Journal of Shellfish Research*. 31(3), 733-738.
- Arámbula-Pujól, E. M., García-Juárez, A. R., Alcántara-Razo E. y Aragón-Noriega, E. A. (2008). Aspectos de la biología reproductiva de la almeja de sifón *Panopea generosa*. *Hidrobiológica* 18(2), 89-98.
- Arney, B. D., (2013). Thermal and dietary optimization in the hatchery culture of juvenile pacific geoduck clam (*Panopea generosa*, Gould, 1850). Master of Science Thesis. University of British Columbia. 131 p.
- Badillo-Salas, C. E., Valenzuela-Espinoza, E., González-Gómez, M. A., Pares-Sierra, G., Ley-Lou, F. y García-Esquivel Z. (2009). Comparative growth of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) postlarvae with microfeed and microalgal diets. *Aquacult. Int.* 17(2), 173-186
- Bligh, G.E. y Dyer, J. W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37(3), 911-917 p.
- Breen, P. A., Gabriel, C. y Thyson T. (1991). Preliminary estimates of age, mortality, growth, and reproduction in the hiatellid clam *Panopea zelandica* in New Zeland. *New Zeland Journal of Marine and Freshwater research*. 25 (3), 231-237.
- Brown, M. R., (2002). Nutritional value and use of microalgae for aquaculture. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G. y Simoes, N. (eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.3, 281-291
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K. y Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151(1), 315-331.

- Buitimea-Álvares, M. I. (2011). Efecto de la salinidad y temperatura sobre el desarrollo larval de *Panopea* spp. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California. 30 p.
- Caers, M., Coutteau, P. y Sorgeloos, P. (1999). Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. *Aquaculture* 170(3), 307-322.
- Calderón-Aguilera, L. E., Aragón-Noriega, E. A., Hand, C. M. y Moreno-Rivera, V. M. (2010). Morphometric relationships, age, growth, and mortality of the geoduck clam, *Panopea generosa*, along the pacific coast of Baja California, México. *Journal of Shellfish Research*. 29 (2): 319-326.
- Calderón-Aguilera, L. E., Aragón-Noriega, E. A., Morales-Bojórquez, E., Alcántara-Razo, E. y Chávez-Villalba, J. (2014). Reproductive cycle of the geoduck clam *Panopea generosa* at its southernmost distribution limit. *Marine Biology Research*. 10(1), 61-72.
- Carreño-Hernández, Y. K., Acosta-Ortiz, E., Gómez-León, J. (2012). Crecimiento y supervivencia de larvas de *Argopecten nucleus* alimentadas con diferentes dietas microalgales. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 41(1), 103-120.
- Carvalho, Y. B. M., Ferreira, J. F., Da Silva, F. C. y Bercht, M. (2013). Factors influencing larval settlement of the atlantic lion's paw scallop, *Nodipecten nodosus*. *Journal of Shellfish Research*. 32(3), 719-723.
- Cerón-Ortiz, A. N., Cordero, B., Arredondo-Vega, B. O., Voltolina, D. (2009). Effect of algal diet and temperature on survival, growth and biochemical composition of spat of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Aquaculture* 298 (1), 64-69.
- Chew, K. K. (1998). Update on geoduck clam culture in the Pacific Northwest. *Aquaculture Magazine* 24, 79-82.
- Coan, E. V., Scott, P. V., and Bernard, F. R. (2000). *Bivalve seashells of western North America: marine bivalve mollusks from Arctic Alaska to Baja California* (No. 2). Santa Barbara Museum of Natural History. No tiene páginas
- Contreras, R., Pacheco, E. y Puebla, C. (2014). Desarrollo embrionario y larval temprano de *Gari solida* (Gray, 1828) (Bivalvia: Psammobiidae). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 42(1), 283-288.

- Cordero-Esquivel, B. y Voltolina, D. (1996). Nutritional Value of Preserved Microalgae for Subadult *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 27(113-118).
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J. K., Rebers P.A. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*28 (3),350-356
- FAO. (2014). The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Rome. 223pp.
- Farías, A. (2008). Nutrición y alimentación en moluscos bivalvos. En: A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds.). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 297-308.
- Farías, A. y Uriarte, I. (2002). Nutrición en larvicultura de pectínidos: relevancia de proteínas y lípidos. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Ferreira-Arrieta, A. (2012). Crecimiento y tasas de alimentación de la almeja de sifón, *Panopea globosa* durante el desarrollo larval. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California. 33 p.
- Ferreira, M., Maseda, A., Fábregas, J. y Otero, A. (2008). Enriching rotifers with “premium” microalgae *Isochrysis* aff. *galbana* clone. *Aquaculture*. 279(1), 126–130 p.
- Fry, F. E. J. (1947). Effects of the environment on animal activity. Toronto, University of Toronto Press.
- García-Esquivel, Z., Bricelj, V. M., Gonzalez-Gomez, M. A. (2001). Physiological basis for energy demands and early postlarval mortality in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Exp Mar Biol Ecol* 26(3), 77–103
- García-Esquivel, Z., Valenzuela-Espinoza, E., Buitimea, M. I., Searcy-Bernal, R., Anguiano-Beltran, C. y Ley-Lou, F. (2013). Effect of lipid emulsion and kelp meal supplementation on the maturation and productive performance of the geoduck clam, *Panopea globosa*. *Aquaculture* 396(39) 25-31.

- Goodwin, L., Shaul, W., Budd, C. (1979). Larval development of the geoduck clam (*Panopea generosa*, Gould). *Proc. Natl. Shellfish. Assoc.* 69, 73-76.
- Goodwin, C. L. y B. Pease. (1989). Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Northwest)—Pacific geoduck clam. U.S. Fish. Wildl. Serv. Biol. Rep. 82(11.120). U.S. Army Corps of Engineers, TR EL-82-4. 14 p.
- Gribben, P. E. y Hay, B. E. (2003). Larval development of the New Zealand geoduck *Panopea zelandica* (Bivalvia: Hiatellidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 37(2), 231-239.
- Guadamud-Mejía, T. X. (2012). Desarrollo gonadal de la almeja *Panopea generosa* en Punta Canoas, Baja California, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Departamento de Acuicultura, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 66 pp.
- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: *Culture of marine invertebrate animals* 29-66.
- Guillard, R. R. L. y Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology* 8(2), 229-239.
- Hafield, M. G. (1984). Settlement requirements of molluscan larvae: new data on chemical and genetic roles. *Aquaculture* 39(1), 283-294.
- Helm, M. M., Bourne, N. y Lovatelli, A. (2006). Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. *FAO* 184 pp.
- Hendriks, I. E., van Duren, L. A. y Herman, P. M. J. (2003). Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 296(2), 199-216.
- His, E., Robert, R. y Dinet, A. (1989). Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oysters *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 100 (4), 455-463.
- Jonsson, P. R., Berntsson, K. M., André, C. y Wängberg, Å. (1999). Larval growth and settlement of the European oyster (*Ostrea edulis*) as a function of food quality measured as fatty acid composition. *Marine Biology* 134(3), 559–570.

- Kheder, R. B., Quéré, C., Moal, J. y Robert, R. (2010). Effect of nutrition on *Crassostrea gigas* larval development and the evolution of physiological indices. Part A: Quantitative and qualitative diet effects. *Aquaculture* 305(1), 165-173.
- Labarta, U., Fernández-Reiriz, M. J. y Pérez-Camacho, A. (1999). Dynamic of fatty acids in the larval development, metamorphosis and post-metamorphosis of *Ostrea edulis* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology* 123(3), 249-254.
- Liu, W., Pearce, C. M., Alabi, A. O. y Gurney-Smith, H. (2009). Effects of microalgal diets on the growth and survival of larvae and post-larvae of the basket cockle, *Clinocardium nuttallii*. *Aquaculture* 293(3), 248-254.
- Lovatelli, A., Vannuccini, S. y McLeod, D. (2008). Current status of world bivalve aquaculture and trade. En: A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds.). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*. No. 12. Roma, FAO. pp. 45–59.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J. Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biotech. Chem.* 193(1), 265-272.
- Maeda-Martínez, A. N. (2008). Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En: A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds.). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*. No. 12. Roma, FAO. pp. 91–100.
- Magnesen, T. y Jacobsen, A., (2012). Effect of recirculation on seawater quality and production of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *Aquacultural Engineering* 47, 1-6.
- Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H. y Southgate, P. C. (2006). The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) larvae. *Aquaculture* 257(1), 491-503.
- Martínez-Fernández, E. y Southgate, P. C. (2007). Use of tropical microalgae as food for larvae of the black-lip Pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquaculture* 263(1), 220-226.
- Marshall, R. (2012), Broodstock conditioning and larval rearing of the geoduck clam (*Panopea generosa*, Gould, 1850). Doctoral Thesis. University of British Columbia. 213 p.

- Marshall, R., McKinley, S. y Pearce, C. M. (2010). Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture* 2(1), 33-35.
- Marshall, R., McKinley, S. y Pearce, C. M. (2012). Effect of temperature on gonad development of the pacific geoduck clam, *Panopea generosa* (Gould, 1850). *Aquaculture* 338, 264-273.
- Marshall, R., McKinley, S. y Pearce, C. M. (2014). Effect of ration on gonad development of the pacific geoduck clam, *Panopea generosa* (Gould, 1850). *Aquaculture Nutrition*.
- Morsán, E. y Ciocco, N. F. (2004). Age and growth model for the southern geoduck, *Panopea abbreviata*, off Puerto Lobos (Patagonia, Argentina). *Fisheries Research* 69(3), 343-348.
- Pande, S. V., Parvin, R.K. y Venkitasubramanian T. A. (1963). Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analyt. Biochem.* 6(5), 415-423 p.
- Pernet, F., Tremblay, R., Demers, E. y Roussy, M. (2003). Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system. *Aquaculture* 221 (1), 393-406.
- Pettersen, A. K., Turchini, G. M, Jahangard, S., Ingram, B. A. y Sherman C. D. H. (2010). Effects of different dietary microalgae on survival, growth settlement and fatty acid composition of blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) larvae. *Aquaculture* 309(1), 115-124.
- Ponis, E., Probert I., Véron, B., Le Coz, J. R., Mathieu, M. y Robert, R. (2006). Nutritional value of six Pavlovophyceae for *Crassostrea gigas* and *Pecten maximus* larvae. *Aquaculture* 254(1), 544-553.
- Ramírez-Félix, E., Márquez-Farías, J. F., Massó-Rojas, J. A., Vázquez-Solórzano, E., Castillo-Vargas y Machuca, S. G. (2012). La pesca de almeja *Panopea* spp. en el noroeste de México. *Ciencia Pesquera* 20(2), 57-66.
- Randall, D., Burggren, W., French K. y Fernald, R. (1997). Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations. (4th ed). W. H. Freeman and Company New York.
- Raush, T. (1981). The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass. I. Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiologia* 78(3), 237-251 p.

- Ren, Y., Liu, W., Pearce, C. M., Forster, I. y McKinley, R. S. (2014). Effects of selected mixed-algal diets on growth and survival of early postset juveniles of the pacific geoduck clam, *Panopea generosa* (Gould, 1850). *Aquaculture nutrition*.
- Renaud, M., Thinidis, L., Lambrinidis, G. y Parry, D. (2002). Effect of temperature on growth chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch culture. *Aquaculture* 211(1), 195-214.
- Rico-Villa, B., Le Coz, J. R., Mingant, C. y Robert, R. (2006). Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256(1), 377-388.
- Riisgård, H. U. (1988). Feeding rates in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) veliger larvae as a function of algal (*Isochrysis galbana*) concentration. *Journal of Shellfish Research* 7(3) 377-380.
- Sánchez-Lazo, C. y Martínez-Pita, I. (2014). Effects of different mono, bi and trispecific microalgal diets on survival, growth, development, settlement and fatty acid composition of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) larvae. *Aquaculture* 426, 138-147.
- Sarkis, S. y Lovatelli, A. (2007). Installation and operation of a modular bivalve hatchery. *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 492. Rome, FAO. 173p.
- Saucedo, P. E., González-Jiménez, A., Acosta-Salmón, H., Mazón-Suástegui, J.M. y Ronsón-Paulín, J.A. (2013). Nutritional value of microalgae-based diets for lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) juveniles reared at different temperatures. *Aquaculture* 392, 113-119.
- Saucedo, P. E. y Southgate, P. C. (2008). Reproduction, development and growth. En: Southgate, P. C. y Lucas J. S. (2008). *The pearl oyster*, 231-272.
- Straus K. M., Crosson, L. M. y Vadopalas, B. (2009). Effects of geoduck aquaculture on the environment: A synthesis of current knowledge. Washington Sea Grant Technical Report WSG-TR 08-01.
- Tapia-Morales, S. (2011). Efecto del cloranfenicol y la gentamicina sobre el desarrollo larval de la almeja generosa, *Panopea generosa*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California. 43p.
- Thompson, P. A. y Harrison, P. J. (1992). Effects of monospecific algal diets of varying biochemical composition on the growth and survival of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Marine Biology* 113(4), 645-654.

- Uriarte, I. (2008). Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. En: A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds.). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*. No. 12. Roma, FAO. pp. 61–75.
- Utting, S. D. y Millican, P. F. (1997). Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture* 155(1), 45-54.
- Vadopalas, B., Pietsch, T. W. y Friedman, C. S. (2010). The proper name for the geoduck: resurrection of *Panopea generosa* Gould, 1850, from the synonymy of *Panopea abrupta* (Conrad, 1849) (Bivalvia: Hiatellidae). *Malacologia* 52(1), 169-173.
- Valenzuela-Espinoza, E., Gendrop-Funes, V., Pérez-Castañeda, R. y Wilburn-González, J.G. (1999). Supervivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei* (Boone) alimentadas con *Chaetoceros muelleri* producido con fertilizantes agrícolas. *Ciencias Marinas* 25(3), 423-437.
- Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R. y Núñez-Cebrero, F. (2002). Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis aff. galbana* (clone T-iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural Engineering* 25(4), 207-216.
- Velasco-Blanco, G. (1997). Cultivo larvario a nivel piloto del callo de hacha *Atrina Maura* Sowerby y de la almeja mano de león *Lyropecten subnodosus* Sowerby con dos especies de microalgas. Tesis de Maestría en Ciencias. Departamento de Ecología, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 59 pp.
- Voltolina, D., Nieves, M. y Piña, P. (2000). Calidad de microalgas para la acuicultura. pp 28-32 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz Suárez, L.E. (eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.
- Whyte, J. N. C. (1987). Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60(3), 231-241.
- Whyte, J. N. C., Bourne, N. y Hodgson, C. A. (1989). Influence of Algal Diets on Biochemical Composition and Energy Reserves in *Patinopecten yessoensis* (Jay) Larvae. *Aquaculture* 78(3), 333-347.



- Wilson, J. A., Chaparro, O.R. y Thompson, R. J. (1996). The importance of broodstock nutrition on the viability of larvae and spat in the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Aquaculture* 139(1), 63-75.
- Yan, X., Zhang, G. y Yang, F. (2006). Effects of diet, stocking density, and environmental factor on growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum* larvae. *Aquaculture* 253(1), 350-358.
- Zaidman, P. C., Kroeck, M. A., Kissner, E. M. O. y Morsán, E. M. (2012). Reproductive pattern of Southern geoduck, *Panopea abbreviata*, at El Sótano (San Matías Gulf, Patagonia, Argentina). *Marine Biology Research* 8(2), 172-181.
- Zardus, J. D. y Martel, L. M. (2006). Phylum Mollusca: Bivalvia. En: Young, C. M., Sewell, M. A., Rice, M. E. 2006. Atlas of Marine Invertebrate Larvae. Elsevier. 626p.