

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Programa de Posgrado en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Evaluación del crecimiento de juveniles de abulón rojo  
(*Haliotis rufescens*) alimentados con *Macrocyctis pyrifera*  
enriquecida con microalgas epifitas y nutrientes**

Tesis

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

Presenta:

**Laura Karina Rangel Mendoza**

Ensenada, Baja California, México  
2016

Tesis defendida por  
**Laura Karina Rangel Mendoza**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra**  
Director de tesis

**Dr. David Alfaro Siqueiros Beltrones**

**Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez**

**Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes**



---

**Dr. Benjamín Barón Sevilla**  
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Laura Karina Rangel Mendoza** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

**Evaluación del crecimiento de juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) alimentados con *Macrocystis pyrifera* enriquecida con microalgas epifitas y nutrientes**

Resumen aprobado por:

---

**Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra**  
Directora de tesis

El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento y la supervivencia de juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) alimentados con *Macrocystis pyrifera* enriquecida con microalgas epifitas y nutrientes. Para contrastar la hipótesis que propone que, tanto el peso como la talla de juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) incrementarán en menor tiempo al suministrar como alimento *M. pyrifera* enriquecida, en comparación con aquellos abulones alimentados solo con *M. pyrifera* sin tratamiento. Se realizaron ensayos con ocho especies de microalgas como epifitas y diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo (N:P) en relación 16:1, para seleccionar la concentración que cambiara la composición proximal aumentando las proteínas. Se encontró que las tasas de crecimiento de las ocho especies de microalgas fueron significativamente diferentes, la composición proximal y el peso orgánico de *M. pyrifera* cambiaron significativamente por efecto de la especie de microalga y del tiempo de epifitación. *Phormidium* sp. mostró la mayor densidad de células epifitas y en el medio de cultivo. *Phormidium* sp., *Navicula* cf. *ulvaceae* y *Grammatophora marina* son las especies que mayor cambio producen en los componentes de la composición proximal. Se encontró un decremento del contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos y en el peso orgánico de *M. pyrifera* por efecto de las altas concentraciones de N:P (22:1.37 mM, 44:2.75 mM, 66:4.12 mM, 88:5.5 mM y 1:0.06 M). Lo anterior, motivó a evaluar el efecto de dos bajas concentraciones de N:P (14:0.87  $\mu$ M y 200:12.05  $\mu$ M) en el enriquecimiento de *M. pyrifera*, las cuales promovieron un aumento significativo del porcentaje de proteínas en *M. pyrifera*. Con el propósito de obtener biomasa para realizar un bioensayo con juveniles de abulón, se seleccionó a *G. marina* y la concentración de N:P (200:12.05  $\mu$ M) para realizar un enriquecimiento masivo para cada caso usando 4 kg de peso húmedo de *M. pyrifera*. Se encontró una tasa de crecimiento significativamente mayor en los juveniles de abulón al ser alimentados con *M. pyrifera* enriquecida con *G. marina*. La tasa de conversión alimentaria fue menor en los tratamientos con mayor porcentaje de proteína y lípidos, que correspondieron al uso como alimento de *M. pyrifera* enriquecida con *G. marina* y con N:P (200:12.05  $\mu$ M). La tasa específica de crecimiento, la tasa de eficiencia proteica, la relación proteína/energía, la energía total teórica y la supervivencia de los abulones fueron mayores en el tratamiento de alimentación con *M. pyrifera* enriquecida con *G. marina*. Se concluye que los enriquecimientos de láminas de *M. pyrifera* con bajas concentraciones de nutrientes (N:P de 200:5.12  $\mu$ M) y con *G. marina* como epifita, proporcionan un mayor aporte nutricional y producen un incremento en el peso y la talla de los juveniles de abulón, respecto a las láminas sin enriquecer.

**Palabras clave:** Enriquecimiento, *M. pyrifera*, diatomeas, cianobacterias, nitrógeno, fósforo, composición proximal, *Haliotis rufescens*, crecimiento, supervivencia.

Abstract of the thesis presented by **Laura Karina Rangel Mendoza** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

**Evaluation of growth of juveniles of red abalone (*Haliotis rufescens*) fed with *Macrocystis pyrifera* enriched with microalgae and nutrients**

Abstract approved by:

---

**Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra**  
Thesis Director

The aim of this work was to assess the growth and survival of juveniles of red abalone (*Haliotis rufescens*) fed with *Macrocystis pyrifera* enriched with epiphytic microalgae and nutrients. In order to contrast the hypothesis proposed that the weight and size of juveniles of red abalone (*Haliotis rufescens*) will increase in a shorter time when are feeding with enriched *M. pyrifera* than abalones fed only with *M. pyrifera*. Assays were performed using eight species as epiphytes and different nitrogen and phosphorus (N:P) concentrations in proportion 16:1, to select the concentration that modified the proximate composition and increased the proteins. The growth rates of eight microalgae species were significantly different, the proximate composition and organic weight of *M. pyrifera* changed significantly due to the microalgae species and by effect of epiphytation time. *Phormidium* sp. obtained the highest density of epiphytes and density in the culture medium. Meanwhile, *Phormidium* sp., *Navicula* cf. *ulvaceae*, *Grammatophora marina* and *Amphora tenerrima* were the strains that presented the greatest change in the proximate composition components. The high concentrations of N:P enrichment (22:1.37 mM, 44:2.75 mM, 66:4.12 mM, 88:5.5 mM and 1:0.06 M), decreased the content of proteins, carbohydrates, lipids and organic weight of *M. pyrifera* content. This led to an evaluation of the effect of two low concentrations of N:P (14:0.87  $\mu$ M and 200:5.12  $\mu$ M) on enrichment of *M. pyrifera*, which promoted an increase in the proteins percentages in *M. pyrifera*. For the feeding bioassay with abalones, was selected *G. marina* and N:P ratio of 200:12.05  $\mu$ M to realized a massive enrichment with 4 kg of wet weight of *M. pyrifera*. A significant higher growth rate of juvenile abalone (weight and length) was obtained when fed with *M. pyrifera* enriched with *G. marina*. The feeding rate conversion was significantly lower in treatments containing higher percentage of proteins and lipids, which corresponded to *M. pyrifera* enriched with *G. marina* and N:P (200:5.12  $\mu$ M). The specific growth rate, protein efficiency, protein/energy ratio, total theoretical energy and survival were highest when the abalones were fed with *M. pyrifera* enriched with *G. marina*. We conclude that the enrichments of *M. pyrifera* leaves with low concentrations of nutrients (N:P of 200:5.12  $\mu$ M) and epiphytes with *G. marina* produce a higher nutritional value resulting in an increase in weight and size of juvenile abalone, with respect to unenriched leaves.

**Keywords:** Enrichment, *M. pyrifera*, microalgae, nitrogen, phosphorus, diatoms, cyanobacter, proximate composition, *Haliotis rufescens*, growth, survival.

## **Dedicatoria**

A mi familia; Senorina Mendoza, José Martín Rangel y José Antonio Rangel por enseñarme con su ejemplo para ser fuerte, fluir y confiar en lo que la vida me proponga.

A Hipatia del mar por enseñarme a amar en un presente que siempre es perfecto.

A las macroalgas, microalgas y a mis 400 abulones que fueron los autores principales de este trabajo de investigación.

Si quieres ir rápido, camina solo; pero si quieres llegar lejos, camina acompañado.

Proverbio africano.

De ninguna manera habría logrado terminar esta tesis sin todos los que participaron en ella y a quien las siguientes líneas pretenden elogiar:

## **Agradecimientos**

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y en particular al Departamento de Acuicultura por haberme aceptado como estudiante y darme el apoyo necesario para la realización de mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme una beca para realizar mis estudios de maestría.

Al apoyo económico para la obtención de materiales y reactivos necesarios para realizar la tesis que fueron obtenidos por parte de los proyectos de investigación del CICESE 623108 y de SEP-CONACyT 130074.

A la Dirección de Estudios de Posgrado del CICESE, al Departamento de Acuicultura y la División de Oceanología, por otorgarme dos meses de beca para la terminación de la tesis y la escritura de un artículo derivado de la tesis.

A mi directora de tesis Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra por aceptarme en el grupo su grupo de trabajo, por guiarme con cariño, pero sobre todo por respetar mis decisiones al final de todo.

A los integrantes del comité de tesis Dr. David Siqueiros Beltrones por su aporte de conocimiento en torno al tema de macroalgas y microalgas epifitas y sobre todo por orientarme en la redacción de la hipótesis, objetivos y discusión. A la Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez por sus recomendaciones en el cultivo de abulón, por el material y equipo de empacado al vacío prestado y por sus observaciones en toda la tesis. A la Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes por su paciencia, disponibilidad, observaciones y correcciones finales que mejoraron mi tesis con un giro de 180°. Gracias infinitamente son un gran comité.

A Cecilia Loera Quiñones, Bibiana Medina Sánchez y Amparo Valverde Sánchez por su ayuda en los trámites durante estos dos años de maestría, pero sobre todo por sus atenciones y la sencillez con la que siempre me trataron.

Agradezco de manera muy atenta a la empresa Productores Marinos Baja S.A. de C.V. en especial al Ocean. Enrique Vázquez Moreno por haber colaborado con el suministro de juveniles de abulón rojo desde el ejido Eréndira, además de permitirme hacer una estadía en su granja.

Venecia Isabel Urbano Alor Velazquez, Victor Palma Olivares y Javier Martinez Martinez por sus recomendaciones en el cultivo y traslado de los juveniles de abulon rojo, pero sobre todo por la bonita amistad que me ofrecieron.

A las empresas “Algas y Bioderivados Marinos, S.A. de C.V.” y “Abulones Cultivados S. de R.L. de C.V.” por la donación de *Macrocystis pyrifera* en especial a los pescadores que me apoyaron con la extracción y selección de las macroalgas con menor cantidad de epifitos.

Al Dr. Miguel Ángel del Río por sus comentarios en la selección de la temperatura de cultivo de los abulones, por sus sugerencias en la calidad del agua y sobre todo por su disponibilidad y cordialidad.

A Yanet Guerrero y Roberto Cruz Flores por sus comentarios en la prevención y disminución de bacterias tipo *Vibrio* en el cultivo de abulón, gracias por ayudarme a salvar a mis hijitos.

Al el grupo de trabajo más productivo de CICESE del año 2016 dirigido por la Dra. Pilar Sánchez y formado por: Karina Lugo, Ruperto Barrón, Ana Castro, Diana Cuesta, Socorro Jiménez, Carolina Romero, Ceres Molina, Duahmed Ruíz y Fátima Castro, gracias por su amistad y por sus consejos para sobrevivir en el laboratorio.

A la Dr. Fabiola Lafarga por dejarme utilizar sus instalaciones que inicialmente pensábamos utilizar para el cultivo de abulón, gracias por la confianza.

Al Dr. Juan Pablo Lazo por sus recomendaciones en los cálculos de energía y por haberme facilitado el uso de material y equipo de su laboratorio.

Al Dr. Jorge Cáceres Martínez por su disponibilidad en el préstamo de material y equipo de laboratorio.

Al Dr. Gabriel Correa Reyes por prestarme sus dibujos de abulón para ponerlos en las imágenes representativas del cultivo en ésta tesis.

A la Dra. Beatriz Cordero por facilitarme el uso de su campana de extracción, sonicador y por sus observaciones en el la cuantificación de proteínas.

A la Dra. Socorro Jiménez Valera por las cepas aisladas utilizadas en esta investigación que provienen de su trabajo de tesis de doctorado, por su ayuda en el análisis de componentes proximales, por sus comentarios durante todo mi experimento y sobre todo por las atenciones que has tendido conmigo y por tu gran corazón, gracias Soco.

A la Dra. Karina Lugo Ibarra por sus observaciones en el trabajo de laboratorio, en los cálculos de los nutrientes y por sus atenciones durante su estancia de post doctorado en el CICESE.

A la Dra. Ceres Molina Cárdenas por sus observaciones, por facilitarme el uso de equipo de otros Departamentos, por sus recomendaciones en la evaluación de *Vibrio* spp., pero sobre todo por la disponibilidad y humildad con la que tratas a todos, gracias Ceres.

A la Cuasi Dra. Diana Cuesta por su sinceridad, observaciones y ayuda en el funcionamiento del sistema de enfriamiento del agua de mar utilizados en el cultivo de abulón y sobre todo por hacerme más amena la escritura de esta tesis, gracias Diana.

A Don Mario Reynosa, por ser mi técnico favorito, por toda la ayuda y cuidados nocturnos que nos dio a mis abulones y a mi, gracias Don Mario.

A Erik González por su compañerismo y disponibilidad de trabajar en equipo durante el cultivo de abulón.

A Enrique Zepeda, Gabriel Vaca, Cesar Rodríguez, Beatriz Nava, Benito Niebla, Eduardo Martínez, Sergio Luna, Erik González, Ana Gómez, Josué Escárcega, Martha Cifuentes y Juan Benavides, por ser mis compañeros de generación y compartir estos dos años de experiencias y logros.

A mis amigos Omar García Concha y Noemí Cota Mamani por apoyarme física y mentalmente durante todo mi experimento, pero sobre todo por ser unas personas tan brillantes y encender en mi las ganas de ser mejor, los quiero.

A Jonathan Pinto Jiménez me sobran las palabras contigo, muchas gracias por toda la ayuda en la toma de muestra de macroalgas, en la extracción mecánica de los componentes proximales, en la limpieza de los tanques de cultivo y en las observaciones en la redacción del poster y tesis muchas gracias por todo.

A Erik Tiscareño Rubio y Julio Cesar Mesa González por tener siempre las palabras adecuadas para levantarme los animos y seguir adelante.

A Giovanna Gómez García por amarme y creer en mí más de lo que yo lo hago.

## Tabla de contenido

|  | Página |
|--|--------|
| Resumen en español.....  | ii     |
| Resumen en inglés.....   | iii    |
| Dedicatorias.....  | iv     |
| Agradecimientos.....   | vi     |
| Lista de figuras.....  | xii    |
| Lista de tablas.....   | xviii  |
| <br>   |        |
| <b>Capítulo 1. Introducción</b>  |        |
| 1.1 Justificación .....  | 7      |
| 1.2 Hipótesis.....   | 7      |
| 1.3 Objetivos.....   | 8      |
| 1.3.1 Objetivo general .....   | 8      |
| 1.3.2 Objetivos específico.....  | 8      |
| <br>   |        |
| <b>Capítulo 2. Metodología</b>   |        |
| 2.1 Ensayos de epifitación de <i>Macrocystis pyrifera</i> .....                                    | 9      |
| 2.1.2 Procedencia de las especies de microalgas.....   | 9      |
| 2.1.3 Cultivo de microalgas para la epifitación de <i>M. pyrifera</i> .....                        | 10     |
| 2.1.4 Obtención de <i>M. pyrifera</i> .....  | 11     |
| 2.1.5 Eliminación de epifitos de <i>M. pyrifera</i> .....  | 11     |
| 2.1.6 Ensayos de epifitación en discos de <i>M. pyrifera</i> con 8 especies de microalgas.....     | 11     |
| 2.1.7 Composición proximal.....  | 13     |
| 2.1.7.1 Proteínas.....   | 14     |
| 2.1.7.2 Lípidos.....   | 14     |
| 2.1.7.3 Carbohidratos.....   | 14     |
| 2.1.7.4 Biomasa en peso.....   | 14     |
| 2.1.8 Ensayos de epifitación de láminas de <i>M. pyrifera</i> con 4 especies de microalgas.....    | 15     |
| 2.1.9 Epifitación de frondas de <i>M. pyrifera</i> a escala masiva.....                            | 16     |
| 2.2 Ensayos de enriquecimiento de <i>M. pyrifera</i> con nutrientes.....                           | 17     |
| 2.2.1 Enriquecimiento de discos de <i>M. pyrifera</i> con altas concentraciones de nutrientes..... | 17     |
| 2.2.2 Enriquecimiento de láminas de <i>M. pyrifera</i> con bajas concentraciones de nutrientes..   | 18     |

|  |    |
|--|----|
| 2.2.3 Enriquecimiento de frondas de <i>M. pyrifera</i> a escala masiva.....                    | 18 |
| 2.3 Bioensayo con juveniles de abulón rojo alimentados con <i>M. pyrifera</i> enriquecida..... | 19 |
| 2.3.1 Procedencia de juveniles de abulón.....  | 19 |
| 2.3.2 Alimentación y sistemas de mantenimiento.....  | 19 |
| 2.3.3 Calidad del agua.....  | 20 |
| 2.3.4 Evaluación del crecimiento y supervivencia de juveniles de abulón.....                   | 21 |
| 2.3.5 Evaluación de la presencia de <i>Vibrio</i> .....  | 24 |
| 2.6 Análisis estadístico de los resultados.....  | 24 |

### Capítulo 3. Resultados

|   |    |
|---|----|
| 3.1 Epifitación de <i>M. pyrifera</i> con microalgas.....   | 26 |
| 3.1.1 Cultivos monoespecíficos de 8 especies de microalgas.....                                     | 26 |
| 3.1.3 Epifitación de discos de <i>M. pyrifera</i> con 8 especies de microalgas.....                 | 26 |
| 3.1.4 Composición proximal.....   | 30 |
| 3.1.4.1 Proteínas.....  | 30 |
| 3.1.4.2 Lípidos.....  | 31 |
| 3.1.4.3 Carbohidratos.....  | 32 |
| 3.1.4.4 Biomasa en peso.....  | 33 |
| 3.1.5 Epifitación de láminas de <i>M. pyrifera</i> con 4 especies de microalgas.....                | 34 |
| 3.1.5.1 Composición proximal.....   | 36 |
| 3.1.5.1.1 Proteínas.....  | 36 |
| 3.1.5.1.2 Lípidos.....  | 37 |
| 3.1.5.1.3 Carbohidratos.....  | 38 |
| 3.1.5.1.4 Biomasa en peso.....  | 39 |
| 3.2 Enriquecimiento de <i>M. pyrifera</i> con nutrientes.....                                       | 40 |
| 3.2.1 Enriquecimiento con altas concentraciones de nutrientes en discos de <i>M. pyrifera</i> ..... | 40 |
| 3.2.1.1 Composición proximal.....   | 40 |
| 3.2.1.1.1 Proteínas.....  | 40 |
| 3.2.1.1.2 Lípidos.....  | 41 |
| 3.2.1.1.3 Carbohidratos.....  | 42 |
| 3.2.1.1.4 Biomasa en peso.....  | 43 |
| 3.2.2 Enriquecimiento con bajas concentraciones de nutrientes en láminas de <i>M. pyrifera</i> ..   | 45 |
| 3.2.2.1 Composición proximal.....   | 45 |
| 3.2.2.1.1 Proteínas.....  | 45 |

|                                      |  |           |
|--------------------------------------|--|-----------|
| 3.2.2.1.2                            | Lípidos.....   | 46        |
| 3.2.2.1.3                            | Carbohidratos.....   | 46        |
| 3.2.2.1.4                            | Biomasa en peso.....   | 47        |
| 3.3                                  | Bioensayo con juveniles de abulón rojo alimentados con <i>M. pyrifera</i> enriquecida..... | 49        |
| 3.3.1                                | Calidad del agua.....  | 49        |
| 3.3.2                                | Crecimiento en términos de talla.....  | 49        |
| 3.3.3                                | Crecimiento en términos de peso.....   | 51        |
| 3.3.4                                | Peso ganado.....   | 52        |
| 3.3.5                                | Tasa de crecimiento.....   | 52        |
| 3.3.6                                | Supervivencia.....   | 54        |
| 3.3.7                                | Presencia de bacterias tipo Vibrio.....  | 54        |
| <br>                                 |  |           |
| <b>Capítulo 4. Discusión</b>         |  |           |
| 4.2                                  | Epifitación de <i>M. pyrifera</i> con microalgas.....                                      | 56        |
| 4.2.2                                | Biomasa en peso.....   | 59        |
| 4.2.3                                | Composición proximal.....  | 60        |
| 4.3                                  | Enriquecimiento de <i>M. pyrifera</i> con nutrientes (N:P).....                            | 62        |
| 4.3.1                                | Composición proximal.....  | 63        |
| 4.3.1.1                              | Enriquecimiento con altas concentraciones de N:P.....                                      | 63        |
| 4.3.1.2                              | Enriquecimiento con bajas concentraciones de N:P.....                                      | 64        |
| 4.3.2                                | Biomasa en peso.....   | 67        |
| 4.3                                  | Bioensayo con juveniles de abulón rojo alimentados con <i>M. pyrifera</i> enriquecida..... | 67        |
| 4.3.1                                | Crecimiento.....   | 68        |
| 4.3.2                                | Tasa específica de crecimiento.....  | 69        |
| 4.3.3                                | Tasa de crecimiento.....   | 71        |
| 4.3.4                                | Tasa de conversión alimenticia.....  | 73        |
| <br>                                 |  |           |
| <b>Capítulo 5. Conclusiones.....</b> |  |           |
|                                      | <b>Recomendaciones.....</b>  | <b>78</b> |
|                                      | <b>Literatura citada.....</b>  | <b>79</b> |

## Lista de figuras

| Figura |   | Página |
|--------|---|--------|
| 1      | Cultivo estático de las diferentes especies de microalgas usadas para los ensayos de epifitación de <i>M. pyrifera</i> .....  | 10     |
| 2      | Sistema experimental utilizado en el enriquecimiento con discos de <i>Macrocystis pyrifera</i> .....  | 12     |
| 3      | Lámina de <i>Macrocystis pyrifera</i> en la cual se señala las partes y localización de los cortes utilizados en los enriquecimientos.....  | 13     |
| 4      | Esquematación del recipiente que se utilizó como sistema experimental en el enriquecimiento con discos de <i>Macrocystis pyrifera</i> . (A) Lámpara de luz blanca, (B) Entrada de aire, (C) salida de aire, (D) tapa transparente marca Lexon®, (E) medio enriquecido y (F) láminas de <i>M. pyrifera</i> .....   | 15     |
| 5      | Esquematación del sistema experimental para el enriquecimiento masivo con nutrientes y macroalgas. A: Lámparas fluorescentes de luz blanca, B: Termómetro electrónico sumergible, C: Salida de agua. Dentro del tanque se encontraba una piedra de aireación conectada a una manguera y un filtro de cartucho de 1 µm a la entrada del aire.....  | 17     |
| 6      | Sistema de jaulas para cultivo de juveniles de abulón. 1) Vista frontal, 2) Vista del interior. A: Entrada de flujo de agua a través de maya plástica, B: Refugio, C: Abulones adheridos al refugio.....  | 21     |
| 7      | Curvas de crecimiento basados en la densidad de células de <i>Komvophoron</i> sp. (A), <i>Phormidium</i> sp. (B), <i>Heterococcus</i> sp. (C), <i>Grammatophora marina</i> (D), <i>Amphora</i> sp. (E), <i>Amphora tenerrima</i> (F), <i>Navicula</i> cf. <i>ulvaceae</i> (G) y <i>Navicula</i> sp. (H), mantenidas en cultivos monoespecíficos estáticos con medio <i>f</i> (Guillard y Ryther, 1962). Las barras verticales representan la desviación estándar (n = 2).....   | 28     |
| 8      | Valores promedio de la densidad de células epífitas en discos de <i>Macrocystis pyrifera</i> (○) con respecto a la concentración en el medio (●) de las especies: <i>Navicula</i> sp. (A), <i>Komvophoron</i> sp. (B), <i>Phormidium</i> sp. (C), <i>Amphora tenerrima</i> (D), <i>Grammatophora marina</i> (E), <i>Navicula</i> cf. <i>ulvaceae</i> (F), <i>Amphora</i> sp. (G) y <i>Heterococcus</i> sp. (H) mantenidas en cultivo.....   | 29     |
| 9      | Valores promedio en porcentaje de proteínas con base en la biomasa orgánica en peso seco de láminas de <i>Macrocystis pyrifera</i> enriquecidas con las microalgas: <i>Komvophoron</i> sp. (■), <i>Phormidium</i> sp. (■), <i>Heterococcus</i> sp. (■), <i>Grammatophora marina</i> (■), <i>Amphora</i> sp. (■) <i>Amphora tenerrima</i> (■) <i>Navicula</i> cf. <i>ulvaceae</i> (■) y <i>Navicula</i> sp. (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio <i>f</i> , además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio <i>f</i> (■). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha = 0.05$ ; $a > b > c$ . Barras verticales indican la desviación estándar (n = 2)..... | 30     |

- 10 Valores promedio en porcentaje de lípidos con base en la biomasa orgánica en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Heterococcus* sp. (■), *Grammatophora marina* (■), *Amphora* sp. (■), *Amphora tenerrima* (■) *Navicula* cf. *ulvaceae* (■) y *Navicula* sp. (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio *f*, además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio *f* (■). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y mayúsculas entre tiempos. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$  y  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ )..... 31
- 11 Valores promedio en porcentaje de carbohidratos con base en la biomasa orgánica en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Heterococcus* sp. (■), *Grammatophora marina* (■), *Amphora* sp. (■), *Amphora tenerrima* (■) *Navicula* cf. *ulvaceae* (■) y *Navicula* sp. (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio *f*, además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio *f* (■). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y mayúsculas entre tiempos. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$  y  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ )..... 32
- 12 Valores promedio en porcentaje de peso seco orgánico con base en la biomasa total en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Heterococcus* sp. (■), *Grammatophora marina* (■), *Amphora* sp. (■), *Amphora tenerrima* (■) *Navicula* cf. *ulvaceae* (■) y *Navicula* sp. (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio *f*, además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio *f* (■). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y mayúsculas entre tiempos. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$  y  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ )..... 33
- 13 Valores promedio en porcentaje de peso seco inorgánico con base en la biomasa total en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Heterococcus* sp. (■), *Grammatophora marina* (■), *Amphora* sp. (■), *Amphora tenerrima* (■) *Navicula* cf. *ulvaceae* (■) y *Navicula* sp. (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio *f*, además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio *f* (■). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y mayúsculas entre tiempos. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$  y  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ )..... 34
- 14 Valores promedio de la densidad de células libres en el medio (—○—) y epifitas en láminas de *Macrocystis pyrifera* (—●—) con 4 diferentes especies: *Komvophoron* sp. (A), *Phormidium* sp (B), *Grammatophora marina* (C) y *Navicula* cf. *ulvaceae* (D) mantenidas en cultivos estáticos mono-específicos con medio *f*. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $n = 3$ )..... 35

- 15    Valores promedio en porcentaje del contenido de proteínas con base en la biomasa orgánica en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Grammatophora marina* (■) y *Navicula* cf. *ulvaceae* (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio *f*, además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio *f* (■). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y mayúsculas entre el tiempo. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha=0.05$ ;  $a > b > c$  y  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 3$ )..... 36
- 16    Valores promedio en porcentaje del contenido de lípidos con base en el la biomasa orgánica en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Navicula* cf. *ulvaceae* (■) y *Grammatophora marina* (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio *f*, además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio *f* (■). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y mayúsculas entre el tiempo. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$  y  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 3$ )..... 37
- 17    Valores promedio en porcentaje del contenido de carbohidratos con base en la biomasa orgánica en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Navicula* cf. *ulvaceae* (■) y *Grammatophora marina* (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio *f*, además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio *f* (■). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y mayúsculas entre el tiempo. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b$  y  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ )..... 38
- 18    Valores promedio en porcentaje del de peso seco orgánico con respecto a la biomasa seca total de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Navicula* cf. *ulvaceae* (■) y *Grammatophora marina* (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio *f*, además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio *f* (■). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos, no se encontraron diferencias entre los tiempos. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 3$ )..... 39
- 19    Valores promedio en porcentaje del de peso seco inorgánico con respecto a la biomasa seca total de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Navicula* cf. *ulvaceae* (■) y *Grammathopora marina* (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio *f*, además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio *f* (■). Sin diferencias significativas en el análisis de ANOVA de dos vías. Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 3$ )..... 40

- 20 Valores promedio en porcentaje de proteínas con base en la biomasa orgánica en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentraciones de nutrientes (N:P): 22:1.37 mM (■), 44:2.75 mM (■), 66:4.12 mM (■), 88:5.5 mM (■), 1:0.06 M (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras minúsculas denotan diferencias entre tratamientos y mayúsculas por el tiempo, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c > d$ ,  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ )..... 41
- 21 Valores promedio en porcentaje de lípidos con base en la biomasa orgánica en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentraciones de nutrientes (N:P): 22:1.37 mM (■), 44:2.75 mM (■), 66:4.12 mM (■), 88:5.5 mM (■), 1:0.06 M (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras minúsculas denotan diferencias entre tratamientos y mayúsculas por el tiempo, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c > d$ ,  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ )..... 42
- 22 Valores promedio en porcentaje de carbohidratos con base en la biomasa orgánica en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentraciones de nutrientes (N: P): 22: 1.37 mM (■), 44: 2.75 mM (■), 66: 4.12 mM (■), 88: 5.5 mM (■), 1: 0.06 M (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras minúsculas denotan diferencias entre tratamientos y mayúsculas por el tiempo, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c > d$ ,  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ )..... 43
- 23 Valores promedio en porcentaje de peso seco orgánico con base en la biomasa total seca de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentraciones de nutrientes (N:P): 22:1.37 mM (■), 44:2.75 mM (■), 66:4.12 mM (■), 88:5.5 mM (■), 1:0.06 M (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras minúsculas denotan diferencias entre tratamientos y mayúsculas por el tiempo, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$ ,  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ )..... 44
- 24 Valores promedio en porcentaje de peso seco inorgánico con base en la biomasa total seca de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentraciones de nutrientes (N:P): 22:1.37 mM (■), 44:2.75 mM (■), 66:4.12 mM (■), 88:5.5 mM (■), 1:0.06 M (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras minúsculas denotan diferencias entre tratamientos y mayúsculas por el tiempo, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b$ ,  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ )..... 44

- 25 Valores promedio en porcentaje de proteínas con base en la biomasa orgánica en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentraciones de nutrientes (N:P): 14:0.87  $\mu\text{M}$  (■), 200:12.05  $\mu\text{M}$  (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras diferentes denotan diferencias entre tratamientos, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ; a > c > d. Barras verticales indican la desviación estándar (n = 3)..... 45
- 26 Valores promedio en porcentaje de lípidos con base en la biomasa orgánica en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentraciones de nutrientes (N:P): 14:0.87  $\mu\text{M}$  (■), 200:12.05  $\mu\text{M}$  (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras diferentes denotan diferencias entre tratamientos, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ . Barras verticales indican la desviación estándar (n = 3)..... 46
- 27 Valores promedio en porcentaje de carbohidratos con base en la biomasa total en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentraciones de nutrientes (N:P): 14:0.87  $\mu\text{M}$  (■), 200:12.05  $\mu\text{M}$  (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras minúsculas denotan diferencias entre tratamientos y mayúsculas entre tiempos, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ; A > B. Barras verticales indican la desviación estándar (n = 3)..... 47
- 28 Valores promedio en porcentaje de orgánico con base en la biomasa total en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentraciones de nutrientes (N:P): 14:0.87  $\mu\text{M}$  (■), 200:12.05  $\mu\text{M}$  (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras diferentes denotan diferencias entre tratamientos, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ . Barras verticales indican la desviación estándar (n = 3)..... 48
- 29 Valores promedio en porcentaje de inorgánico con base en la biomasa total en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentraciones de nutrientes (N:P): 14:0.87  $\mu\text{M}$  (■), 200:12.05  $\mu\text{M}$  (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras diferentes denotan diferencias entre tratamientos, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ . Barras verticales indican la desviación estándar (n = 3)..... 48
- 30 Valores promedio del largo (mm) de la concha de juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) alimentados con *Macrocystis pyrifera* enriquecida con *Grammatophora marina* (—●—), enriquecida nitrógeno y fósforo 200:12.05  $\mu\text{M}$  (—◆—) y *M. pyrifera* sin enriquecer (—●—) como tratamiento control. Las barras verticales indican la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ; a > b > c..... 50

- 31 Valores promedio del ancho (mm) de la concha de juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) alimentados con *Macrocystis pyrifera* enriquecida con *Grammatophora marina* ( —●— ), enriquecida nitrógeno y fósforo 200:12.05  $\mu\text{M}$  ( —◆— ) y *M. pyrifera* sin enriquecer ( —●— ) como tratamiento control. Las barras verticales indican la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b$ ..... 50
- 32 Valores promedio del peso de juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) alimentados con *Macrocystis pyrifera* enriquecida con *Grammatophora marina* ( —●— ), enriquecida con una razón de nitrógeno y fósforo de 200:12.05  $\mu\text{M}$  ( —◆— ) y *M. pyrifera* sin enriquecer ( —●— ) como tratamiento control. Las barras verticales indican la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b$ ..... 51

## Lista de tablas

| Tabla | Página |
|-------|--------|
| 1     | 9      |
| 2     | 12     |
| 3     | 16     |
| 4     | 27     |
| 5     | 27     |
| 6     | 35     |
| 7     | 53     |
| 8     | 53     |

|    |   |    |
|----|---|----|
| 9  | Valores promedio de diversos índices de retención y composición proximal del alimento suministrado a juveniles de abulón rojo ( <i>Haliotis rufescens</i> ) alimentados con <i>Macrocystis pyrifera</i> enriquecida con <i>Grammatophora marina</i> (M + G), enriquecida con una razón de nitrógeno y fósforo de 200:12.05 $\mu\text{M}$ (M + NP) y <i>M. pyrifera</i> sin enriquecer (M) como tratamiento control. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$ ; a > b > c..... | 54 |
| 10 | Valores del porcentaje de supervivencia promedio, máximo y mínimo de los juveniles de abulón rojo ( <i>Haliotis rufescens</i> ) alimentados con <i>Macrocystis pyrifera</i> enriquecida con <i>Grammatophora marina</i> (M + G), enriquecida con una razón de nitrógeno y fósforo de 200:12.05 $\mu\text{M}$ (M + NP) y <i>M. pyrifera</i> sin enriquecer (M) como tratamiento control. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$ ; a > b.....                                 | 55 |
| 11 | Valores de las unidades formadoras de colonias (UFC $\text{mL}^{-1}$ ) en los sistemas de mantenimiento de juveniles de abulón rojo ( <i>Haliotis rufescens</i> ) alimentados con <i>Macrocystis pyrifera</i> enriquecida con <i>Grammatophora marina</i> (M + G), enriquecida con una razón de nitrógeno y fósforo de 200:12.05 $\mu\text{M}$ (M + NP) y <i>M. pyrifera</i> sin enriquecer (M) como tratamiento control.....   | 55 |
| 12 | Valores promedio de la densidad de células epifitas por unidad de área en $\text{mm}^2$ para diferentes especies y en distintos días de enriquecimiento en discos y en láminas de <i>Macrocystis pyrifera</i> .....   | 59 |

## Capítulo 1. Introducción

---

Los abulones son moluscos gasterópodos, univalvos del género *Haliotis*; son organismos nocturnos, herbívoros que viven en sustratos rocosos con fuerte oleaje, en bahías protegidas y algunas veces en zonas de arrecifes de coral (Leighton, 2000). La mayoría de las especies residen en aguas poco profundas desde 8 hasta 30 m y en temperaturas tanto templadas como tropicales (Leighton, 2000). Se sabe de la existencia de entre 70 y 100 especies agrupadas en el género *Haliotis* y tan sólo 20 son de interés comercial (Cox, 1962; Jarayabhand y Paphavasit, 1996).

En América del Norte se conocen siete especies de abulón de las cuales seis se encuentran en México: abulón rojo (*Haliotis rufescens*), abulón amarillo (*Haliotis corrugata*), abulón azul (*Haliotis fulgens*), abulón negro (*Haliotis cracherodii*), abulón rayado (*Haliotis assimilis*) y abulón chino (*Haliotis sorenseni*); dichas especies han sido las principales utilizadas por las pesquerías y la maricultura en Baja California con excepción del abulón rayado (Leighton, 2000).

Los abulones tienen una gran demanda en el mercado internacional con un alto valor comercial que varía dependiendo de la presentación del producto. Un kilogramo de abulón vivo llega a costar aproximadamente 30 dólares Americanos (SAGARPA, 2012). En México, el abulón es un valioso recurso pesquero que forma parte de la economía del Noroeste del país; en la Península de Baja California este recurso se distribuye desde la frontera con Estados Unidos hasta Isla Margarita en Baja California Sur (Ponce-Díaz *et al.*, 2003).

La acuicultura del abulón se encuentra en la búsqueda de técnicas de cultivo que propicien el incremento del crecimiento y la calidad de la carne utilizando métodos biotecnológicos, de ingeniería genética y de nutrición entre otros (Leighton, 2000).

Diversas especies de abulón son cultivadas a nivel mundial ya que su comercio es económicamente rentable; no obstante, existen problemas asociados con el cultivo del abulón como es la nutrición de las post-larvas, la transición alimenticia, supervivencia y la baja tasa de crecimiento, ya que requieren un intervalo de entre dos a cinco años para llegar a tener organismos de talla comercial (Hahn, 1988; Kawamura *et al.*, 1998; Shepherd *et al.*, 1992; Roberts y Takami, 1998).

El cultivo de abulón en la Península de Baja California se realiza en granjas terrestres de las cuales la mayoría están orientadas al cultivo de las especies de abulón rojo (*H. rufescens*) y abulón azul (*Haliotis*

*fulgens*) (McCormick, 2000). El abulón rojo es conocido alrededor del mundo por ser el miembro más grande en talla del género *Haliotis*, con un tamaño de entre 17 a 31 cm de diámetro de concha (Cox, 1962; Geibel *et al.*, 2010); esta especie, por sus características de crecimiento, es cultivada en otras partes del mundo como en Estados Unidos y Chile (Hernández *et al.*, 2009).

En México en el cultivo larvario de abulón se utiliza como alimento biopelículas de diatomeas bentónicas inoculadas sobre láminas de policarbonato o bien cultivos de diatomeas en estanques, la importancia de las diatomeas radica en sus componentes bioquímicos que influyen en la capacidad de asentamiento de las postlarvas de abulón, además de proveer de nutrientes esenciales para el desarrollo de los abulones (Hahn, 1988). Las diatomeas son microorganismos que forman parte del fitoplancton, una propiedad importante que las diferencia de las demás microalgas es su pared celular o frústula que está compuesta por dióxido de silicio hidratado (Sánchez-Saavedra, 2013). Las diatomeas bentónicas se caracterizan por formar aglomeraciones de células de diferentes niveles, que no sólo agrupan diatomeas sino también bacterias, incorporadas al sustrato sobrepuestas unas con otras y adheridas por exopolisacáridos (Daume, 2006).

Las diatomeas comúnmente utilizadas para la alimentación de postlarvas de abulón son: *Cocconeis* sp., *Pleurosigma* sp., *Stauroneis* sp., *Navicula mollis*, *Navicula ramosissima*, *Amphora* spp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia divergens*, *Nitzschia panduriformis*, *Nitzschia pseudohybrida* y *Navicula incerta*, entre otras (Hahn, 1988; Capinpin-Jr., 2007; Chen, 2007; Correa-Reyes *et al.*, 2009). Existen investigaciones en las que se ha evaluado el efecto de utilizar diversas especies de diatomeas como alimento de postlarvas de abulón. Gordon *et al.* (2006) analizaron el crecimiento de postlarvas de *Haliotis discus hannai* alimentadas con *Nitzschia laevis*, *Navicula* cf. *lenzii* y *Amphora luciae*, así como la combinación de *Navicula* cf. *lenzii* y *Amphora luciae* y evaluó un mejor crecimiento y supervivencia en valores superiores al 50% con una tasa de crecimiento de 36 µm por día; la combinación de las diatomeas presentó el contenido de proteínas (32.00% - 38.32%), carbohidratos (17.55% - 25.09%), lípidos (6.43% - 14.55%) y un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (39% - 48%).

Correa-Reyes *et al.* (2009) evaluaron el crecimiento de postlarvas de abulón rojo alimentadas ad libitum con cultivos monoespecíficos de diatomeas bentónicas, obteniendo mayor tamaño en las conchas de abulones alimentados con *Nitzschia thermalis* var. *minor* y *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*; concluyendo que las diferencias en el tamaño de las conchas de abulón dependen principalmente de la calidad del alimento.

Después de la metamorfosis los abulones inician el estadio juvenil en donde incrementan su tasa de crecimiento, adquieren mayor movimiento, aumentan su alimentación y cambian de forma gradual su dieta de microalgas a macroalgas (Martínez *et al.*, 1994). En el medio natural se alimentan de láminas de macroalgas con múltiples organismos epifitos entre ellos las diatomeas, dichas láminas se desprenden de los talos y llegan al fondo de la columna de agua (Siqueiros-Beltrones *et al.*, 2002).

En investigaciones realizadas por Argumedo-Hernández y Siqueiros-Beltrones (2008) se examinaron láminas de la macroalga *Macrocystis pyrifera* con el objetivo de describir su asociación de diatomeas epifitas, encontrando gran diversidad de taxas. Entre las especies más abundantes se mencionan: *Rhoicosphenia genuflxa*, *Gomphonemopsis pseudexigua*, *Tabularia investiens* y *Cocconeis costata* var. *pacifica*. Además, encontraron que existen diferencias en los porcentajes de epifitación con respecto a la edad de las láminas de una misma fronda de *M. pyrifera*, siendo las más jóvenes las que mostraron porcentajes de diatomeas epifitas menores o casi nulas comparadas con las láminas de mayor edad.

La macroalga *M. pyrifera* pertenece al *Phylum Heterokontophyta*, Clase *Phaeophyceae*, Orden *Laminariales* y Familia *Laminariaceae* (Lovell y Libby, 2000). Los mantos de *M. pyrifera* se distribuyen en zonas rocosas generalmente a 20 m de profundidad; en las costas de la Península de Baja California su distribución abarca desde las Islas Coronado hasta Bahía Asunción a través de la costa noroccidental de forma discontinua (Ladah y Zartuche-González, 1999). Una de las características más importantes que distinguen a *M. pyrifera* es su rápido crecimiento que alcanza longitudes de 50 m y presenta tasas de crecimiento de 30 cm día<sup>-1</sup> y pueden llegar a vivir alrededor de 8 años (Foster y Schiel, 1985; González-Fragoso *et al.*, 1991).

En las granjas dedicadas al cultivo de abulón en California (EUA) y Baja California, se utiliza como principal fuente de alimentación el dosel de las frondas de *M. pyrifera* (McBride y Conte, 2000), es decir, la sección más joven de las frondas, con menor grado de organismos epifitos como lo describen Argumedo-Hernández y Siqueiros-Beltrones (2008). Lo anterior sugiere que la nutrición de abulones cultivados, respecto a los organismos del medio natural es diferente debido al grado de epifitación de las macroalgas. Viana *et al.* (1993) mencionan que el contenido proximal de *M. pyrifera* presenta porcentajes de proteínas relativamente bajos de 2.2% y lípidos de 1.1%, lo que indica que para alcanzar un óptimo crecimiento de los abulones en cultivo se requieren cantidades de proteína mayores a las contenidas en las macroalgas utilizadas para su alimentación.

Existen pocos estudios referentes a la composición de epifitos de macroalgas utilizadas como sustratos que permiten el desarrollo de biopelículas de diatomeas (Argumedo-Hernández y Siqueiros-Beltrones, 2008), por lo que son necesarios más estudios fisiológicos y taxonómicos para conocer este tipo de asociaciones en el medio natural y posteriormente aplicarlos en diversas áreas como cultivo de abulón.

En estudios realizados por Siqueiros-Beltrones y Argumedo-Hernández (2010) revisaron el contenido intestinal de adultos de abulón azul y amarillo, con el objetivo de determinar la florística de diatomeas que los abulones consumen en el medio natural y observar si se relacionaba con las diatomeas epifitas de *M. pyrifera*. Este trabajo muestra la primera lista florística de diatomeas consumidas por abulones adultos que incluyó 151 taxa. Se encontró que la mayoría de las diatomeas eran epifitas, aunque no específicamente asociadas a *M. pyrifera*. La riqueza de especies encontradas confirmó que los adultos de *Haliotis* spp. no son organismos selectivos al consumir diatomeas.

Las granjas de producción comercial de abulón buscan optimizar las tasas de crecimiento a través de diversas metodologías. Una de las opciones es mejorar el valor nutricional del alimento suministrando dietas balanceadas (Durazo-Beltrán *et al.*, 2003). En países en donde existe el cultivo de abulón y el acceso a las macroalgas es limitado, se han formado grupos de investigadores y empresas dedicadas a desarrollar dietas balanceadas comerciales. En Sudáfrica, Australia y algunos países asiáticos, las dietas balanceadas son utilizadas en el cultivo de abulón, teniendo mejores resultados de crecimiento y supervivencia de las distintas especies de abulón. Se han realizado trabajos para caracterizar los requerimientos nutricionales del alimento formulado para juveniles y se menciona que el valor nutricional va desde 29 a 35% de proteína cruda, 30 a 40% de carbohidratos y 5 a 6% de lípidos (McBride y Conte, 2000; Bansemer *et al.*, 2016). En la búsqueda de mejorar el alimento balanceado se han hecho investigaciones utilizando diferentes fuentes de proteína como la harina de pescado, caseína, harina de soya, harina de *Spirulina* spp., harina de sangre y vísceras de abulón. Estas dietas han tenido éxito promoviendo un incremento en las tasas de crecimiento y en el porcentaje de supervivencia de cultivos de abulón respecto a lo obtenido con macroalgas (Durazo-Beltrán *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2009).

Sin embargo, se han observado algunos inconvenientes en el uso de las dietas balanceadas como la lixiviación y la pérdida de la estabilidad del alimento. Viana *et al.* (1993) reportan en sus experimentos con dietas formuladas de harina de caseína y harina de pescado, pérdidas en la estabilidad del alimento en periodos de entre 24 a 35 horas y 48 horas para desintegrarse por completo. Fleming *et al.* (1996) mencionan que la estabilidad del alimento es un problema de vital importancia ya que la descomposición del alimento posterior a la lixiviación afecta la calidad del agua y la salud de los organismos en cultivo.

Otro punto importante a considerar en el uso de alimento balanceado es el costo. En Japón los costos por el alimento formulado se encuentran sobre los \$5 000 dólares americanos por tonelada, rebasando y multiplicando diez veces los costos de alimentación de otro tipo de organismos cultivados como aves de corral (e.g., pollos) (Leighton, 2000). Por lo anterior, muchas de las granjas siguen utilizando macroalgas como único aporte de alimento, ya que es un recurso natural abundante y disponible en zonas templadas.

Las macroalgas son eficientes en la absorción de nitrato, amonio y fosfato del agua, los cuales son asimilados en compuestos nitrogenados como aminoácidos, proteínas y pigmentos que estimulan el crecimiento de las macroalgas (Lobban y Harrison, 1996).

Los requerimientos de nutrientes en las macroalgas se dividen en tres tipos: macronutrientes, micronutrientes y vitaminas, de los cuales se encuentran relativamente en bajas concentraciones en el océano, los macronutrientes como el nitrógeno y el fósforo forman parte de los nutrientes limitantes para el óptimo desarrollo de las macroalgas (Harrison y Hurd, 2001; Lobban y Harrison, 1996).

Redfield (1933) estableció proporciones estequiométricas descubiertas en la química del océano y que se relacionan directamente con la composición de los organismos que lo habitan. Concluye que la proporción molar de los elementos en el fitoplancton de C:N:P es aparentemente igual a 106:16:1; esta relación se ha utilizado como un concepto unificado en la biología de los océanos (Atkinson y Smith, 1983). Sin embargo, como Redfield (1933) menciona, esta relación es aparente, el valor más apropiado para la razón C:N:P en el fitoplancton dependerá de las condiciones ambientales de cada locación geográfica (Atkinson y Smith, 1983).

Rhee (1978) demostró que la concentración de nutrientes en el medio está relacionada con la concentración de nutrientes en las células utilizando rangos de N:P de 5 a 80. Los resultados mostraron que la relación de N:P de 30 es un nivel óptimo en la célula. La producción de proteínas y la concentración de carbono se incrementaron al tener una alta concentración celular de nitrógeno, y la absorción del nitrógeno disminuyó con el incremento del nitrógeno celular.

Demetropoulos y Langdon (2004) evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  (1176, 1765, 2353, 2942  $\mu\text{M}$ ),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (83.3  $\mu\text{M}$ ) y la presencia o ausencia de los nutrientes provisto por el medio *f* con metales traza (Fe, Zn, Mn, Cu, Mo, y Co) para promover el enriquecimiento de la macroalga *Palmaria mollis* utilizada en la alimentación de abulón rojo (*H. rufescens*) y abulón japonés (*H. discus hannai*). Al realizar los ensayos de alimentación, el abulón japonés mostró los mejor crecimiento con *Palmaria mollis*

enriquecida con  $\text{NaNO}_3$  a concentración de 1178 a 2353  $\mu\text{M}$ . En contraste, el abulón rojo no mostró un aumento significativo en el crecimiento al ser alimentados con *P. mollis* enriquecida con  $\text{NaNO}_3$ . Se observó que al comprender la respuesta fisiológica del afecto de la proporción de nutrientes y metales traza en la composición de las macroalgas, sería posible mejorar su calidad nutricional que contribuya al mejoramiento de las tasas de crecimiento, las tasas de conversión alimenticias y el consumo diario de alimento de abulones en condiciones de cultivo.

Cuesta-Gómez (2012) realizó estudios con *M. pyrifera* y *Ulva lactuca* enriquecidas con diferentes aportes de nutrientes; nitrato de sodio, nitrato de amonio, cloruro de amonio y un fertilizante agrícola líquido (7.8% de nitrato, 7.8% de amonio y 16.4% de urea). Encontró que la composición proximal fue modificada en función de la cantidad de nutrientes, el tiempo del enriquecimiento y de la forma química de nitrógeno. Las algas enriquecidas fueron suministradas como alimento para erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*) y se encontró un aumento en el índice gonadal y peso de los organismos en un periodo de cultivo de 10 semanas.

Simental-Trinidad (2004) realizó pruebas de enriquecimiento de *M. pyrifera* con diatomeas bentónicas de la especie *Navicula incerta* y las suministró como alimento de juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*). Los resultados mostraron diferencias significativas y un aumento en el contenido proximal con respecto a la dieta base (*M. pyrifera* sin *N. incerta*). Sin embargo, *N. incerta* exhibió una baja concentración de células epifitas como resultado de la baja concentración del inóculo.

Hasta ahora los estudios referentes al enriquecimiento de macroalgas son limitados, algunos de ellos están enfocados en áreas como ecología y muy pocos en acuicultura. Un manejo adecuado del enriquecimiento de macroalgas para la alimentación de abulones, ya sea con nutrientes o microorganismos epifitos, podría generar un aumento en la supervivencia y mejores tasas de crecimiento, lo que contribuiría al desarrollo del mercado internacional de las granjas de cultivo de abulón en Baja California. En este sentido el presente trabajo está enfocado en el enriquecimiento de *M. pyrifera* con dos diferentes estrategias de enriquecimiento, la epifitación selectiva con microalgas y el enriquecimiento con la relación N:P (nitrógeno:fósforo) sobre láminas de *M. pyrifera*, las cuales fueron utilizadas como alimento para juveniles de abulón rojo evaluando si el cambio en la proporción nutricional del alimento es proporcional al crecimiento y la supervivencia de los abulones en cultivo.

## 1.1 Justificación

En condiciones de cultivo, en Baja California, los abulones son alimentados tradicionalmente con *M. pyrifera*. Sin embargo, el valor nutricional de esta macroalga se encuentra en función de la zona geográfica y la temporada (Rodríguez-Montesinos y Hernández-Carmona, 1991). En general, la composición proximal de *M. pyrifera* es principalmente alta en carbohidratos (40%-60%) y baja en proteínas (2%-10%) (Hahn, 1988; Durazo-Beltrán *et al.*, 2003; Rodríguez-Montesinos y Hernández-Carmona, 1991). Estudios recientes han demostrado que el enriquecimiento de *M. pyrifera* puede producir un mayor crecimiento y supervivencia en juveniles de abulón rojo (Ruíz-Güereca *et al.*, 2016; Simental *et al.*, 2004).

Se ha observado que los organismos epifitos en las macroalgas tienen un valor nutricional importante (Argumedo-Hernández, 2005). Una alternativa para incrementar el valor nutricional de *M. pyrifera* es epifitar sus láminas selectivamente con diatomeas (Simental-Trinidad, 2004). Otra estrategia de enriquecimiento utilizada es la adición de nutrientes que favorece la síntesis de aminoácidos, ATP, ácidos nucleicos y proteínas.

Actualmente en Baja California, existen pocas investigaciones enfocadas en las tecnologías de enriquecimiento de macroalgas para la alimentación de abulones en condiciones de cultivo, basada en la fisiología de las algas epifitas y la asimilación de nutrientes en macroalgas. Por ello, en este trabajo se plantea utilizar dos estrategias para enriquecer la composición proximal de *M. pyrifera*. La primera es el uso de microalgas epifitas aisladas de *M. pyrifera* para su colonización selectiva y la segunda es enriquecer a *M. pyrifera* con dos principales nutrientes limitantes del crecimiento el nitrógeno y el fósforo. Se espera que los tratamientos proporcionen un mayor balance en la composición proximal de *M. pyrifera* para su posible implementación en la alimentación de juveniles y adultos de abulón en cultivo.

## 1.2 Hipótesis

Dado que las láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con nutrientes y microalgas tendrán un valor nutrimental mayor que las láminas sin enriquecer, se espera que tanto el peso como la talla de juveniles y supervivencia de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) incrementen en menor tiempo al suministrar como alimento *M. pyrifera* enriquecida en comparación con aquellos especímenes alimentados solo con láminas de *M. pyrifera* sin enriquecer.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo general

Evaluar el crecimiento y la supervivencia de juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) alimentados con *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con microalgas epifitas y nutrientes.

### 1.3.2 Objetivos específicos

- Contrastar el contenido proximal de *M. pyrifera* enriquecida con distintas concentraciones de nitrógeno y fósforo.
- Contrastar el contenido proximal de *M. pyrifera* enriquecida con distintas concentraciones de diatomeas epifitas.
- Contrastar el contenido proximal de *M. pyrifera* enriquecida con distintas concentraciones de microalgas epifitas y nutrientes (nitrógeno y fósforo).
- Contrastar el incremento de peso, talla y supervivencia de juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) alimentados con *M. pyrifera* enriquecida con nutrientes y diatomeas epifitas comparados con abulones alimentados con *M. pyrifera* sin enriquecer.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Ensayos de epifitación de *Macrocystis pyrifera*

#### 2.1.2 Procedencia de las especies de microalgas

Como primer ensayo se utilizaron ocho especies de microalgas para la epifitación selectiva de discos de *Macrocystis pyrifera* (Tabla 1). Las muestras para el aislamiento de microalgas fueron tomadas de diferentes sitios, autores y años, la mayoría provenientes de láminas de *M. pyrifera* recolectadas de la zona de Playitas en Ensenada, Baja California (B.C.), aisladas por Jiménez-Valera del 2010 al 2012. Las especies aisladas fueron: *Komvophoron* sp., *Phormidium* sp., *Heterococcus* sp., *Grammatophora marina*, *Navicula* cf. *ulvaceae* y *Amphora* sp. La diatomea *Navicula* sp. se aisló también de *M. pyrifera* por Sánchez-Saavedra en el 2004 de muestras tomadas en Punta Morro situada en La Bahía de Ensenada, B.C. La diatomea *Amphora tenerrima* fue aislada por Aguilar-May en 2002, a partir de muestras de agua de desecho de una granja de cultivo de camarón “Lomas de Paz” ubicada en San Blas, Nayarit y se incluyó en este trabajo por su rápido crecimiento y fuerte grado de adhesión a la superficie de cultivo.

**Tabla 1.** Especies de microalgas utilizadas en los ensayos preliminares de enriquecimiento con discos de *Macrocystis pyrifera*.

| Especie                             | Clase             |
|-------------------------------------|-------------------|
| <i>Komvophoron</i> sp.              | Cyanophyceae      |
| <i>Phormidium</i> sp.               | Cyanophyceae      |
| <i>Heterococcus</i> sp.             | Xanthophyceae     |
| <i>Grammatophora marina</i>         | Bacillariophyceae |
| <i>Amphora</i> sp.                  | Bacillariophyceae |
| <i>Amphora tenerrima</i>            | Bacillariophyceae |
| <i>Navicula</i> cf. <i>ulvaceae</i> | Bacillariophyceae |
| <i>Navicula</i> sp.                 | Bacillariophyceae |

### 2.1.3 Cultivo de microalgas para la epifitaci3n de *M. pyrifer*a

El crecimiento de las 8 especies de microalgas se realiz3 de forma monoespecífica, no axénica, en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 200 mL de medio *f* (Guillard y Ryther, 1962) (Figura 1), en los cuales se colocaron 2 gramos de perlas de vidrio de 2 mm de diámetro para disminuir la conglomeraci3n entre las células y desprenderlas f3cilmente del fondo del recipiente. En la preparaci3n del medio de cultivo *f*, se utiliz3 agua de mar con una salinidad de  $34 \pm 2$  UPS y se esteriliz3 en una autoclave marca Yamato modelo SE-300 a 121 °C y  $1.05 \text{ kg cm}^{-1}$  de presi3n durante 20 minutos.

Las cultivos de microalgas se mantuvieron con luz constante provista por lámparas fluorescentes de luz blanca F40T12/DX 100  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  de irradiancia medida con un radi3metro  $4\pi$  Biospherical Instrument (modelo QSL-100), la temperatura se mantuvo a 21 °C provista por el sistema de aire acondicionado del laboratorio h3medo central del Departamento de Acuicultura del CICESE.

El ensayo se mantuvo durante 11 d3as por duplicado realizando un registro del crecimiento diario. Cada d3a se recolect3 una muestra de cada especie para evaluar la densidad celular y se cuantific3 utilizando un hematocit3metro de 0.1 mm de profundidad con la ayuda de un microscopio compuesto marca Olympus (CX-31). La tasa de crecimiento específica ( $\mu$ : divisiones  $\text{d3a}^{-1}$ ) se calcul3 con la ecuaci3n descrita por Fogg y Thake (1978) usando los datos de los conteos celulares obtenidos durante la fase de crecimiento exponencial:

$$\mu = \frac{(\log_2 N_2) - (\log_2 N_1)}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

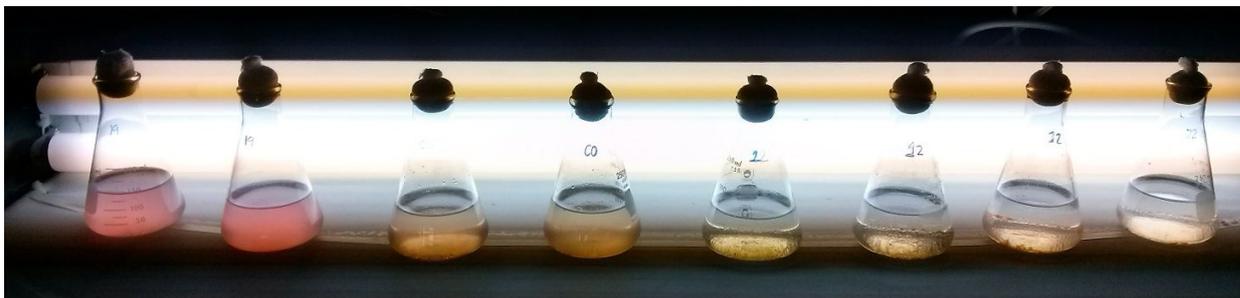
En donde:

$\mu$  = Tasa de crecimiento en la fase exponencial

$\log_2$  = Corresponde al logaritmo base dos de los datos de la concentraci3n de células.

$N_1$  = La concentraci3n de células al tiempo 1 ( $t_1$ )

$N_2$  = La concentraci3n de células al tiempo 2 ( $t_2$ )



**Figura 1.** Cultivo estático de las ocho diferentes especies de microalgas usadas para los ensayos de epifitación en discos de *Macrocyctis pyrifera*.

#### **2.1.4 Obtención de *M. pyrifera***

Las macroalgas utilizadas en los ensayos se recolectaron en septiembre de 2015, febrero de 2016 y abril de 2016, y fueron transportadas en bolsas de plástico el mismo día de su recolecta, hasta el Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.

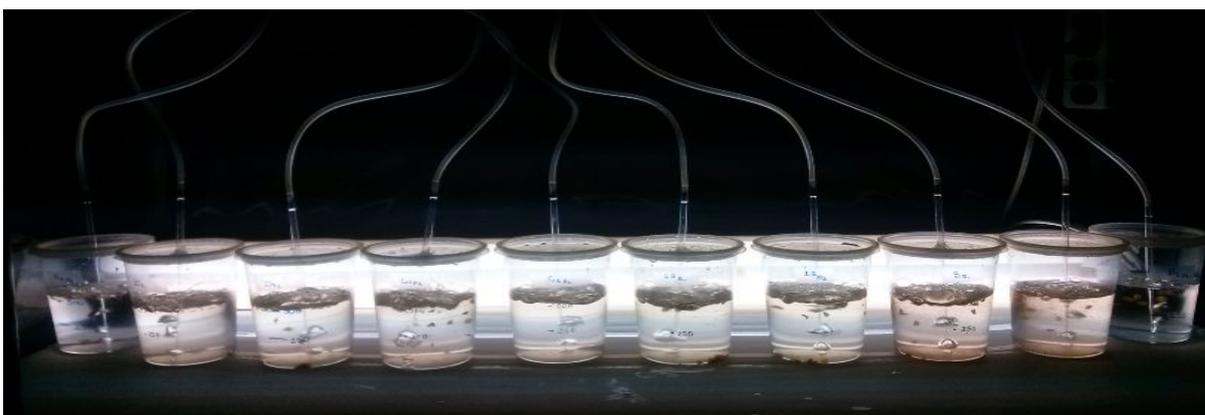
De las macroalgas recolectadas se seleccionaron aquellas láminas de *M. pyrifera* que tuvieran la menor cantidad de organismos epifitos visibles.

#### **2.1.5 Eliminación de epifitos de *M. pyrifera***

La eliminación de epifitos de las láminas de *M. pyrifera* se hizo con agua dulce de uso doméstico en la que se sumergieron por 5 minutos aproximadamente (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2008).

#### **2.1.6 Ensayos de epifitación en discos de *M. pyrifera* con 8 especies de microalgas**

Los ensayos de epifitación de *M. pyrifera* se realizaron con las especies descritas en la sección 2.1.2. Los tratamientos de epifitación se realizaron por duplicado en recipientes cilíndricos transparentes de plástico de 1 L (Figura 2). Cada tratamiento experimental consistió en adicionar un inóculo de células de cada uno de los cultivos de las 8 especies de microalgas (Tabla 2). Los inóculos provinieron de cultivos en fase de crecimiento exponencial y mantenidos en matraz Erlenmeyer como fue descrito en la sección 2.1.3. A cada recipiente se adicionó un volumen de 250 mL de cultivo de cada especie de microalga y 250 mL de agua de mar.

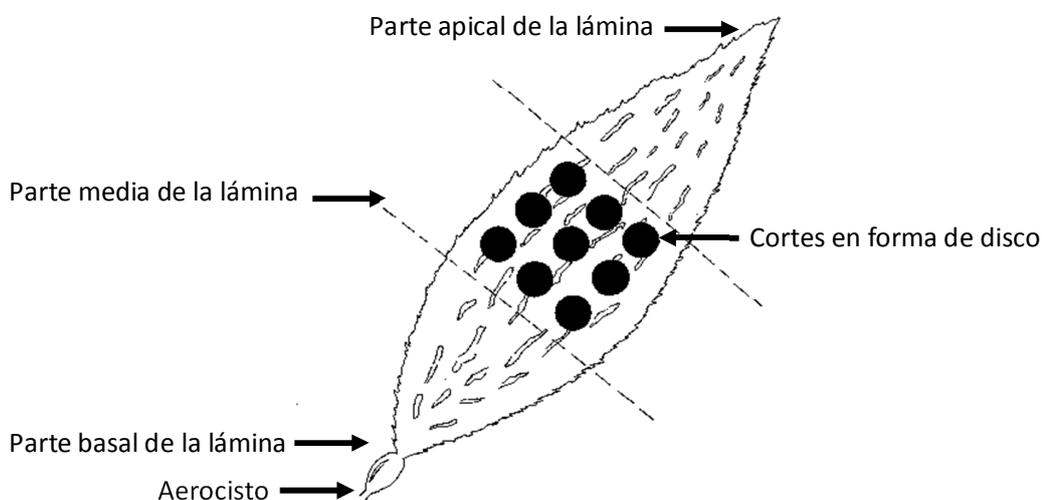


**Figura 2.** Sistema experimental utilizado en el enriquecimiento con discos de *Macrocyctis pyrifera*.

En cada sistema experimental se colocaron 20 discos de 6 mm de diámetro de *M. pyrifera* (Figura 3). Para la obtención de los discos se realizaron cortes de la parte central de lámina con un sacabocado de metal de 6 mm de diámetro (Figura 3). Los sistemas experimentales se mantuvieron con aireación constante a temperatura e irradiancia como se describió en la sección 2.1.2 por 5 días (Figura 2). Como tratamiento control se utilizaron dos tratamientos que contenían: el primero medio *f* (Guillard y Ryther, 1962) y discos 20 de *M. pyrifera* y el segundo simplemente agua de mar y discos 20 de *M. pyrifera*. Las condiciones ambientales se mantuvieron como se describe en la sección 2.1.3 con aireación constante por 5 días. El agua de mar utilizada en los experimentos fue previamente pasada por filtros Cuno de 10, 5 y 1  $\mu\text{m}$ , carbón activado e irradiados con luz ultravioleta; además, se desinfectó con hipoclorito de sodio al 6% ( $3\text{mL L}^{-1}$ ) por 24 horas. Posteriormente el cloro residual se eliminó con tiosulfato ( $0.15\text{ g L}^{-1}$ ) y aireación profusa. Los sistemas de aireación fueron previstos con filtros de cartucho de 1  $\mu\text{m}$  de abertura de poro, para evitar la introducción de otros organismos en los tratamientos por medio del agua o del aire suministrado.

**Tabla 2.** Inóculo utilizado en el enriquecimiento en discos de *Macrocyctis pyrifera* con 8 especies de microalgas.

| Especies                            | Inóculo (cél $\text{mL}^{-1}$ ) |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Komvophoron</i> sp.              | $2.49 \times 10^5$              |
| <i>Phormidium</i> sp.               | $4.44 \times 10^4$              |
| <i>Heterococcus</i> sp.             | $1.38 \times 10^4$              |
| <i>Grammatophora marina</i>         | $2.94 \times 10^4$              |
| <i>Amphora</i> sp.                  | $7.50 \times 10^4$              |
| <i>Amphora tenerrima</i>            | $9.38 \times 10^4$              |
| <i>Navicula</i> cf. <i>ulvaceae</i> | $1.28 \times 10^5$              |
| <i>Navicula</i> sp.                 | $8.44 \times 10^4$              |



**Figura 3.** Lámina de *Macrocyctis pyrifera* en la cual se señala las partes y localización de los cortes utilizados en los enriquecimientos.

Cada día se tomaron muestras de los discos y del medio para realizar el conteo celular. Los conteos de la densidad en el medio se realizaron con el mismo procedimiento descrito en la sección 2.1.3. Por otro lado, para los conteos de las epifitas se recolectó cada día un disco de *M. pyrifera* con la ayuda de una pinza. La biomasa de diatomeas acumuladas en la superficie del alga se desprendió en un baño de agua con ultrasonido y centrifugación constante, posteriormente el número de células se evaluó con un hematocitómetro como fue descrito en la sección 2.1.3. Además de las muestras de discos tomadas para el conteo de células, se tomaron muestras cada dos días para el análisis de la composición proximal (proteínas, lípidos y carbohidratos), así como del peso seco para cada tratamiento de epifitación. Las muestras para la evaluación del contenido proximal se mantuvieron congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis y se siguieron los protocolos descritos en la sección 2.1.7.

### 2.1.7 Composición proximal

La composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos) así como la biomasa en peso de las muestras de *M. pyrifera* recolectadas en los distintos tratamientos se evaluaron considerando los siguientes métodos:

### **2.1.7.1 Proteínas**

La extracción de proteínas se realizó utilizando hidróxido de sodio al 0.2 N a 100 °C en un baño maría por 30 minutos (Simental-Trinidad, 2004). La cuantificación se efectuó por el método de Lowry basado en la determinación espectrofotométrica de la intensidad de color que se obtiene al utilizar el reactivo Folin-Ciocalteu (Lowry *et al.*, 1951). La curva de calibración se preparó utilizando como estándar suero de albúmina de bovino al 98%.

### **2.1.7.2 Lípidos**

Los lípidos fueron extraídos con una mezcla de cloroformo, metanol y agua. La técnica utilizada para esta extracción fue la descrita por Bligh y Dyer (1959) y modificada por Chiaverini (1972). La evaluación del contenido de lípidos se realizó por el método descrito por Pande *et al.* (1963). La curva de calibración se preparó utilizando como estándar tripalmitina al 99%.

### **2.1.7.3 Carbohidratos**

Los carbohidratos fueron extraídos utilizando ácido sulfúrico 1 M (Whyte, 1987). La cuantificación se realizó con fenol según el método de Dubois *et al.* (1956). La curva de calibración para la cuantificación de los carbohidratos se realizó con un estándar de glucosa al 99%.

### **2.1.7.4 Biomasa en peso**

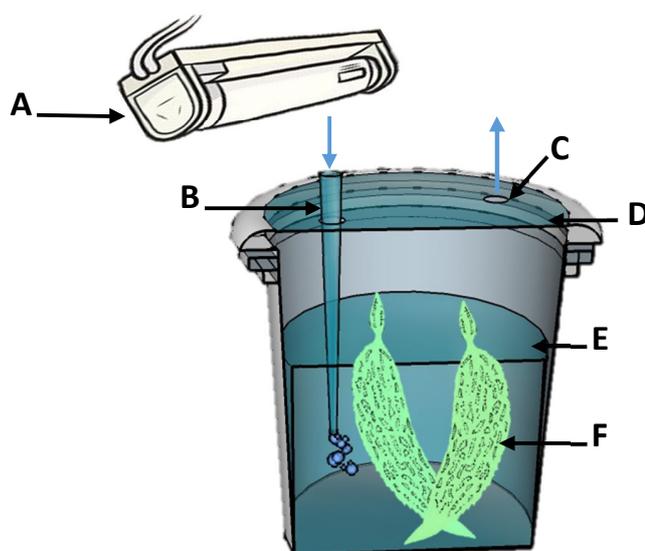
La biomasa total medida como el peso seco total, el peso seco orgánico y el peso seco inorgánico fueron evaluados siguiendo la técnica propuesta por Sorokin (1973). Los discos de *M. pyrifer* fueron colocados en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 4.7 cm de diámetro y 1 µm de abertura de poro, los filtros fueron depositados en una estufa a 60 °C hasta obtener un peso constante, posteriormente las muestras de discos enriquecidos fueron colocados en los filtros y enjuagados con 5 mL de formiato de amonio al 3% para remover las sales, el peso seco total se obtuvo colocando los filtros nuevamente en una estufa a 60 °C hasta obtener un peso constante de los filtros con las muestras, las cuales fueron pesadas en una balanza analítica (Mettler Toledo XS105) con capacidad mínima de 20 mg y máxima de 120 g. Por diferencia del peso del filtro sin muestra y el peso del filtro con muestra incinerada se calculó el peso seco total. Posteriormente los filtros con la muestra se colocaron en una mufla a 500 °C por 4 horas para obtener el peso inorgánico por diferencia del peso seco total y el peso después de la incineración. Por último el peso seco orgánico se obtuvo con la diferencia entre el peso seco total y el peso inorgánico. El peso seco total,

peso seco orgánico y peso de inorgánico se expresaron como porcentaje para el cálculo de la composición proximal. Además, los datos de peso orgánico e inorgánico se expresaron en peso de la fracción orgánica e inorgánica de la biomasa producida.

### 2.1.8 Ensayos de epifitación de láminas de *M. pyrifera* con 4 diferentes especies de microalgas

Posterior al ensayo de enriquecimiento con 8 especies se realizó un segundo experimento con 4 especies seleccionadas con base en los resultados de densidad de células epifitas y el contenido de la composición proximal en discos de *M. pyrifera* de las 8 especies iniciales (sección 2.1.6). Los tratamientos de epifitación se realizaron a escala semimasiva utilizando en lugar de discos a láminas de *M. pyrifera*, los enriquecimientos se realizaron por triplicado en recipientes cilíndricos de plástico color blanco, de 20 L de capacidad con 15 L de agua de mar. Los recipientes tuvieron tapas de plástico transparente (Lexon®) que permiten así el paso de la luz (Figura 4), la entrada de aire y la salida por medio de dos orificios circulares (1 cm de diámetro). Cada tratamiento experimental consistió en adicionar un inóculo de células obtenidas de la fase de crecimiento exponencial para cada especie indicada en la Tabla 3.

Durante el ensayo los sistemas experimentales se mantuvieron a temperatura ambiente de 21 °C, irradiancia de  $100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  provistas por lámparas fluorescentes de luz blanca y aireación constante. El agua de mar y el aire usado para estos ensayos recibieron el mismo tratamiento descrito en la sección 2.1.6 por cuatro días.



**Figura 4.** Esquematación del recipiente que se utilizó como sistema experimental en el enriquecimiento con discos de *Macrocystis pyrifera*. (A) Lámpara de luz blanca, (B) Entrada de aire, (C) salida de aire, (D) tapa transparente marca Lexon®, (E) medio enriquecido y (F) láminas de *M. pyrifera*.

**Tabla 3.** Concentraciones de células utilizadas en el enriquecimiento de láminas de *Macrocystis pyrifera*.

| Tratamiento                         | Inóculo (cél mL <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Komvophoron</i> sp.              | 2.49 × 10 <sup>5</sup>          |
| <i>Phormidium</i> sp.               | 4.44 × 10 <sup>4</sup>          |
| <i>Grammatophora marina</i>         | 2.94 × 10 <sup>4</sup>          |
| <i>Navicula</i> cf. <i>ulvaceae</i> | 1.28 × 10 <sup>5</sup>          |

Dentro de los recipientes se colocaron dos láminas de *M. pyrifera* para el enriquecimiento con epifitas, considerando que se realizarían dos tomas de muestra cada 48 horas por 4 días. Los muestreos se efectuaron tomando una lámina de *M. pyrifera* en la cual se realizaron cortes de 1.5 cm de diámetro con un sacabocado de la parte media de la lámina (Figura 3).

Las muestras recolectadas de cada unidad experimental fueron analizadas en su composición proximal (proteínas, lípidos y carbohidratos), así como el peso seco total, peso seco orgánico y peso seco inorgánico. Las muestras se mantuvieron congeladas en tubos cónicos de 2 mL a -20 °C hasta su análisis. La cuantificación de la composición proximal, la biomasa total y densidad de células epifitas se realizaron con los protocolos descritos en las secciones 2.1.6 y 2.1.7.

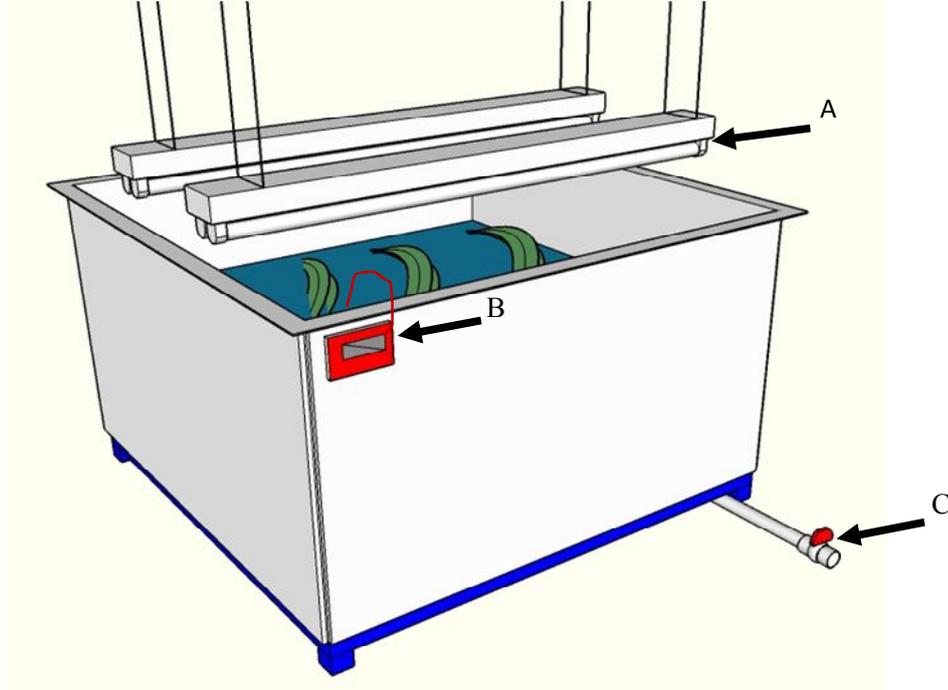
### 2.1.9 Ensayos de epifitación de frondas de *M. pyrifera* a escala masiva

Con base en los resultados obtenidos en las secciones 2.1.6 y 2.1.8 se realizó una selección de la especie de microalga que al ser epifita en láminas de *M. pyrifera* proporcionó el mayor incremento en la composición proximal.

Para estos ensayos se consideró usar 4 kg de biomasa húmeda del dosel de frondas de *M. pyrifera*. Los ensayos de epifitación se realizaron con *G. marina* con la que se obtuvieron los mejores resultados en los ensayos anteriores. Previo al enriquecimiento se llevó a cabo el crecimiento masivo de la microalga en 5 recipientes de 20 L bajo las condiciones experimentales descritas en la sección 2.1.6.

Las frondas se mantuvieron en un tanque con capacidad de 1000 L (112 cm x 112 cm x 66 cm) que contenían 270 L de agua de mar con 75 L de cultivo de *G. marina* con medio *f* (Guillard y Ryther, 1962) a una densidad de 29 375 células mL<sup>-1</sup>. El sistema experimental se colocó en plataformas de cultivo al exterior (Figura 5). Para este ensayo la temperatura se mantuvo en 18 ± 2 °C. El agua de mar, la irradiancia y el aire usados para estos ensayos recibió el mismo tratamiento como se describió en la sección 2.1.6.

Las algas se tuvieron en enriquecimiento por 4 días; posteriormente, se cosecharon las frondas, se separaron las láminas y se secaron bajo sombra. Las láminas se almacenaron en bolsas de plástico selladas y en oscuridad.



**Figura 5.** Esquemática del sistema experimental para el enriquecimiento masivo con nutrientes y macroalgas. (A) Lámparas fluorescentes de luz blanca, (B) termómetro electrónico sumergible y (C) salida de agua. Dentro del tanque se encontraba una piedra de aireación conectada a una manguera y un filtro de cartucho de 1  $\mu\text{m}$  a la entrada del aire.

## 2.2 Ensayos de enriquecimiento de *M. pyrifera* con nutrientes

### 2.2.1 Enriquecimiento de discos de *M. pyrifera* con altas concentraciones de nutrientes

Las láminas de *M. pyrifera* se enriquecieron tomando como base la relación de nitrógeno y fósforo establecida por Redfield (1933). Las 5 concentraciones utilizadas en el enriquecimiento (Figura 4) con distintas proporciones de N:P fueron: 22:1.37 mM, 44:2.75 mM, 66:4.12 mM, 88:5.5 mM, 1:0.06 M.

Como aporte de nitrógeno se utilizó un fertilizante agrícola líquido (7.8% de nitrato, 7.8% de amonio y 16.4% de urea) el cual ha sido utilizado para cultivar diatomeas bentónicas (Simental y Sánchez-Saavedra, 2003); como aporte de fósforo se utilizó fosfato de sodio dihidrato dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) grado reactivo marca Spectrum®.

El enriquecimiento con las distintas proporciones de N:P se realizó utilizando, para cada caso, un duplicado de cada concentración experimental. Los tratamientos experimentales se mantuvieron utilizando los sistemas y condiciones experimentales descritas en la sección 2.1.6. Para cada caso se utilizaron 20 discos de *M. pyrifera* que fueron obtenidos según lo descrito en la sección 2.1.8. De forma similar a lo descrito en esa sección se evaluó la composición proximal y la biomasa total cada 48 horas. Las condiciones ambientales de los ensayos fueron similares a las descritas en la sección 2.1.6. El agua de mar y el aire usados para estos ensayos recibió el mismo tratamiento que al ya descrito en la sección 2.1.6.

### **2.2.2 Enriquecimiento de láminas de *M. pyrifera* con bajas concentraciones de nutrientes**

Las láminas de la macroalga *M. pyrifera* se enriquecieron con bajas concentraciones de N:P, las cuales fueron 14:0.87  $\mu\text{M}$  y 200:12.05  $\mu\text{M}$ . Como aporte de nitrógeno y fósforo para estos ensayos se utilizó nitrato de sodio grado reactivo ( $\text{NaNO}_3$ ) y como aporte de fósforo se utilizó el mismo reactivo descrito en el ensayo anterior ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  grado reactivo marca Spectrum®). Los tratamientos de enriquecimiento se realizaron por triplicado utilizando láminas de *M. pyrifera* mantenidas en recipientes cilíndricos de 18 L como en la sección 2.1.8. La recolecta de muestras se realizó cada 24 horas retirando una lámina y cortando con un sacabocados de 1.5 cm de diámetro de la parte central de la lámina. Las muestras fueron congeladas para su posterior análisis de composición proximal y biomasa en peso total de acuerdo a lo indicado en la sección 2.1.7. Las condiciones ambientales de los ensayos y los tratamientos realizados al agua de mar y aire fueron similares a las mencionadas en la sección 2.1.6.

### **2.2.3 Enriquecimiento de frondas de *M. pyrifera* a escala masiva**

Los ensayos de enriquecimiento N:P a escala masiva se llevaron a cabo utilizando 4 kg de biomasa de frondas de *M. pyrifera* y se mantuvieron en tanques (112 cm x 112 cm x 66 cm) que contenían 500 L de agua de mar enriquecida con 200:12.05  $\mu\text{M}$  de nitrato de sodio y fosfato de sodio (Figura 5).

El sistema experimental y las condiciones ambientales se describen en la sección 2.1.8., el agua de mar y el aire usado para estos ensayos recibió el mismo tratamiento ya descrito en la sección 2.1.6. Las algas se tuvieron en enriquecimiento por 2 días, posteriormente las frondas se cosecharon, se separaron las láminas y se secaron en la sombra. Las láminas se almacenaron en bolsas de plástico selladas y en obscuridad.

## **2.3 Bioensayos de alimentación de juveniles de abulón rojo con tratamientos seleccionados**

### **2.3.1 Procedencia de juveniles de abulón**

Un total de 400 especímenes de *Haliotis rufescens* de 167 días fueron seleccionados de los sistemas de cultivo de una granja abulonera según su talla y peso y se tuvieron organismos con valores promedio de largo de concha de  $8.59 \text{ mm} \pm 0.33 \text{ mm}$ , ancho de concha de  $6.11 \text{ mm} \pm 0.31 \text{ mm}$  y peso húmedo de  $65.60 \text{ mg} \pm 11.07 \text{ mg}$ .

Los abulones fueron trasladados por vía terrestre al Laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE. Los organismos estuvieron sobre esponjas de plástico de 1 cm de espesor y 20 de longitud. Las esponjas fueron humedecidas con agua de mar y colocadas dentro de una bolsa de malla plástica negra con 1 mm de abertura de enmalle, estas bolsas de malla se colocaron dentro de otra bolsa de plástico transparente con oxígeno inyectado a saturación. Las bolsas con los organismos se colocaron en una hielera con gel frío a  $12 \text{ }^\circ\text{C}$  para su traslado con el propósito de disminuir el metabolismo de los organismos. Los organismos fueron aclimatizados a  $16 \text{ }^\circ\text{C}$  por una semana y mantenidos en inanición dentro de un recipiente de 104 L con agua de mar tratada como se describe en la sección 2.1.6, aireación constante, en ausencia de luz y recambios diarios del 100% del agua de mar.

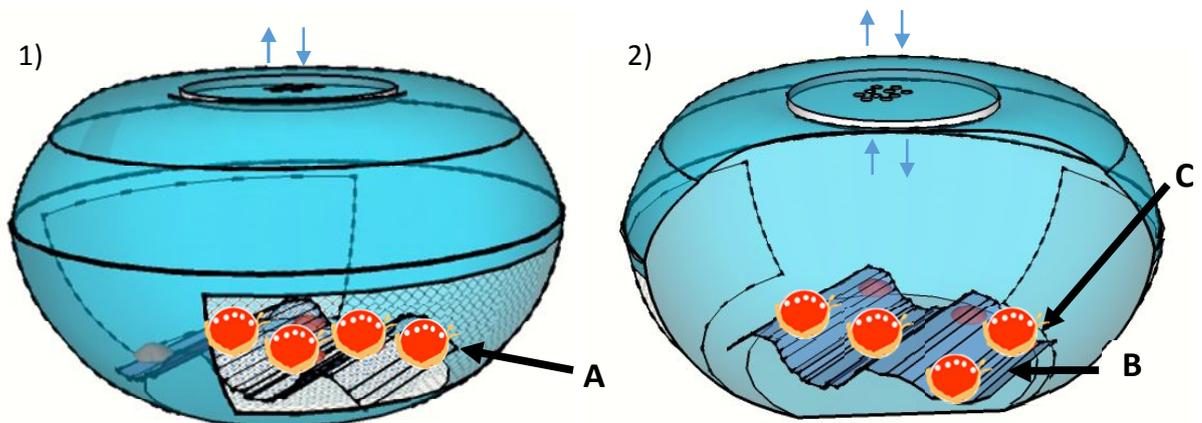
### **2.3.2 Alimentación y sistemas de mantenimiento**

Los organismos fueron distribuidos en 9 unidades experimentales con 20 L de agua de mar para ensayar tres tratamientos experimentales de alimentación obtenidos de los ensayos de enriquecimiento de *M. pyrifera* a escala masiva. Los tratamientos experimentales fueron: *M. pyrifera* enriquecida con *G. marina* (M+G), *M. pyrifera* enriquecida con N:P en 200:12.05  $\mu\text{M}$  (M+NP) y *M. pyrifera* sin enriquecer como tratamiento control (M). El alimento se suministró en raciones equivalentes al 5% del peso de los organismos. Cada 2 días se retiró el alimento no consumido; se suministró nueva ración de alimento para cada tratamiento.

Los tratamientos se mantuvieron por triplicado colocando 40 organismos en cada unidad experimental de manera aleatoria. Los organismos se mantuvieron en jaulas de plástico transparente de material Pet® de forma circular con aproximadamente 1 L de capacidad (20 cm de diámetro y 8 cm de alto). Las jaulas tuvieron en la parte superior orificios, para la entrada y la salida de aire (Figura 6). En dos de las paredes del contenedor (10 cm x 6 cm) y en la base de las jaulas (9 cm x 9 cm) se tenía malla plástica color negro

con 0.1 mm de abertura de poro. Las jaulas se colocaron dentro de los recipientes cilíndricos color blanco de 20 L de capacidad con 15 L de agua de mar previamente filtrada y desinfectada como fue descrito en la sección 2.1.6. En la base de las jaulas se colocó un trozo de lámina acanalada de fibra de vidrio transparente (8 cm x 8 cm) para que los organismos se adhirieran a ella como refugio y para que las láminas del alga no flotaran dentro de la jaula.

Los juveniles de abulón fueron mantenidos a  $17.0 \pm 0.3$  °C utilizando un baño de agua en un estanque de 3 toneladas de agua de mar. El agua fluyó a través de un sistema enfriador marca Little Giant de 1/15 Hp con capacidad de 500 gal h<sup>-1</sup> y con un sistema controlador de la temperatura. La temperatura en los recipientes de cultivo fue 0.7 °C mayor que la temperatura del agua del baño de agua, por lo que los organismos se mantuvieron en  $17.7 \pm 0.3$  °C. El estanque de 3 toneladas fue cubierto con láminas de aislamiento térmico de poliestireno® con 5.08 cm de espesor y además cubierto con malla sombra del 75% para evitar cambios de temperatura y la entrada de luz. La cantidad de luz que recibieron los organismos en las unidades experimentales se midió con un sensor 4π Biospherical Instrument (modelo QSL-100) y fue mantenida en valores de  $0 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  durante todo el periodo de experimentación (45 días).



**Figura 6.** Sistema de jaulas para cultivo de juveniles de abulón. 1) Vista frontal, 2) vista del interior. (A) Entrada de flujo de agua a través de maya plástica, (B) refugio, (C) abulones adheridos al refugio.

### 2.3.3 Calidad del agua

La limpieza de las unidades experimentales consistió en realizar un recambio de agua de mar del 100% diario en las unidades experimentales. El agua utilizada para los ensayos fue filtrada y además se realizó

una desinfección con cloro según el procedimiento descrito en la sección 2.1.6. Las variables de calidad del agua se evaluaron cada 2 días al momento de hacer los recambios del alimento.

El oxígeno se midió con un oxímetro marca YSI modelo 55. La temperatura con un termómetro/higrómetro-800041R Sper Scientific. La salinidad se midió con un refractómetro Atago Dgv. El pH se midió con un potenciómetro Hanna y la alcalinidad con un Kit para acuario Salifert®. Los valores de pH y de alcalinidad se ajustaron a los valores requeridos para cultivo de organismos con concha (pH de 8.0 y alcalinidad 120 mg L<sup>-1</sup>) como es mencionado por Boyd y Tucker (2012). Para aumentar el pH se agregó bicarbonato de sodio marca Arm & Hammer® y para la alcalinidad se adicionaron trozos de conchas (~5 cm con un peso de 19 g) de almejas (*Tivela stultorum*) previamente lavadas y desinfectadas con cloro. Los nutrientes como nitratos, nitritos y nitrógeno amoniacal total fueron evaluados con un kit para agua de mar marca API®.

### 2.3.4 Evaluación del crecimiento y supervivencia de juveniles de abulón

Al inicio del experimento se tomó una submuestra aleatoria de 40 organismos que fueron pesados y medidos. El peso se obtuvo con una balanza analítica marca Mettler Toledo de alta sensibilidad con capacidad mínima de 20 mg y máxima de 120 g. El largo y ancho de la concha se obtuvieron por mediciones con el uso de un microscopio estereoscópico marca Olympus modelo SZ2-ILST acoplado a una cámara Olympus modelo E-330, las imágenes fueron analizadas con el programa Image-Pro Discovery 4.5. Cada 15 días se realizaron mediciones de peso y talla por medio de muestreos en cada unidad experimental de 10 abulones al azar.

Para la cuantificación del crecimiento, la tasa de alimentación y el porcentaje de la supervivencia se utilizaron los siguientes índices:

- Tasa de crecimiento (TC) en términos de largo y ancho de la concha expresado en  $\mu\text{m día}^{-1}$  (Bansemer *et al.*, 2016):

$$TC = \frac{T_f - T_i}{D} \quad (2)$$

En donde:

$T_i$  = Talla inicial que puede ser largo o ancho de la concha

$T_f$  = Talla final que puede ser largo o ancho de la concha

$D$  = Tiempo en días

- Tasa de crecimiento en términos de peso expresado en  $\mu\text{g día}^{-1}$  (Bansemer *et al.*, 2016):

$$\text{TCP} = \frac{P_f - P_i}{T} \quad (3)$$

En donde:

$P_i$  = Peso inicial

$P_f$  = Peso final

$T$  = Tiempo en días

- Ganancia en peso expresada en porcentaje (Bansemer *et al.*, 2016):

$$\text{Gp}\% = \left[ \frac{P_f - P_i}{P_i} \right] \cdot 100 \quad (3)$$

$P_f$  = Peso promedio final

$P_i$  = Peso promedio inicial

- Tasa específica de crecimiento (TEC) expresada en porcentaje (Bansemer *et al.*, 2016):

$$\text{TEC } \% \text{ día}^{-1} = \left[ \frac{\ln P_{s_f} / \ln P_{s_i}}{t} \right] \cdot 100 \quad (4)$$

En donde:

$\ln P_{s_f}$  = Logaritmo natural del peso final

$\ln P_{s_i}$  = Logaritmo natural del peso inicial

$t$  = Tiempo en días

- Tasa de conversión alimenticia expresada en  $\text{g día}^{-1}$  (Bansemer *et al.*, 2016):

$$\text{TCA} = \frac{\text{AC}}{\text{PG}} \quad (5)$$

En donde:

AC= Alimento consumido

PG = Peso ganado

- Tasa de eficiencia proteica (TEP) (Bansemer *et al.*, 2016):

$$\text{TEP} = \frac{\text{PA}}{\text{PC}} \quad (6)$$

PA= Peso de abulón en gramos

PC= Proteína consumida gramos

- Energía total teórica (Tacon, 1990):

$$E = \sum [(\text{proteínas})(5.6) + (\text{Lípidos})(9.5) + (\text{Carbohidratos})(4.1) + \text{Peso inorgánico}] \quad (7)$$

El cálculo se realizó en gramos de peso de cada componente para obtener ( $\text{kcal g}^{-1}$ ).

- Proteína/Energía (P/E) (Tacon, 1990)

$$\frac{P}{E} \quad (8)$$

P= Proteína suministrada en gramos

E= Energía total teórica.

- Supervivencia expresada en porcentaje (Vivanco-Aranda *et al.*, 2011):

$$\%S = (n_f - n_i) \cdot 100 \quad (9)$$

En donde:

%S= Porcentaje de supervivencia.

$n_i$  = número de organismos al inicio del experimento

$n_f$  = número de organismos al final del experimento

### 2.3.5 Evaluación de la presencia de *Vibrio* spp.

Se evaluó la presencia de bacterias tipo *Vibrio* spp. usando medio Difco TCBS (Tiosulfato Citrato, Bilis, Sucrosa) Agar y siguiendo los procedimientos descritos en DIFCO (1985).

Las evaluaciones se realizaron cada 15 días durante la fase experimental en el bioensayo de alimentación de abulón, para cada unidad experimental y tratamiento. Por lo anterior, para cada caso se recolectó una muestra de 100 mL de agua previo a realizar el recambio del agua de mar. La muestra se diluyó en solución salina (9 g L<sup>-1</sup> NaCl) en tubos de cultivo de 9 mL, y esterilizados bajo las mismas condiciones que las descritas en la sección 2.1.3.

Para realizar la siembra de bacterias se filtraron 10 mL de cada muestra diluida en solución salina en filtros estériles Millipore con 0.22 µm de abertura de poro; estos filtros se colocaron sobre el medio TCBS preparado en cajas Petri de 5 cm de diámetro con ~ 15 mL de medio. Los medios se incubaron durante 24 horas a 28 °C y posteriormente se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC).

## 2.4 Análisis estadístico de los resultados

Para la comparación de las tasas de crecimiento con las diferentes especies de microalgas utilizadas en los cultivos estáticos y los tratamientos de enriquecimiento de las secciones 2.1.3, 2.1.6 y 2.1.8 se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Se usó el mismo análisis para comparar las posibles diferencias del bioensayo con juveniles de abulón con los diferentes tratamiento de alimentación, estas diferencias fueron evaluadas en el crecimiento en términos de longitud de la concha, tasa de crecimiento en términos de peso, peso ganado, tasa de conversión alimenticia, tasa específica de crecimiento, tasa de eficiencia proteica, energía total teórica, relación proteína/energía y supervivencia descritos en las tablas 13, 14 y 15 de la sección de resultados en el punto 3.3.

Para evaluar los cambios en el contenido proximal (proteínas, lípidos y carbohidratos) y biomasa total por efecto del enriquecimiento con las distintos tiempos de cultivo y estrategias de enriquecimiento como microalgas y nutrientes (N:P), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías.

En los casos en donde se encontró diferencia significativa entre los tratamientos, se aplicó una prueba *a posteriori* de Tukey. Para todas las pruebas estadísticas realizadas se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Kolmogorov y Levene. El análisis estadístico de los datos se realizó con el Software Statistica V10 (2011) para Windows 8 usando un valor de significancia de 0.05.

## Capítulo 3. Resultados

---

### 3.1 Epifitación de *M. pyrifera* con microalgas

#### 3.1.1 Cultivos monoespecíficos de 8 especies de microalgas

Con base en las densidades celulares obtenidas en las curvas de crecimiento (Figura 7) se identificó la fase exponencial de las diferentes especies de microalgas para determinar la tasa de crecimiento, los resultados mostraron tener diferencias significativas entre las distintas especies ( $P < 0.05$ ) (Tabla 4). Las especies con la mayor tasa de crecimiento fueron *Navicula* sp. (1.10 divisiones día<sup>-1</sup>) y *Amphora* sp. (1.16 divisiones día<sup>-1</sup>) que corresponden a un grupo sin diferencias significativas entre ellas ( $P > 0.05$ ). Las tasas de crecimiento que fueron significativamente menores a las demás especies fueron para *Heterococcus* sp. (0.17 divisiones día<sup>-1</sup>) y *Komvophoron* sp. (0.28 divisiones día<sup>-1</sup>) ( $P < 0.05$ ) y entre estas dos especies no se presentaron diferencias significativas entre sus tasas de crecimiento ( $P = 0.06$ ).

#### 3.1.3 Epifitación de discos de *M. pyrifera* con 8 especies de microalgas

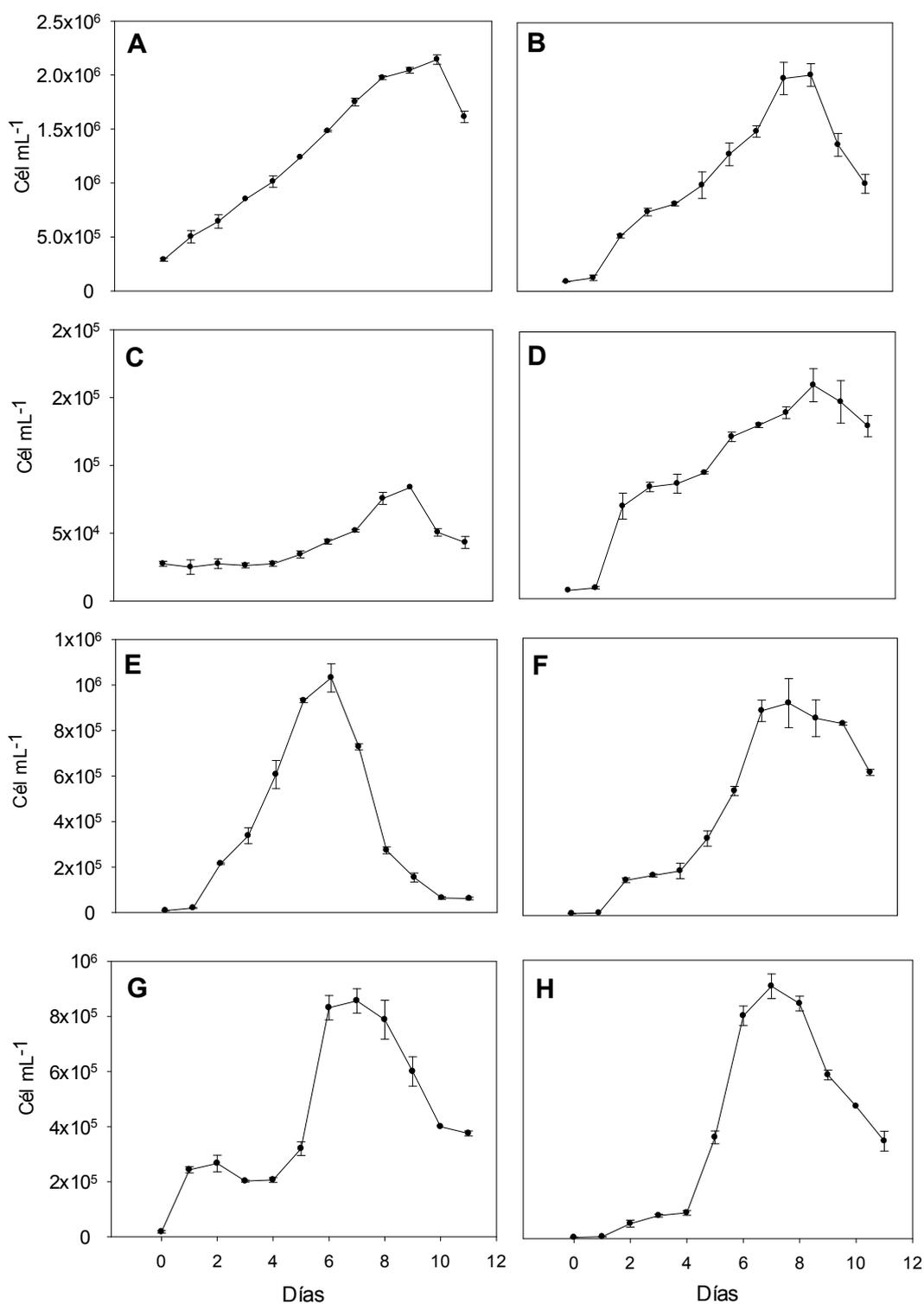
En el ensayo de enriquecimiento con las 8 especies de microalgas se cuantificó las células epifitas en los discos de *M. pyrifera* y de células libres en el medio. El análisis estadístico ANOVA de una vía presentó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la densidad de células epifitas de los discos de *M. pyrifera* (Figura 8), así como también para las células libres en el medio para cada especie ( $P < 0.05$ ). El enriquecimiento con *Phormidium* sp. presentó la mayor densidad de células epifitas (0.92 divisiones día<sup>-1</sup>), así como también de las mayores tasa de crecimiento junto con *Komvophoron* sp. (0.44 divisiones día<sup>-1</sup>) y *Heterococcus* sp. (0.38 divisiones día<sup>-1</sup>) (Tabla 5). Mientras que las menores densidades de epifitación fueron en el enriquecimiento con la cianobacteria *Komvophoron* sp. (0.07 divisiones día<sup>-1</sup>). En todos los tratamientos se observó un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) de la epifitación de *M. pyrifera* con respecto al día cero sin enriquecimiento de células epifitas (Figura 8).

**Tabla 4.** Valores promedio de las tasas de crecimiento en la fase exponencial ( $\mu$ : divisiones día<sup>-1</sup>) en el cultivo de las diferentes especies de microalgas mantenidas en cultivos estáticos monoespecíficos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c > d > e$  ( $n = 2$ ).

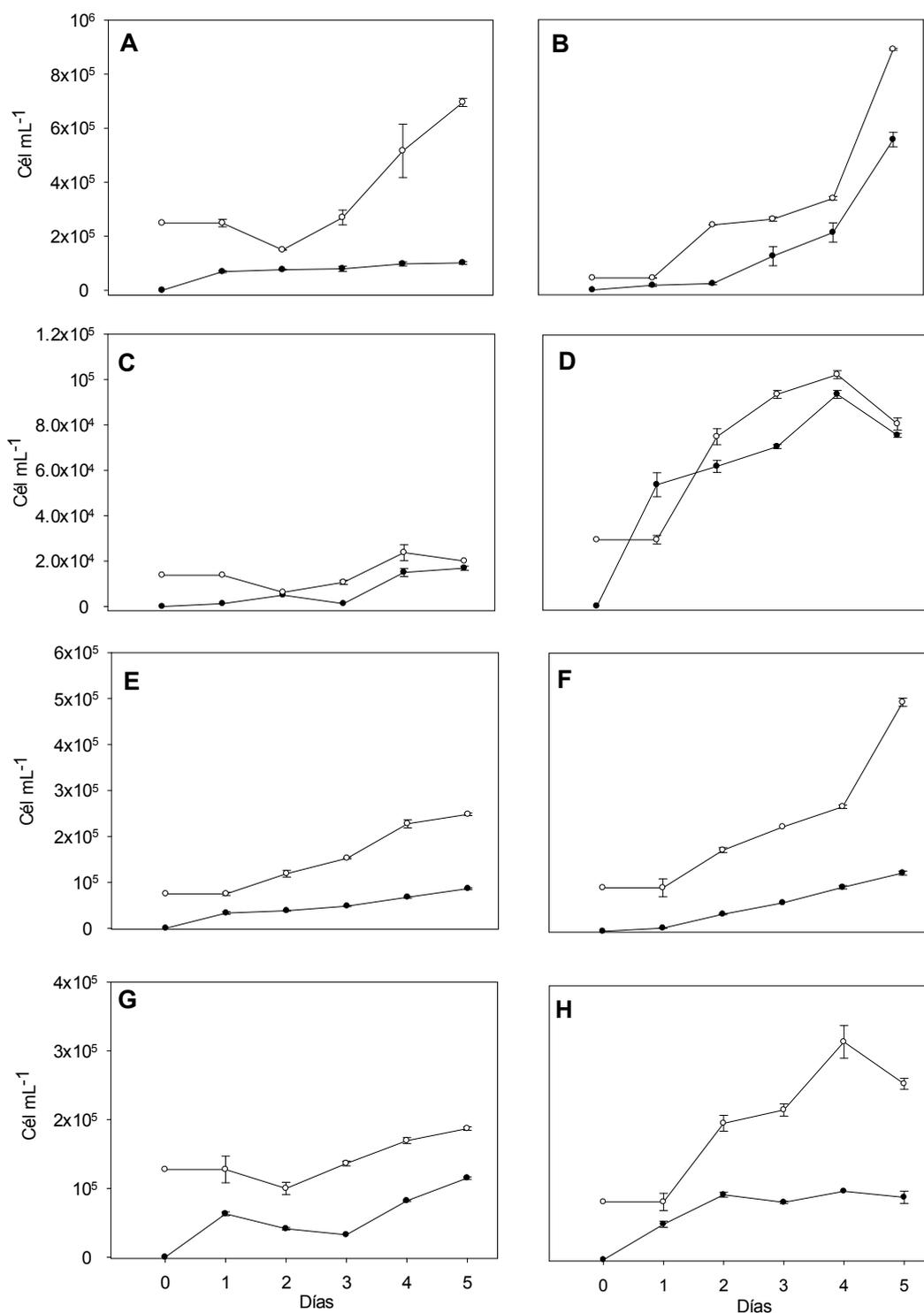
| Especie                             | Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Komvophoron</i> sp.              | 0.28 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>  |
| <i>Phormidium</i> sp.               | 0.50 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>  |
| <i>Heterococcus</i> sp.             | 0.17 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>  |
| <i>Grammatophora marina</i>         | 0.51 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>  |
| <i>Amphora</i> sp.                  | 1.16 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>  |
| <i>Amphora tenerrima</i>            | 0.97 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>  |
| <i>Navicula</i> cf. <i>ulvaceae</i> | 0.68 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>  |
| <i>Navicula</i> sp.                 | 1.10 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>  |

**Tabla 5.** Valores promedio de las tasas de crecimiento ( $\mu$ : divisiones día<sup>-1</sup>) en la epifitación de los discos de *Macrocystis pyrifera* y en el medio de enriquecimiento para las diferentes especies de microalgas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a < b < c < d$  ( $n = 2$ ).

| Especies                            | Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) |                               |
|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                                     | Células epífitas              | Células libres                |
| <i>Komvophoron</i> sp.              | 0.07 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>  | 0.44 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>  |
| <i>Phormidium</i> sp.               | 0.92 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>  | 0.38 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup> |
| <i>Heterococcus</i> sp.             | 0.35 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>  | 0.38 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup> |
| <i>Grammatophora marina</i>         | 0.12 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>  | 0.09 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>  |
| <i>Amphora</i> sp.                  | 0.24 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>  | 0.21 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>  |
| <i>Amphora tenerrima</i>            | 0.35 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>  | 0.30 $\pm$ 0.00 <sup>bc</sup> |
| <i>Navicula</i> cf. <i>ulvaceae</i> | 0.30 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup> | 0.18 $\pm$ 0.02 <sup>cd</sup> |
| <i>Navicula</i> sp.                 | 0.03 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>  | 0.22 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>  |



**Figura 7.** Curvas de crecimiento basados en la densidad de células de *Komvophoron* sp. (A), *Phormidium* sp. (B), *Heterococcus* sp. (C), *Grammatophora marina* (D), *Amphora* sp. (E), *Amphora tenerrima* (F), *Navicula cf. ulvaceae* (G) y *Navicula* sp. (H), mantenidas en cultivos monoespecíficos estáticos con medio *f* (Guillard y Ryther, 1962). Las barras verticales representan la desviación estándar ( $n = 2$ ).

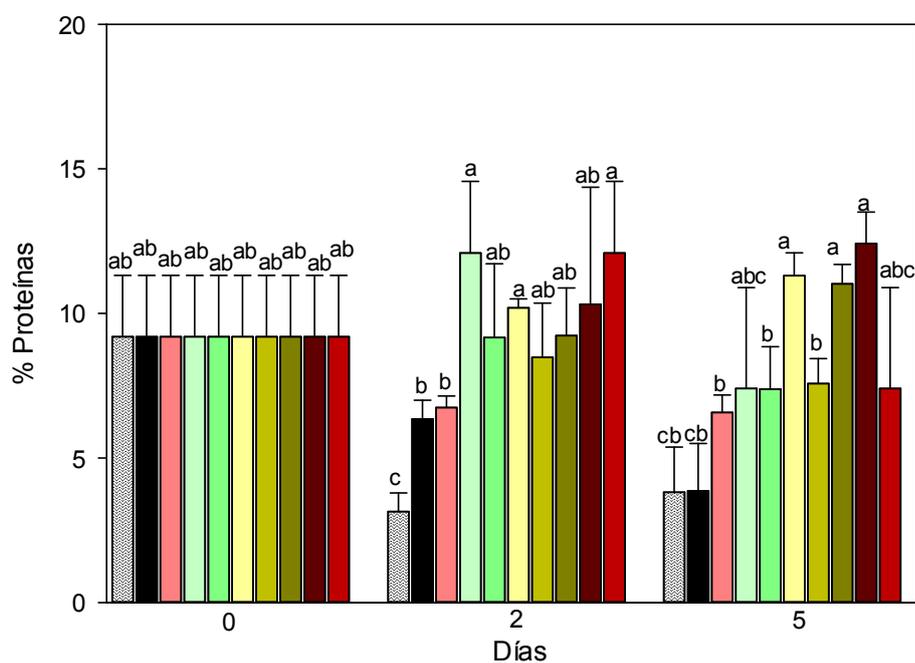


**Figura 8.** Valores promedio de la densidad de células epifitas en discos de *Macrocystis pyrifera* (●) con respecto a la concentración de células libres en el medio (○) de las especies: *Komvophon* sp. (A), *Phormidium* sp. (B), *Heterococcus* sp. (C), *Grammatophora marina* (D), *Amphora* sp. (E), *Amphora tenerrima* (F), *Navicula cf. ulvaceae* (G) y *Navicula* sp. (H). Las barras verticales representan la desviación estándar ( $n = 2$ ).

### 3.1.4 Composición proximal

#### 3.1.4.1 Proteínas

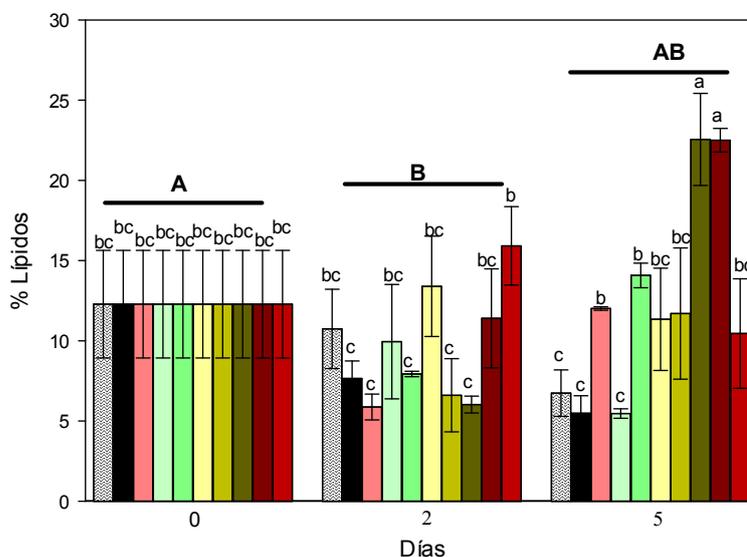
Los resultados de la cuantificación de proteínas en los discos de *M. pyrifera* enriquecidos con microalgas mostraron un cambio significativo por efecto del enriquecimiento entre las diferentes especies de microalgas y tratamientos control utilizados ( $P < 0.05$ ) (Figura 9). El mayor porcentaje de proteínas correspondió a las especies *Navicula cf. ulvaceae* (12.4%), *Amphora tenerrima* (11.0%) y *Grammatophora marina* (11.3%) en el día cinco y en el día dos para *Phormidium* sp. (12.1%) y *Navicula* sp. (12.0%), sin embargo debido a la desviación estándar, solo se observaron diferencias significativas con los tratamientos: *Heterococcus* sp. (7.4%) y *Amphora* sp. (7.6%) en el día 5 y *Komvophoron* sp. (6.7% - 6.6%), agua de mar (3.2% - 3.8%) y medio *f* (3.2% - 3.8%) en el día 2 y 5. En el análisis de los enriquecimientos también se evaluó el efecto del tiempo en donde el día cero se refiere a los discos de *M. pyrifera* sin enriquecer y los días 2 y 5 a los discos enriquecidos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tiempos de enriquecimiento ( $P > 0.05$ ).



**Figura 9.** Valores promedio en porcentaje de proteínas con base en la biomasa en peso seco de láminas de *Macrocytis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Heterococcus* sp. (■), *Grammatophora marina* (■), *Amphora* sp. (■) *Amphora tenerrima* (■) *Navicula cf. ulvaceae* (■) y *Navicula* sp. (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio *f*, además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio *f* (■). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ ).

### 3.1.4.2 Lípidos

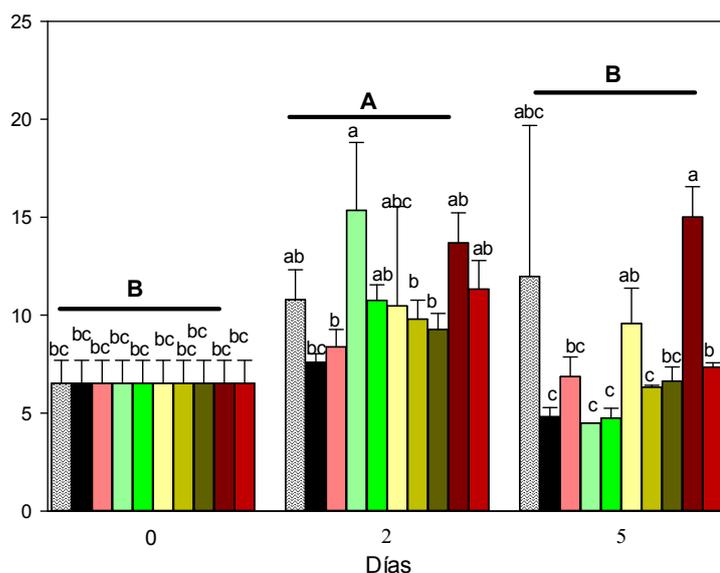
El porcentaje de lípidos de los discos de *M. pyrifera* sin enriquecer en el día cero (Figura 10) se observó en 12.3%, posterior al enriquecimiento este porcentaje cambio como resultado de los tratamientos y del tiempo, el enriquecimiento presentó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tiempos de exposición de los discos de *M. pyrifera* a las diferentes especies de microalgas y el tratamientos control. Se observó que en el segundo día de enriquecimiento el porcentaje de lípidos disminuyó significativamente en la mayoría de los tratamientos con respecto al día cero. Por otro lado el análisis de varianza también mostró un efecto de interacción entre el tiempo de enriquecimiento y las especies utilizadas, en el día cinco de enriquecimiento la tendencia de disminución observada en el día dos cambio, algunas de las especies que habían disminuido su porcentaje de lípidos aumentaron significativamente como *Navicula cf. ulvaceae* y *Amphora tenerrima* que aumentaron de 11.4% a 22.6% y de 6.0% a 22.5% respectivamente (Figura 10). Estas dos especies antes mencionadas fueron las mismas que mostraron el mayor porcentaje de lípidos con respecto a los demás tratamientos y a las macroalgas sin enriquecer del día cero ( $P < 0.05$ ). La especie que mostró el menor contenido de lípidos en el día cinco fue *Phormidium* sp. (5.5%) y los tratamientos control con agua de mar (6.8%) y medio *f* (5.5%) (Figura 10).



**Figura 10.** Valores promedio en porcentaje de lípidos con base en la biomasa en peso seco de láminas de *Macrocyctis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Heterococcus* sp. (■), *Grammatophora marina* (■), *Amphora* sp. (■), *Amphora tenerrima* (■) *Navicula cf. ulvaceae* (■) y *Navicula* sp. (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio *f*, además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio *f* (■). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y mayúsculas entre tiempos. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$  y  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ ).

### 3.1.4.3 Carbohidratos

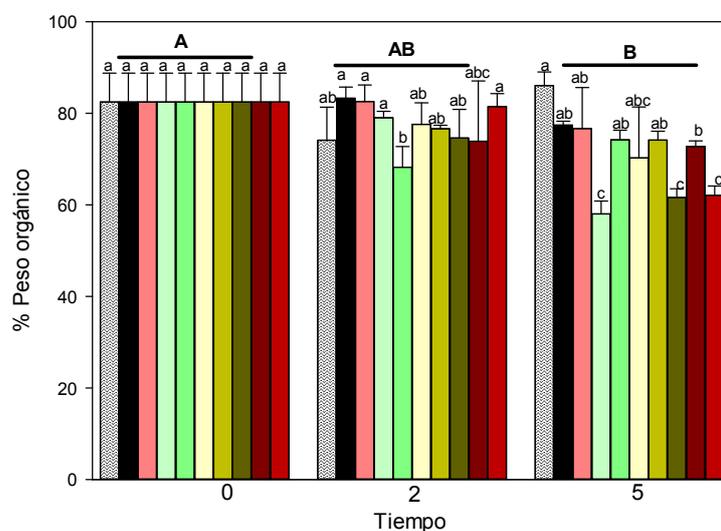
El porcentaje de carbohidratos de las algas sin enriquecer se encontraba en 6.5% en el día cero (Figura 11), posterior a la exposición de los discos de *M. pyrifera* a los enriquecimientos se observó un cambio significativo con respecto a las algas sin enriquecer ( $P < 0.05$ ) y entre las distintas especies utilizadas ( $P < 0.05$ ), también se observó una interacción entre ambas variables (tiempo y especies) ( $P < 0.05$ ). El cambio observado en relación al tiempo fue positivo, el enriquecimiento generó un aumento del porcentaje de carbohidratos en el día dos el cual fue mayor significativamente con respecto a los porcentajes observados en el día cero y cinco. En el día cinco el cambio fue negativo generando disminución en el porcentaje de carbohidratos que no fue diferente significativamente en comparación con el día cero ( $P > 0.05$ ). Por otro lado, el cambio que se observó entre los tratamientos fue en aumento con las 8 especies y con el tratamiento control con agua de mar en el día dos, sin embargo, solo el enriquecimiento con *Phormidium* sp. (15.4%) en el día dos y *Navicula* cf. *ulvaceae* (15.0%) en el día cinco presentaron diferencias significativas con respecto al día cero (Figura 11).



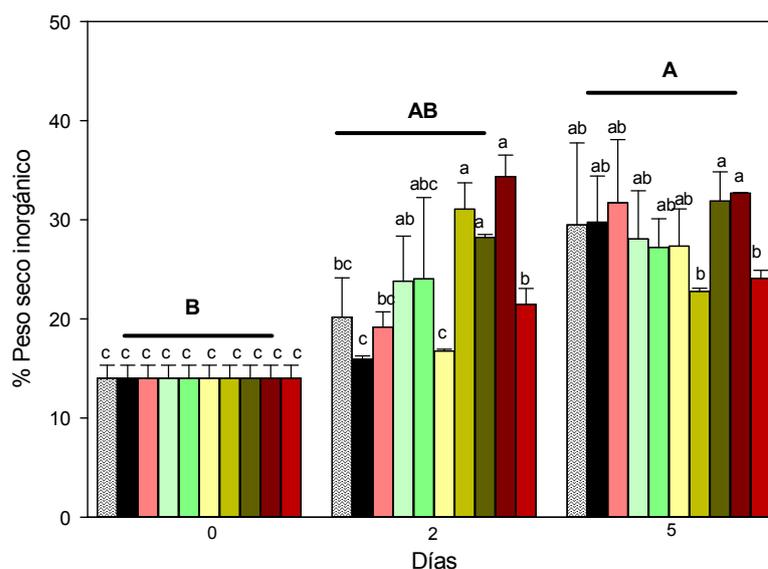
**Figura 11.** Valores promedio en porcentaje de carbohidratos con base en la biomasa en peso seco de láminas de *Macrocytis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Heterococcus* sp. (■), *Grammatophora marina* (■), *Amphora* sp. (■), *Amphora tenerrima* (■) *Navicula* cf. *ulvaceae* (■) y *Navicula* sp. (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio f, además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio f (■). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y mayúsculas entre tiempos. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$  y  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ ).

### 3.1.4.4 Biomasa en peso

En el análisis de la biomasa orgánica se observó un cambio negativo con tendencia a la disminución a través del tiempo, este cambio fue diferente significativamente entre el día cero (sin enriquecimiento) y el día cinco ( $P < 0.05$ ) (Figura 12). El día cinco de enriquecimiento se observó un menor porcentaje de biomasa orgánica. Entre los diferentes tratamientos de enriquecimiento los cambios también fueron significativos ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, estos cambios fueron hacia la disminución, los tratamientos que presentaron el menor porcentaje de biomasa orgánica fueron *Phormidium* sp. (57.0%), *Amphora tenerrima* (59.6%) y *Navicula* sp. (59.9%) en el quinto día de enriquecimiento en comparación con todos los demás tratamientos en los diferentes tiempos. El porcentaje de biomasa inorgánica también presentó cambios significativos ( $P > 0.05$ ) entre el tiempo y las especies utilizadas posterior al enriquecimiento (Figura 13), estos cambios fueron hacia el aumento del porcentaje de biomasa inorgánica en respuesta de la disminución de la biomasa orgánica. Las especies con mayor porcentaje de biomasa inorgánica con respecto a los demás tratamientos fueron *Amphora tenerrima* (día dos y cinco 28.9% - 33%), *Amphora* sp. (día dos 30.9%) y *Navicula* cf. *ulvaceae* (día dos y cinco 33.2% - 35.4%).



**Figura 12.** Valores promedio en porcentaje de peso seco orgánico con base en la biomasa total en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. ( ), *Phormidium* sp. ( ), *Heterococcus* sp. ( ), *Grammatophora marina* ( ), *Amphora* sp. ( ), *Amphora tenerrima* ( ) *Navicula* cf. *ulvaceae* ( ) y *Navicula* sp. ( ) mantenidas en cultivos estáticos con medio f, además de dos tratamientos control: agua de mar ( ) y medio f ( ). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y mayúsculas entre tiempos. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$  y  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ ).



**Figura 13.** Valores promedio en porcentaje de peso seco inorgánico con base en la biomasa total en peso seco de láminas de *Macrocyctis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Heterococcus* sp. (■), *Grammatophora marina* (■), *Amphora* sp. (■), *Amphora tenerrima* (■) y *Navicula cf. ulvaceae* (■) y *Navicula* sp. (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio *f*, además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio *f* (■). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y mayúsculas entre tiempos. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$  y  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ ).

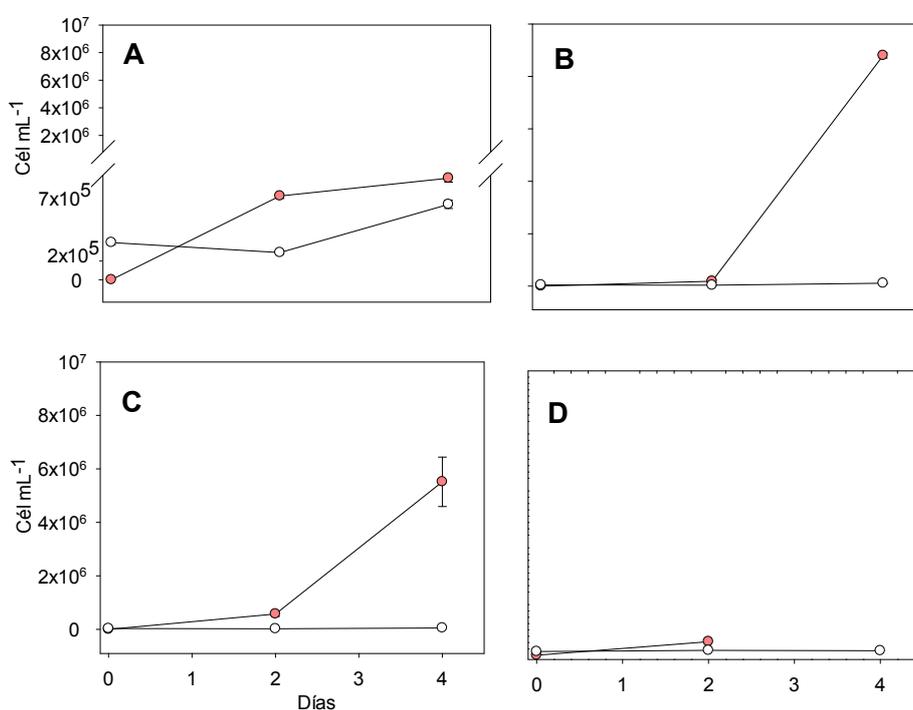
### 3.1.5 Epifitación de láminas de *M. pyrifera* con 4 especies de microalgas

Con base en los resultados de densidad de células epifitas y composición proximal (sección 3.1.3 y 3.1.4) de los ensayos preliminares de enriquecimiento con 8 especies de microalgas en discos de *M. pyrifera* se seleccionaron 4 especies, las cuales presentaron un cambio en el balance de sus componentes orgánicos (proteínas, lípidos y carbohidratos) por efecto de la epifitación selectiva, este cambio mostró una tendencia al incremento respecto al tiempo de enriquecimiento en mayor proporción para carbohidratos y lípidos. Las especies seleccionadas para los siguientes ensayos de enriquecimiento a escala semimasiva en láminas de *M. pyrifera* fueron: *Komvophoron* sp., *Navicula cf. ulvaceae*, *G. marina* y *Phormidium* sp. Los resultados de tasas de crecimiento del enriquecimiento en láminas de *M. pyrifera* (Tabla 6), mostraron una tendencia de aumento en las células epifitas con respecto a las células libres en el medio (Figura 14), con excepción del enriquecimiento con la cianobacteria *Komvophoron* sp. que presentó una mayor tasa de crecimiento en el medio de cultivo que en las láminas (Tabla 6). Se presentaron diferencias entre las tasa de crecimiento de las diferentes especies de microalgas libres en el medio ( $P < 0.05$ ) y microalgas epifitas ( $P < 0.05$ ). La mayor tasa de crecimiento de las células epifitas en láminas de *M. pyrifera* fue *Phormidium* sp. (1.01 divisiones día<sup>-1</sup>) resultado similar que en los ensayos preliminares con discos de *M.*

*pyrifera* (Tabla 4). En contraste la menor tasa de crecimiento de las células epifitas se observó en el tratamiento de enriquecimiento con *Komvophoron* sp. (0.06 divisiones día<sup>-1</sup>). Por otra parte la mayor tasa de crecimiento en las células libres en el medio se observó en las cianobacterias *Komvophoron* sp. (0.29 divisiones día<sup>-1</sup>) y *Phormidium* sp. (0.32 divisiones día<sup>-1</sup>), la menor tasa de crecimiento se presentó en ambas diatomeas *Navicula* cf. *ulvaceae* (0.04 divisiones día<sup>-1</sup>) y *G. marina* (0.05 divisiones día<sup>-1</sup>) (Tabla 6).

**Tabla 6.** Valores promedio de las tasas de crecimiento en la fase exponencial ( $\mu$ : divisiones día<sup>-1</sup>) de la epifitación selectiva de láminas de *Macrocystis pyrifera* y células libres en el medio para las diferentes especies de microalgas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ANOVA una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$  ( $n = 3$ ).

| Especies                            | Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) |                              |
|-------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
|                                     | Células epifitas              | Células libres               |
| <i>Komvophoron</i> sp.              | 0.06 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>  | 0.29 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup> |
| <i>Phormidium</i> sp.               | 1.01 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>  | 0.32 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup> |
| <i>Grammatophora marina</i>         | 0.32 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>  | 0.05 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> |
| <i>Navicula</i> cf. <i>ulvaceae</i> | 0.33 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>  | 0.04 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> |



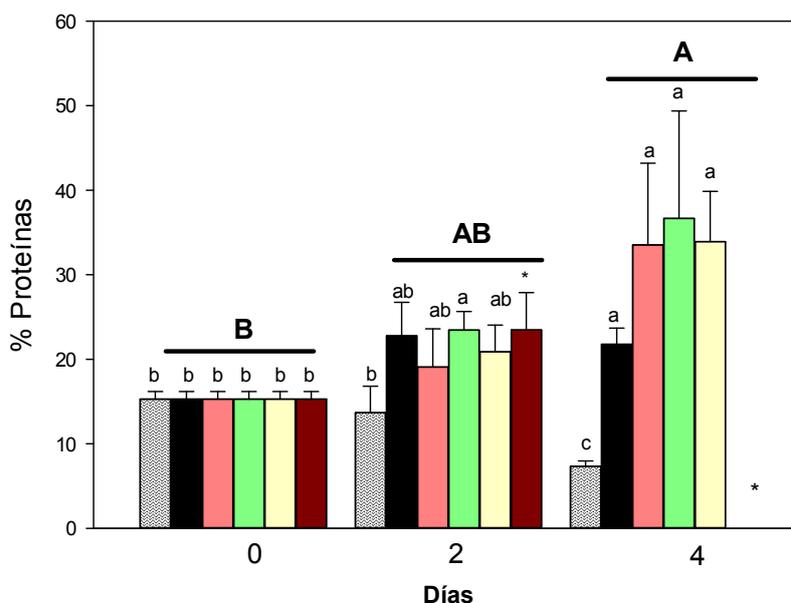
**Figura 14.** Valores promedio de la densidad de células libres en el medio (—○—) y epifitas en láminas de *Macrocystis pyrifera* (—●—) con 4 diferentes especies: *Komvophoron* sp. (A), *Phormidium* sp. (B), *Grammatophora marina* (C) y *Navicula* cf. *ulvaceae* (D) mantenidas en cultivos estáticos monoespecíficos con medio *f*. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $n = 3$ ).

### 3.1.5.1 Composición proximal

#### 3.1.5.1.1 Proteínas

Los resultados del análisis de proteínas de los enriquecimientos en láminas de *M. pyrifera* con cuatro especies de microalgas se muestran en la figura 15 para los cuatro días de enriquecimiento, en donde el día cero se refiere a las láminas de *M. pyrifera* sin enriquecimiento y los días dos y cuatro al cambio en el porcentaje de proteínas causado por el enriquecimiento.

Los resultados de los enriquecimientos mostraron diferencias significativas en el porcentaje de proteínas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ) y entre el tiempo ( $P < 0.05$ ), además se encontró interacción entre los tratamientos y el tiempo de enriquecimiento ( $P < 0.05$ ) (Figura 15).



**Figura 15.** Valores promedio en porcentaje del contenido de proteínas con base en la biomasa en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Grammatophora marina* (■) y *Navicula* cf. *ulvaceae* (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio *f*, además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio *f* (■). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y mayúsculas entre el tiempo. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$  y  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 3$ ).

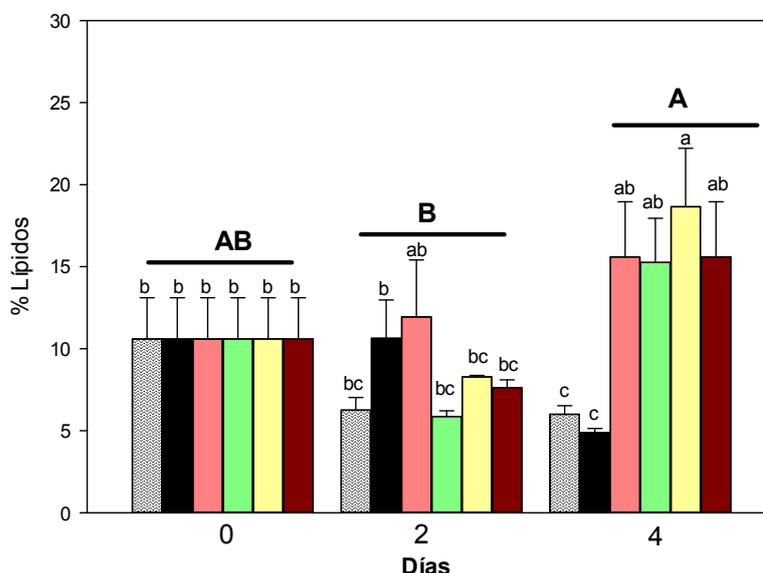
\*Muestra no considerada en el análisis estadístico por pérdida de unidad experimental.

Se observó un aumento en el porcentaje de proteínas en los días dos y cuatro con respecto al día cero. Sin embargo, estas las diferencias entre los tiempos de enriquecimientos solo fueron significativas en el día

cuatro con respecto al día cero ( $P < 0.05$ ) (Figura 15). Los porcentajes de proteínas que se observaron en mayor proporción en el día cuatro fueron los tratamientos de enriquecimiento con las especies *Komvophoron* sp. (33.5%), *Phormidium* sp. (36.7%) y *G. marina* (33.9%) presentando diferencias significativas con el tratamiento control con agua de mar (día dos 7.3% y día cuatro 13.7%) ( $P < 0.05$ ) y con las láminas sin enriquecer en el tiempo cero (15.3%) ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, debido a la desviación estándar, no se presentaron diferencias significativas con el tratamiento control con medio *f* (día dos 22.9% y día cuatro 21.8%) ni con los tratamientos de enriquecimiento con microalgas en el día dos (19.1% a 23.5%). Por otro lado, el tratamiento que presentó el menor porcentaje de proteínas fue el tratamiento control con agua de mar en el día cuatro (7.0%) que corresponde a casi cincuenta por ciento menos del contenido evaluado al inicio del ensayo sin enriquecer (15.0%).

### 3.1.5.1.2 Lípidos

El contenido de lípidos al inicio del experimento en láminas de *M. pyrifera* sin enriquecer (día cero) se encontraba en 10.6%, posterior al tiempo de enriquecimiento el porcentaje de lípidos cambio, en el día dos la mayoría de los resultados disminuyeron sin tener diferencias significativas con el día cero ( $P > 0.05$ ) (Figura 16).

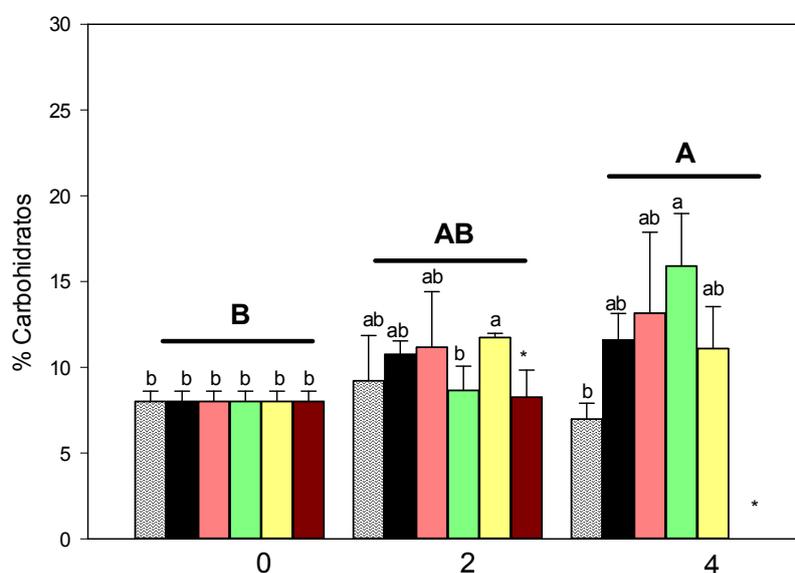


**Figura 16.** Valores promedio en porcentaje del contenido de lípidos con base en el la biomasa en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (red), *Phormidium* sp. (green), *Navicula* cf. *ulvaceae* (dark red) y *Grammatophora marina* (yellow) mantenidas en cultivos estáticos con medio *f*, además de dos tratamientos control: agua de mar (hatched) y medio *f* (black). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y mayúsculas entre el tiempo. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$  y  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 3$ ).

El día cuatro de enriquecimiento se pudo observar un incremento del porcentaje de lípidos entre tiempos y entre tratamientos que fue diferente significativamente ( $P < 0.05$ ), además se observó interacción entre el efecto del enriquecimiento y el tiempo ( $P < 0.05$ ). El tratamiento con mayor porcentaje de lípidos con respecto al día cero y a los tratamientos control fue el enriquecimiento con *G. marina* (18.7%) al día cuatro ( $P < 0.05$ ), sin embargo debido a la desviación estándar *G. marina* no presentó diferencias significativas con *Komvophoron* sp. (15.6%), *Phormidium* sp. (15.3%) y *Navicula* cf. *ulvaceae* (15.6%) en el día cuatro ni con *Komvophoron* sp. en el día dos (11.9%) ( $P > 0.05$ ), por otro lado el menor porcentaje de lípidos se obtuvo con el tratamiento control con el uso de agua de mar también en el día cuatro (4.9%).

### 3.1.5.1.3 Carbohidratos

El porcentaje de carbohidratos con base en el peso seco de las láminas de *M. pyrifera* en el día cero (sin enriquecer) mostró porcentajes de 8% y posteriormente en los días dos y cuatro se observó un aumento en el día cuatro de enriquecimiento con el enriquecimiento con la cianobacteria *Phormidium* sp. (15.9 %) la cual fue diferente significativamente a los porcentajes de carbohidratos observados en el día cero (8%) ( $P < 0.05$ ) (Figura 17).



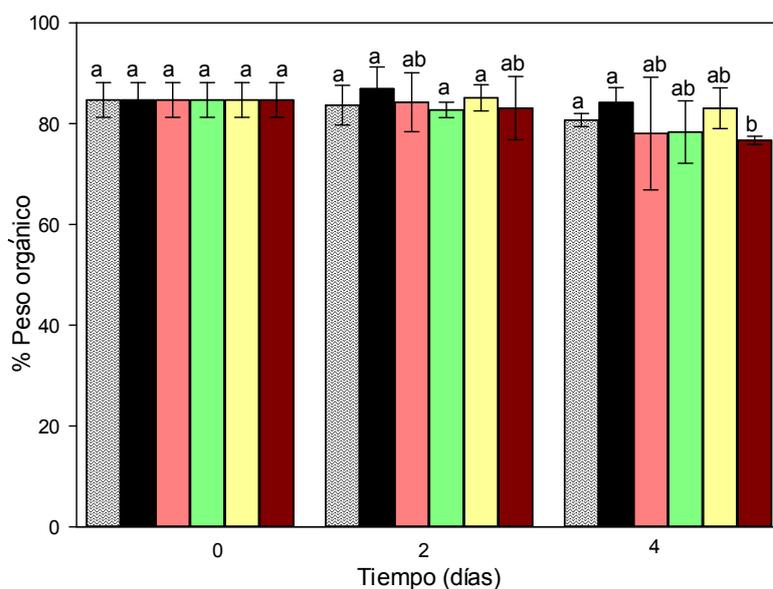
**Figura 17.** Valores promedio en porcentaje del contenido de carbohidratos con base en la biomasa en peso seco de láminas de *Macrocyctis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Navicula* cf. *ulvaceae* (■) y *Grammatophora marina* (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio f, además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio f (■). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y mayúsculas entre el tiempo. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b$  y  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ ).

\*Muestra no considerada en el análisis estadístico por pérdida de unidad experimental.

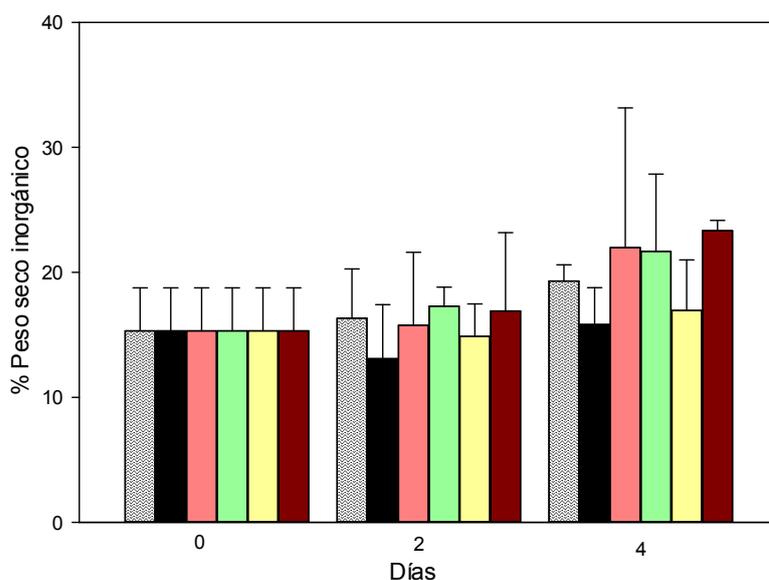
### 3.1.5.1.4 Biomasa en peso

El peso orgánico en el día cero con *M. pyrifera* sin enriquecer se encontraba alrededor del 84.7%, posterior al enriquecimiento no se observó un cambio en el tiempo con respecto al día cero por efecto del enriquecimiento ( $P > 0.05$ ) (Tabla 18). Sin embargo, se observó una disminución únicamente con el enriquecimiento con *Navicula cf. ulvaceae* en el día cuatro de 84.7% a 76.7% el cual fue significativamente menor a las macroalgas sin enriquecer en el día cero (84.7%), a los tratamientos control con medio *f* (día dos 86.9% y día cuatro 84.2%) y al tratamiento control con agua de mar (día dos 83.7% y día cuatro 80.7%).

Por otra parte con respecto al peso seco inorgánico en las macroalgas sin enriquecer (15.3%), no se observaron diferencias significativas entre los tiempos de enriquecimiento ( $P > 0.05$ ) ni entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ), sin embargo aunque el peso inorgánico no fue diferente significativamente entre los tiempos de enriquecimiento se puede ver una ligera tendencia a incrementar en el día 4 (Figura 19).



**Figura 18.** Valores promedio en porcentaje del de peso seco inorgánico con respecto a la biomasa seca total de láminas de *Macrocyctis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Navicula cf. ulvaceae* (■) y *Grammatophora marina* (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio *f*, además de dos tratamientos control: agua de mar (▨) y medio *f* (■). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos, no se encontraron diferencias entre los tiempos. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 3$ ).



**Figura 19.** Valores promedio en porcentaje del de peso seco inorgánico con respecto a la biomasa seca total de láminas de *Macrocyctis pyrifera* enriquecidas con las microalgas: *Komvophoron* sp. (■), *Phormidium* sp. (■), *Navicula* cf. *ulvaceae* (■) y *Grammatophora marina* (■) mantenidas en cultivos estáticos con medio *f*, además de dos tratamientos control: agua de mar (■) y medio *f* (■). Sin diferencias significativas en el análisis de ANOVA de dos vías. Barras verticales indican la desviación estándar (n = 3).

## 3.2 Enriquecimiento de *M. pyrifera* con nutrientes

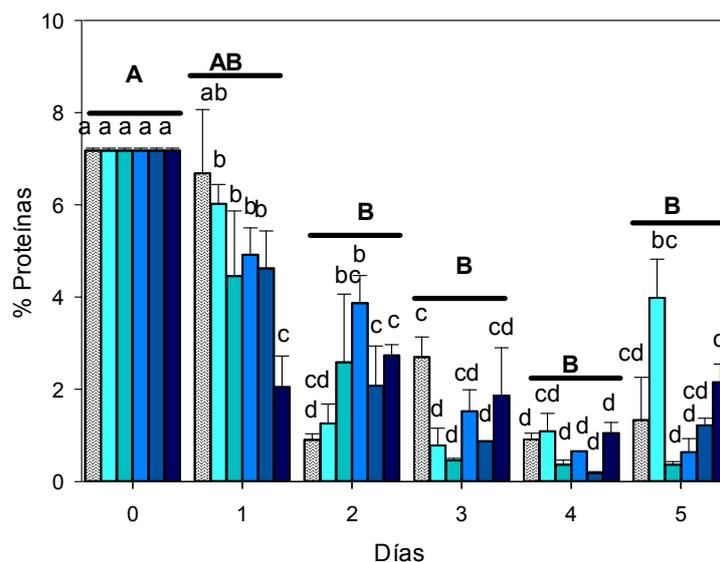
### 3.2.1 Enriquecimiento con altas concentraciones de nutrientes en discos de *M. pyrifera*

#### 3.2.1.1 Composición proximal

##### 3.2.1.1.1 Proteínas

El enriquecimiento con altas concentraciones de nitrógeno y fósforo mostró cambios en la composición orgánica de las láminas de *M. pyrifera* (Figura 20). El porcentaje de proteínas entre los diferentes tiempos de enriquecimiento así como entre los tratamientos fue diferente significativamente ( $P > 0.05$ ). A través del tiempo se observó una disminución con respecto al día cero para *M. pyrifera* sin enriquecer. La disminución del porcentaje de proteínas se observó a partir del primer día de enriquecimiento, sin embargo no se encontraron diferencias significativas hasta el día dos. Durante el tercer día de enriquecimiento se observó la descomposición de los discos en los sistemas experimentales con nutrientes, por lo que a partir del día tres los resultados son poco confiables debido a que durante la toma de muestra para los diferentes análisis de composición se pudieron haber recolectado más o menos de un disco por muestra. Por tal motivo las diferencias encontradas entre especies después del día tres son

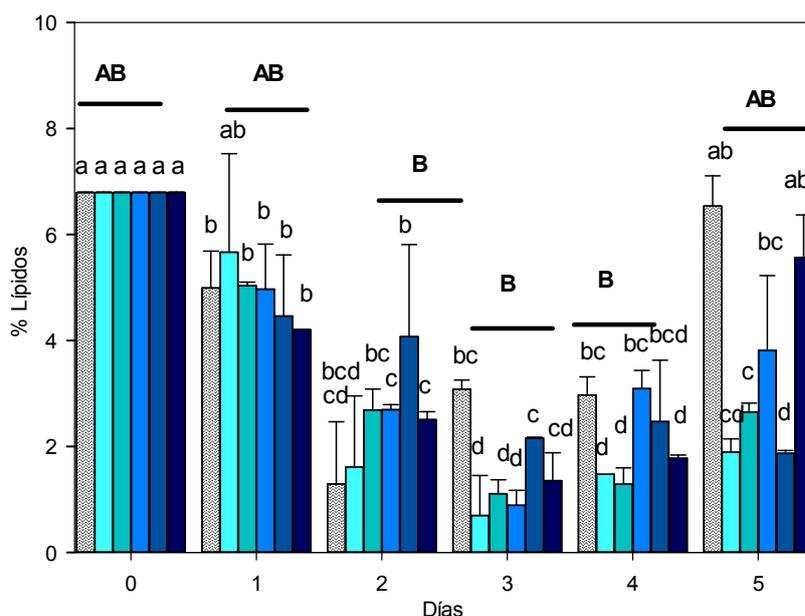
despreciables. En el primer día de enriquecimiento podemos observar que el porcentaje de proteínas disminuye gradualmente con el aumento de la concentración de nitrógeno y fósforo mientras que el tratamiento control se mantiene. El menor porcentaje de proteínas resultó al enriquecer los discos de *M. pyrifera* con la concentración 1:06 M (2.0%) con respecto al el tratamiento control (6.7%) y los demás enriquecimientos (4.5% - 6.0%).



**Figura 20.** Valores promedio en porcentaje de proteínas con base en la biomasa en peso seco de láminas de *Macrocyctis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentración de nutrientes (N:P): 22:1.37 mM (■), 44:2.75 mM (■), 66:4.12 mM (■), 88:5.5 mM (■), 1:0.06 M (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras minúsculas denotan diferencias entre tratamientos y mayúsculas por el tiempo, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c > d$ ,  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ ).

### 3.2.1.1.2 Lípidos

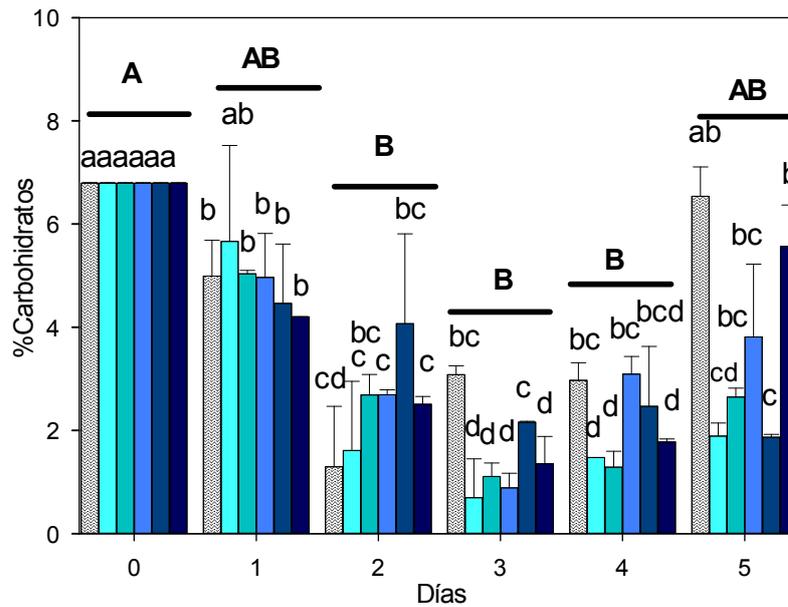
El porcentaje de lípidos también se vio afectado por la descomposición de los discos y el error en el muestreo por la toma de más de un disco de *M. pyrifera* como se menciona en la sección 3.2.1.1.2, sin embargo durante el primero y segundo día se pudo observar una tendencia similar a lo obtenido en el análisis del porcentaje de proteínas, la disminución del porcentaje de lípidos la cual fue menor significativamente con respecto a las macroalgas sin enriquecer ( $P < 0.05$ ) (Figura 21). La concentración 1:06 M volvió a generar el menor porcentaje de lípidos (4.6%) en los discos de *M. pyrifera*, sin embargo no fue diferente significativamente en comparación con las demás concentraciones de nutrientes ( $P > 0.05$ ), mientras que si fue diferente con respecto a *M. pyrifera* sin enriquecer (12%) ( $P < 0.05$ ).



**Figura 21.** Valores promedio en porcentaje de lípidos con base en la biomasa en peso seco de láminas de *Macrocyctis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentración de nutrientes (N:P): 22:1.37 mM (■), 44:2.75 mM (■), 66:4.12 mM (■), 88:5.5 mM (■), 1:0.06 M (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras minúsculas denotan diferencias entre tratamientos y mayúsculas por el tiempo, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c > d$ ,  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ ).

### 3.2.1.1.3 Carbohidratos

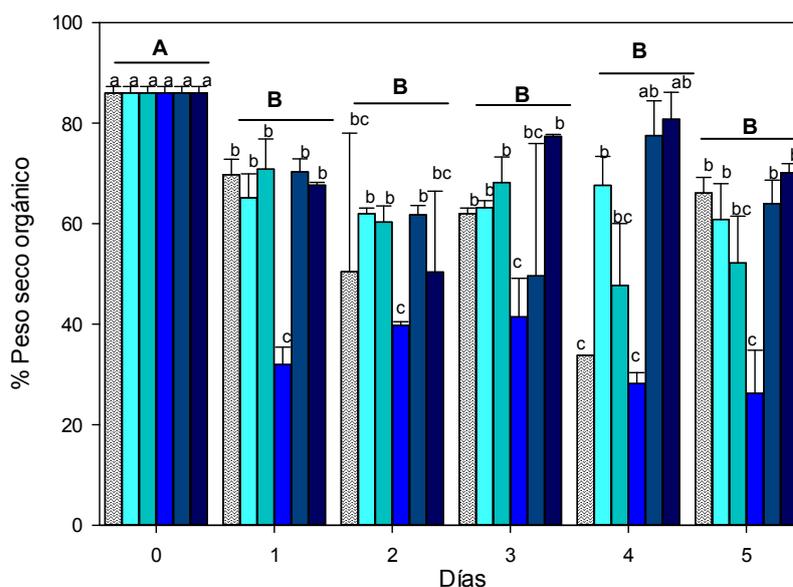
El análisis de carbohidratos con los diferentes tratamientos en los discos de *M. pyrifera* mostró tendencias similares a las observadas en los resultados de proteínas y lípidos, disminuyendo significativamente ( $P < 0.05$ ) al primer día de enriquecimiento con respecto al día cero (Figura 22). Como se mencionó en la sección 3.2.1.1.3 las muestras tomadas a partir del día tres son poco confiable, por lo que solo se describirá el porcentaje de carbohidratos observados en el día cero, uno y dos. El menor porcentaje se observó con la concentración 1:06 M (4.2%) en el día uno y con las concentraciones 44:2.75 mM (2.7%), 66:4.12 mM (2.7%) y 1:06 M (2.5%) en día dos con respecto a los discos sin enriquecer (6.8%).



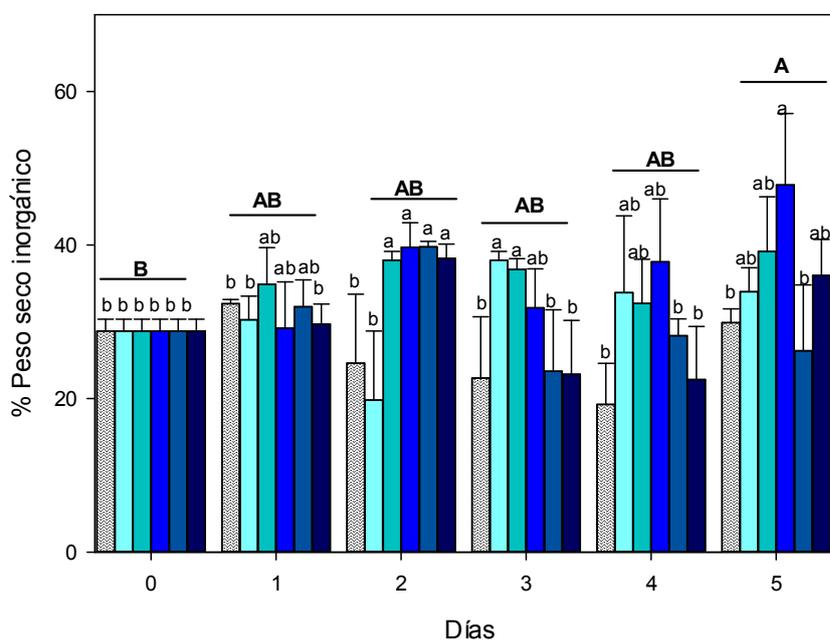
**Figura 22.** Valores promedio en porcentaje de carbohidratos con base en la biomasa en peso seco de láminas de *Macrocyctis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentración de nutrientes (N:P): 22:1.37 mM (■), 44:2.75 mM (■), 66:4.12 mM (■), 88:5.5 mM (■), 1:0.06 M (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras minúsculas denotan diferencias entre tratamientos y mayúsculas por el tiempo, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c > d$ ,  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ ).

#### 3.2.1.1.4 Biomasa en peso

El porcentaje de biomasa orgánica mostró un cambio posterior al primer día de enriquecimiento, este cambio fue diferente significativamente a los discos de *M. pyrifera* sin enriquecer ( $P < 0.05$ ) (Figura 23). Cabe mencionar que la descomposición de los discos también afectó la toma de muestra de los análisis de biomasa en peso como se narra en los anteriores análisis, por lo que solamente se describirán los primeros dos días de enriquecimiento. El primer y segundo día de enriquecimiento se puede observar una disminución del porcentaje de biomasa orgánica, el tratamiento que generó menor porcentaje de biomasa orgánica fue la concentración 66:4.12 M (35.2% - 40.9%) con respecto a los demás tratamientos y los discos sin enriquecer en el día cero (85.9%). En contraparte, la biomasa inorgánica de los discos de *M. pyrifera* enriquecidos resultó en aumento con el paso de los días observando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con las concentraciones de nutrientes utilizadas a partir del día dos respecto al día cero (Figura 24). El menor porcentaje de biomasa inorgánica se observó con el tratamiento control de agua de mar (25.2% - 30.1%) y con los discos sin enriquecer (28.2%) y por otro lado el mayor porcentaje resultó con los enriquecimientos con nutrientes (44:2.75 mM, 66:4.12 mM, 88:5.5 mM y 1:0.06 M).



**Figura 23.** Valores promedio en porcentaje de peso seco orgánico con base en la biomasa total seca de láminas de *Macrocyctis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentración de nutrientes (N:P): 22:1.37 mM (■), 44:2.75 mM (■), 66:4.12 mM (■), 88:5.5 mM (■), 1:0.06 M (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras minúsculas denotan diferencias entre tratamientos y mayúsculas por el tiempo, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$ ,  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ ).



**Figura 24.** Valores promedio en porcentaje de peso seco inorgánico con base en la biomasa total seca de láminas de *Macrocyctis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentración de nutrientes (N:P): 22:1.37 mM (■), 44:2.75 mM (■), 66:4.12 mM (■), 88:5.5 mM (■), 1:0.06 M (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras minúsculas denotan diferencias entre tratamientos y mayúsculas por el tiempo, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b$ ,  $A > B$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 2$ ).

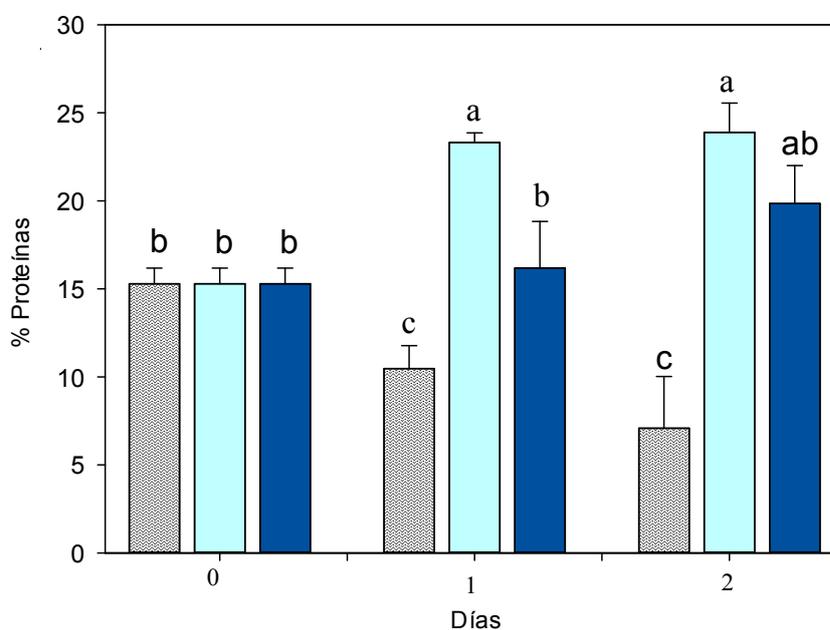
### 3.2.2 Enriquecimiento con bajas concentraciones de nutrientes en láminas de *M. pyrifera*

Con base en los resultados del análisis de la composición proximal con altas proporciones de N:P, se seleccionaron concentraciones menores a las utilizadas y descritas en la sección 3.2, ya que todas causaron un efecto negativo en la integridad de los discos de *M. pyrifera* y decremento de la composición proximal. Las relaciones de N:P seleccionadas para el enriquecimiento a escala semimasiva en láminas de *M. pyrifera* fueron 14:0.87  $\mu\text{M}$  y 200:12.05  $\mu\text{M}$ .

#### 3.2.2.1 Composición proximal

##### 3.2.2.1.1 Proteínas

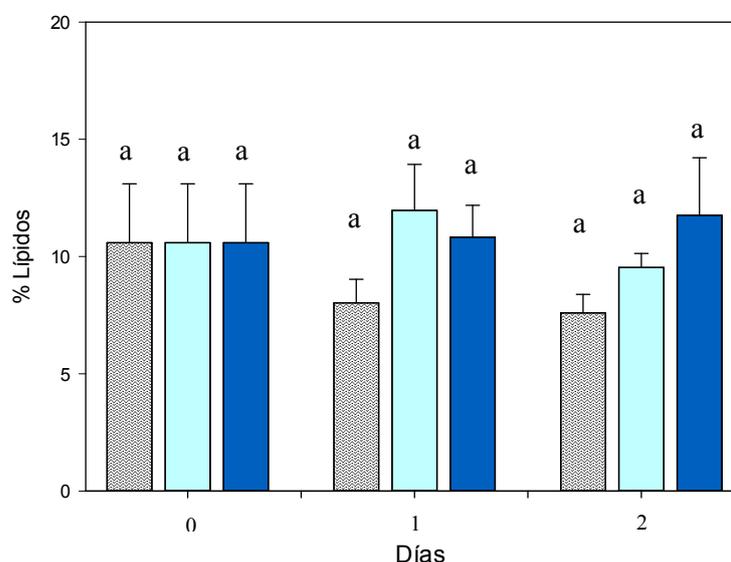
En los ensayos con bajas concentraciones de nutrientes los resultados fueron positivos para ciertos componentes orgánicos como las proteínas, generando un aumento significativo en el porcentaje con las concentraciones utilizadas para el enriquecimiento con respecto al tratamiento control y a las láminas sin enriquecer en el día cero ( $P < 0.05$ ) (Figura 25); sin embargo, no se encontraron diferencias por efecto del tiempo de enriquecimiento ( $P > 0.05$ ). El tratamiento que generó un mayor porcentaje de proteínas fue con la relación de 14:0.87  $\mu\text{M}$  (23.0%) ( $P < 0.05$ ). El menor porcentaje de proteínas se observó con el tratamiento control (10.5% - 5.0%).



**Figura 25.** Valores promedio en porcentaje de proteínas con base en la biomasa en peso seco de láminas de *Macrocystis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentración de nutrientes (N:P): 14:0.87  $\mu\text{M}$  (■), 200:12.05  $\mu\text{M}$  (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (▨) mantenidos en cultivos estáticos. Letras diferentes denotan diferencias entre tratamientos, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c > d$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 3$ ).

### 3.2.2.1.2 Lípidos

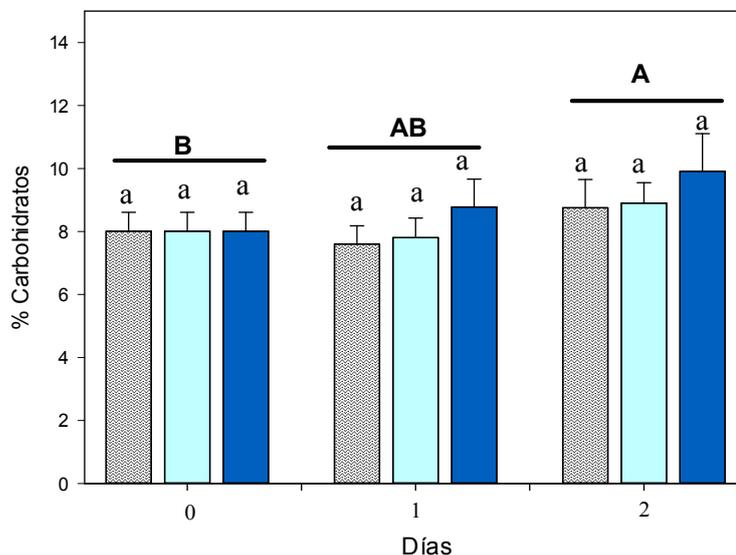
El enriquecimiento con las dos diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo no propició un cambio significativo entre los tratamientos ni entre los tiempos de enriquecimiento ( $P > 0.05$ ), sin embargo se puede observar una ligera disminución del porcentaje de lípidos en el tratamiento control pero debido a la desviación estándar esta disminución no es significativa estadísticamente ( $P > 0.05$ ) (Figura 26). El porcentaje de lípidos se mantuvo en un rango de 7.6% a 10.6% entre los diferentes tratamientos y tiempos de enriquecimiento.



**Figura 26.** Valores promedio en porcentaje de lípidos con base en la biomasa en peso seco de láminas de *Macrocyctis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentración de nutrientes (N:P): 14:0.87 μM (■), 200:12.05 μM (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (▨) mantenidos en cultivos estáticos. Letras diferentes denotan diferencias entre tratamientos, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 3$ ).

### 3.2.2.1.3 Carbohidratos

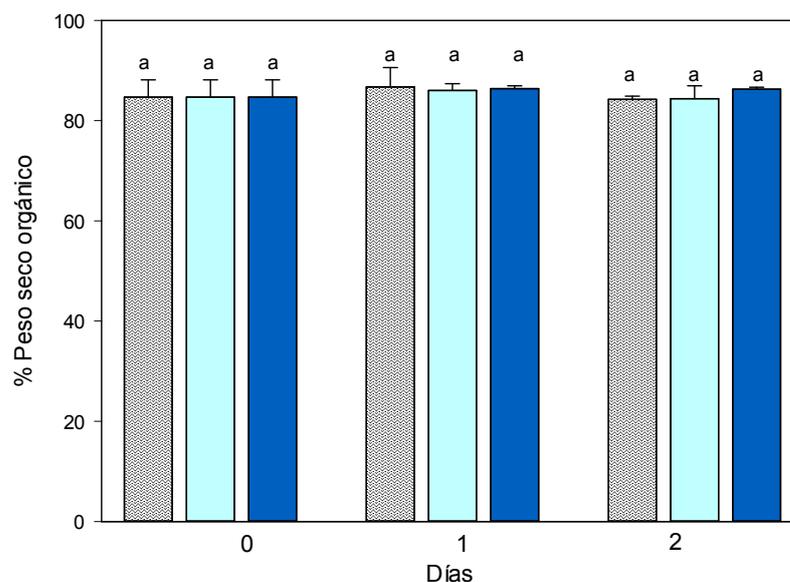
Los enriquecimientos con nitrógeno y fósforo en las láminas de *M. pyrifera* no promovieron un cambio significativo por el efecto del enriquecimiento en el porcentaje de carbohidratos ( $P > 0.05$ ) debido a las desviaciones estándar, el porcentaje de carbohidratos no presentó diferencias entra las concentraciones de nutrientes ni con el tratamiento control, por otro lado se pudo observar un cambio significativo por efecto del tiempo de enriquecimiento, el cual fue mayor en el tercer día con respecto al día cero de las láminas de *M. pyrifera* sin enriquecer ( $P < 0.05$ ) (Figura 27).



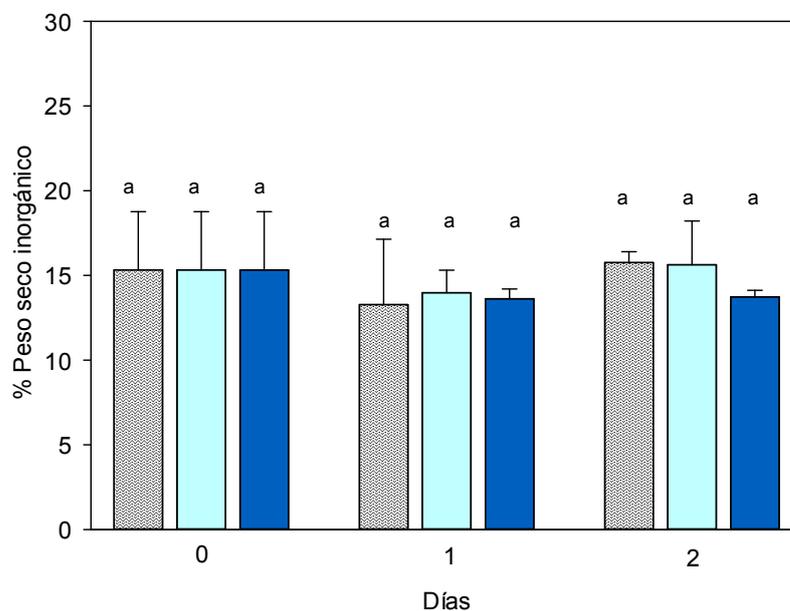
**Figura 27.** Valores promedio en porcentaje de carbohidratos con base en la biomasa en peso seco de láminas de *Macrocyctis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentración de nutrientes (N:P): 14:0.87  $\mu\text{M}$  (■), 200:12.05  $\mu\text{M}$  (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (▨) mantenidos en cultivos estáticos. Letras minúsculas denotan diferencias entre tratamientos y mayúsculas entre tiempos, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ; A > B. Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 3$ ).

#### 3.2.2.1.4 Biomasa en peso

Los enriquecimientos con nutrientes a escala semimasiva con láminas de *M. pyrifera* con la adición de bajas concentraciones de nitrógeno y fósforo, no mostraron cambios por efecto de los enriquecimientos en el balance de biomasa orgánica e inorgánica, tanto la biomasa orgánica (Figura 28) como la inorgánica (Figura 29) se mantuvieron en porcentajes similares a través del tiempo. Estos porcentajes fueron entre 84.4% - 87.7% de biomasa orgánica y entre 13.6% -15.7% de biomasa inorgánica.



**Figura 28.** Valores promedio en porcentaje de orgánico con base en la biomasa total en peso seco de láminas de *Macrocyctis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentración de nutrientes (N:P): 14:0.87  $\mu\text{M}$  (■), 200:12.05  $\mu\text{M}$  (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras diferentes denotan diferencias entre tratamientos, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 3$ ).



**Figura 29.** Valores promedio en porcentaje de inorgánico con base en la biomasa total en peso seco de láminas de *Macrocyctis pyrifera* enriquecidas con diferentes concentración de nutrientes (N:P): 14:0.87  $\mu\text{M}$  (■), 200:12.05  $\mu\text{M}$  (■) comparados con un tratamiento control con discos de *M. pyrifera* y agua de mar (■) mantenidos en cultivos estáticos. Letras diferentes denotan diferencias entre tratamientos, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ . Barras verticales indican la desviación estándar ( $n = 3$ ).

### 3.3 Bioensayo con juveniles de abulón rojo alimentados con *M. pyrifera* enriquecida

#### 3.3.1 Calidad del agua

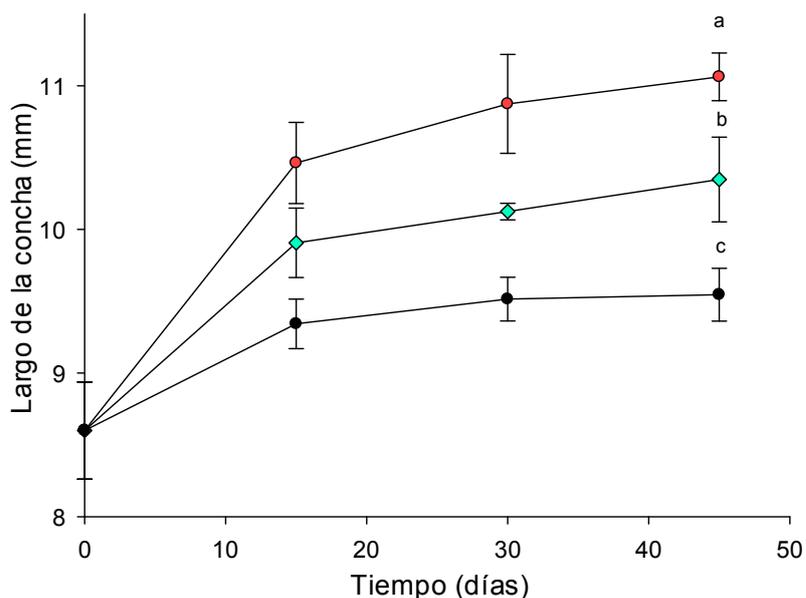
La calidad del agua se evaluó cada segundo día junto con el cambio de alimento de los cultivos de abulón, el oxígeno disuelto se mantuvo en valores promedio de  $7.5 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ , la temperatura en  $17.7 \pm 0.3 \text{ }^\circ\text{C}$ , la salinidad en  $35 \pm 0.1 \text{ UPS}$ , el pH en  $8 \pm 0.3$ , la alcalinidad en  $190 \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$ . La concentración de nitratos, nitritos y amonio se mantuvo en  $0 \text{ mg L}^{-1}$  para cada caso y sin cambio durante todo el experimento.

#### 3.3.2 Crecimiento en términos de talla

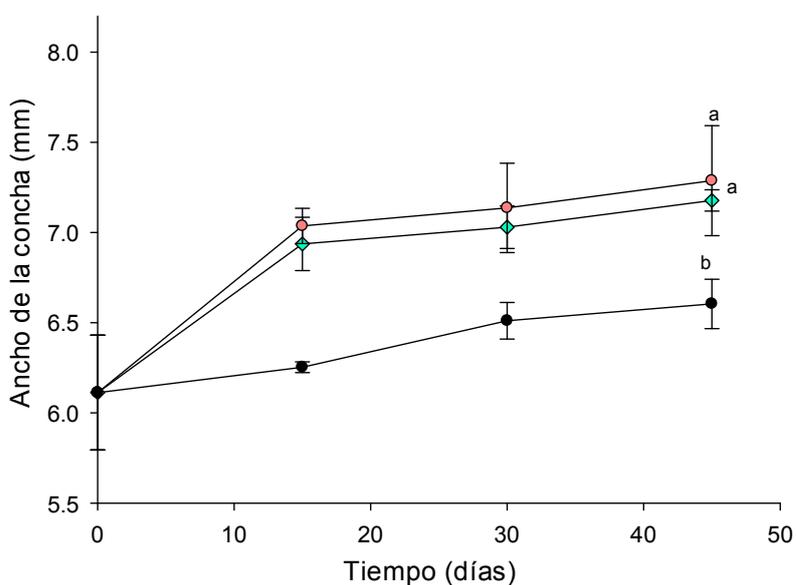
Para determinar el crecimiento de los abulones en cultivo por efecto de los tratamientos se evaluó cada 15 días el tamaño de la concha a lo largo y ancho. Entre los resultados de estas mediciones se encontraron diferencias significativas en la longitud de la concha de los juveniles de abulón por efecto de los tratamientos de alimentación y por el tiempo de medición ( $P < 0.05$ ) (Figura 30). Los abulones alimentados con el tratamiento de *M. pyrifera* enriquecidas con *G. marina* presentaron una longitud de concha significativamente mayor en todas las fechas de medición ( $P < 0.05$ ). El menor incremento del largo de la concha fue con el tratamiento control (*M. pyrifera* sin enriquecimiento) (Figura 30).

Se encontró un cambio significativo en el ancho de la concha de los abulones por efecto del tipo de alimento, este cambio fue diferente significativamente entre los tres tratamientos ( $P < 0.05$ ). Los mayores valores del ancho de la concha fueron para los dos tratamientos de enriquecimiento de *M. pyrifera* (adicionando *G. marina* y nutrientes) (Figura 31). El tratamiento con el menor incremento del ancho de la concha fue con el tratamiento control (*M. pyrifera* sin enriquecimiento) (Figura 31).

En el tratamiento control no se encontró diferencias significativas con el ancho de la concha respecto a los valores iniciales en los primeros 30 días del experimento ( $P > 0.05$ ), posteriormente se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) (45 días).



**Figura 30.** Valores promedio del largo (mm) de la concha de juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) alimentados con *Macrocytis pyrifera* enriquecida con *Grammatophora marina* (—●—), enriquecida nitrógeno y fósforo 200:12.05  $\mu\text{M}$  (—◆—) y *M. pyrifera* sin enriquecer (—●—) como tratamiento control. Las barras verticales indican la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$ .

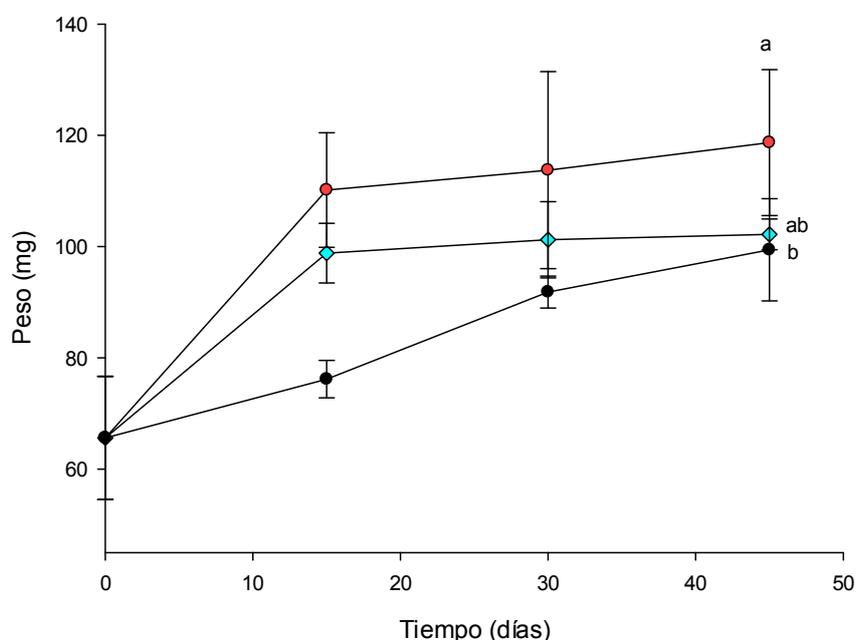


**Figura 31.** Valores promedio del ancho (mm) de la concha de juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) alimentados con *Macrocytis pyrifera* enriquecida con *Grammatophora marina* (—●—), enriquecida nitrógeno y fósforo 200:12.05  $\mu\text{M}$  (—◆—) y *M. pyrifera* sin enriquecer (—●—) como tratamiento control. Las barras verticales indican la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b$ .

### 3.3.3 Crecimiento en términos de peso

El crecimiento en términos de peso presentó diferencias significativas durante el periodo de cultivo ( $P < 0.05$ ) (Figura 32). Los organismos alimentados de láminas de *M. pyrifera* enriquecidas con la diatomea *G. marina* presentaron diferencias significativas respecto a los otros dos tratamientos, sin embargo estas diferencias fueron solamente en el día 15 y 30.

Al finalizar el ensayo el valor promedio indica que el tratamiento con mayor efecto en el peso de los organismos fue el enriquecimiento de *M. pyrifera* con *G. marina*, sin embargo, los pesos de los tres tratamientos no fueron diferentes significativamente al final del ensayo ( $P > 0.05$ ).



**Figura 32.** Valores promedio del peso de juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) alimentados con *Macrocystis pyrifera* enriquecida con *Grammatophora marina* (—●—), enriquecida con una razón de nitrógeno y fósforo de 200:12.05  $\mu\text{M}$  (—◆—) y *M. pyrifera* sin enriquecer (—●—) como tratamiento control. Las barras verticales indican la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ; a > b.

### 3.3.4 Peso ganado

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de peso ganado en los diferentes tratamientos ( $P > 0.05$ ) (Tabla 7). El mayor peso ganado se observó con el tratamiento de enriquecimiento de *M. pyrifera* con *G. marina* (180.9%), mientras que los menores valores fueron para el enriquecimiento de *M. pyrifera* con nutrientes (155.8%) y en tratamiento control del alga sin enriquecer (151.6%) los cuales no presentaron diferencias significativas.

### 3.3.5 Tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento diaria en términos del largo de la concha mostró ser diferente significativamente para los tres periodos de medición entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ) (Tabla 8). La mayor tasa de crecimiento en función del largo de la concha y para los tres periodos de evaluación fue con el tratamiento de enriquecimiento de *M. pyrifera* con *G. marina* ( $P < 0.05$ ). La menor tasa de crecimiento se observó con el tratamiento control.

En el análisis de la tasa de crecimiento diario referente a lo largo de la concha de los abulones en cultivo presentó diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ) (Tabla 8). Sin embargo, estas diferencias solo se obtuvieron con el tratamiento control en comparación con ambos tratamientos de alimentación con macroalgas enriquecidas.

La tasa de conversión alimenticia (TCA) mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tres tratamientos. El tratamiento control fue el que presentó la mayor TCA ( $P < 0.05$ ), el tratamiento con menor TCA que fue significativamente diferente con los demás tratamientos ( $P < 0.05$ ) fue en el que se enriqueció a *M. pyrifera* con *G. marina*.

Se observaron diferencias significativas en el índice de eficiencia proteica (TEP) ( $P < 0.05$ ) (Tabla 9), los tratamientos con la menor TEP fueron el tratamiento control y el tratamiento de enriquecimiento de *M. pyrifera* con nutrientes, mientras que el mayor índice de TEP fue para el tratamiento con el enriquecimiento de *M. pyrifera* con *G. marina* (Tabla 9). La tasa de crecimiento diaria en términos de peso presentó diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ) (Tabla 8). De igual forma a lo descrito para las otras variables del crecimiento.

El contenido energético en los tres tratamientos presentó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). El mayor contenido energético se presentó en el tratamiento en donde los abulones se alimentaron con *M. pyrifera*

enriquecida con *G. marina* ( $P < 0.05$ ) estas diferencias se presentaron de forma similar en la relación proteína/energía (P/E) ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 7.** Valores promedio del peso inicial, final y ganancia en peso (mg) de juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) alimentados con *Macrocystis pyrifera* enriquecida con *Grammatophora marina* (M + G), enriquecida con una razón de nitrógeno y fósforo de 200:12.05  $\mu\text{M}$  (M + NP) y *M. pyrifera* sin enriquecer (M) como tratamiento control. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b$ .

| Tratamiento | Peso (mg)         |                                 |                     |
|-------------|-------------------|---------------------------------|---------------------|
|             | Inicial           | Final                           | Ganancia (%)        |
| M+NP        | 65.60 $\pm$ 11.07 | 102.21 $\pm$ 2.75 <sup>b</sup>  | 155.80 <sup>b</sup> |
| M+G         | 65.60 $\pm$ 11.07 | 118.69 $\pm$ 13.11 <sup>a</sup> | 180.92 <sup>a</sup> |
| M           | 65.60 $\pm$ 11.07 | 99.43 $\pm$ 9.18 <sup>b</sup>   | 151.57 <sup>b</sup> |

**Tabla 8.** Valores promedio de las tasas de crecimiento (TC) en términos de longitud ( $\mu\text{m día}^{-1}$ ) y peso ( $\mu\text{g día}^{-1}$ ) de juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en los tres tiempos de medición alimentados con *Macrocystis pyrifera* enriquecida con *Grammatophora marina* (M + G), enriquecida con una razón de nitrógeno y fósforo de 200:12.05  $\mu\text{M}$  (M + NP) y *M. pyrifera* sin enriquecer (M) como tratamiento control. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c$ .

| Tiempo | TC                               | Tratamientos de alimentación   |                                 |                                |
|--------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
|        |                                  | M + NP                         | M + G                           | M                              |
| 0 - 15 | Largo ( $\mu\text{m día}^{-1}$ ) | 87.11 $\pm$ 16.09 <sup>b</sup> | 124.17 $\pm$ 18.82 <sup>a</sup> | 49.53 $\pm$ 11.50 <sup>c</sup> |
|        | Ancho ( $\mu\text{m día}^{-1}$ ) | 54.96 $\pm$ 14.08 <sup>a</sup> | 62.05 $\pm$ 6.38 <sup>a</sup>   | 9.37 $\pm$ 1.99 <sup>b</sup>   |
|        | Peso ( $\text{mg día}^{-1}$ )    | 2.21 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>   | 2.82 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>    | 0.70 $\pm$ 0.22 <sup>c</sup>   |
| 0 - 30 | Largo ( $\mu\text{m día}^{-1}$ ) | 50.80 $\pm$ 1.93 <sup>b</sup>  | 75.79 $\pm$ 11.48 <sup>a</sup>  | 30.51 $\pm$ 5.07 <sup>c</sup>  |
|        | Ancho ( $\mu\text{m día}^{-1}$ ) | 30.27 $\pm$ 5.68 <sup>a</sup>  | 33.39 $\pm$ 9.22 <sup>a</sup>   | 13.27 $\pm$ 3.38 <sup>b</sup>  |
|        | Peso ( $\text{mg día}^{-1}$ )    | 1.18 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>  | 1.58 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>    | 0.87 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>   |
| 0 - 45 | Largo ( $\mu\text{m día}^{-1}$ ) | 39.45 $\pm$ 6.63 <sup>b</sup>  | 54.67 $\pm$ 3.91 <sup>a</sup>   | 20.68 $\pm$ 4.18 <sup>c</sup>  |
|        | Ancho ( $\mu\text{m día}^{-1}$ ) | 23.67 $\pm$ 1.39 <sup>a</sup>  | 26.43 $\pm$ 7.11 <sup>a</sup>   | 11.29 $\pm$ 2.98 <sup>b</sup>  |
|        | Peso ( $\text{mg día}^{-1}$ )    | 0.81 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>   | 1.17 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>    | 0.76 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>   |

**Tabla 9.** Valores promedio de diversos índices de retención y composición proximal del alimento suministrado a juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) alimentados con *Macrocystis pyrifera* enriquecida con *Grammatophora marina* (M + G), enriquecida con una razón de nitrógeno y fósforo de 200:12.05  $\mu\text{M}$  (M + NP) y *M. pyrifera* sin enriquecer (M) como tratamiento control. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha=0.05$ ;  $a>b>c$ .

|   | Tratamientos con <i>M. pyrifera</i> |                           |                           |
|---|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
|   | M + NP                              | M + G                     | M                         |
| TEC (% día <sup>-1</sup> )                    | 0.98 ± 0.03 <sup>b</sup>            | 1.30 ± 0.23 <sup>a</sup>  | 0.92 ± 0.01 <sup>c</sup>  |
| TCA (g día <sup>-1</sup> )                    | 10.56 ± 0.48 <sup>b</sup>           | 2.20 ± 0.28 <sup>c</sup>  | 16.72 ± 0.78 <sup>a</sup> |
| TEP   | 0.36 ± 0.01 <sup>b</sup>            | 1.03 ± 0.09 <sup>a</sup>  | 0.38 ± 0.01 <sup>b</sup>  |
| Composición proximal                          |                                     |                           |                           |
| Proteínas (%)                                 | 19.84 ± 2.15 <sup>b</sup>           | 33.91 ± 5.94 <sup>a</sup> | 15.28 ± 0.89 <sup>b</sup> |
| Lípidos (%)                                   | 11.75 ± 2.45 <sup>b</sup>           | 18.65 ± 5.94 <sup>a</sup> | 8.36 ± 0.51 <sup>b</sup>  |
| Carbohidratos (%)                             | 9.90 ± 1.20 <sup>a</sup>            | 11.08 ± 2.45 <sup>a</sup> | 8.00 ± 0.60 <sup>a</sup>  |
| PSI (%)                                       | 16.39 ± 0.39 <sup>a</sup>           | 14.02 ± 0.83 <sup>b</sup> | 12.43 ± 0.64 <sup>b</sup> |
| Energía total teórica (kcal g <sup>-1</sup> ) | 2.66 ± 0.36 <sup>b</sup>            | 4.26 ± 0.72 <sup>a</sup>  | 2.10 ± 0.03 <sup>b</sup>  |
| P/E (mg de proteína kcal <sup>-1</sup> )      | 41.75 ± 1.37 <sup>ab</sup>          | 44.51 ± 1.44 <sup>a</sup> | 39.55 ± 2.13 <sup>b</sup> |

TEC%: Tasa específica de crecimiento; TCA: Tasa de conversión alimenticia; TEP: Tasa de eficiencia proteica; PSI%: Peso seco inorgánico P/E: Relación proteína /energía expresada en mg de proteína kcal<sup>-1</sup> de peso seco.

### 3.3.6 Supervivencia

Los valores de supervivencia mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ) (Tabla 10). El mayor porcentaje de supervivencia se observó con los organismos alimentados con el tratamiento de *M. pyrifera* enriquecida con *G. marina* ( $P < 0.05$ ).

### 3.3.7 Presencia de bacterias tipo *Vibrio* spp.

El número de UFC presentes en los primeros días de cultivo fue el mismo para los tres tratamientos ya que se partió de un mismo lote de organismos que fue repartido en los tratamientos, la concentración de bacterias tipo *Vibrio* fue  $2.3 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>. A partir del día 15 de cultivo se encontraron concentraciones inferiores a las iniciales y que se realizaron los recambios de agua tratada por clorinación y también a que se mantuvo un control de la temperatura por medio de un sistema de enfriamiento del agua de mar (17 °C).

Al término del experimento la concentración de las bacterias tipo *Vibrio* spp. disminuyó para todos los casos (Tabla 11).

**Tabla 10.** Valores del porcentaje de supervivencia promedio, máximo y mínimo de los juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) alimentados con *Macrocystis pyrifera* enriquecida con *Grammatophora marina* (M + G), enriquecida con una razón de nitrógeno y fósforo de 200:12.05  $\mu\text{M}$  (M + NP) y *M. pyrifera* sin enriquecer (M) como tratamiento control. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha=0.05$ ;  $a>b$ .

| Tratamiento | Porcentaje de supervivencia |        |        |
|-------------|-----------------------------|--------|--------|
|             | Promedio                    | Máximo | Mínimo |
| M + NP      | 91.45 <sup>b</sup>          | 92.31  | 89.74  |
| M + G       | 98.29 <sup>a</sup>          | 100.00 | 94.87  |
| M           | 92.19 <sup>b</sup>          | 90.70  | 93.02  |

**Tabla 11.** Valores de las unidades formadoras de colonias (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) en los sistemas de mantenimiento de juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) alimentados con *Macrocystis pyrifera* enriquecida con *Grammatophora marina* (M + G), enriquecida con una razón de nitrógeno y fósforo de 200:12.05  $\mu\text{M}$  (M + NP) y *M. pyrifera* sin enriquecer (M) como tratamiento control.

| Tiempo (días) | UFC $\text{mL}^{-1}$ |                   |                   |
|---------------|----------------------|-------------------|-------------------|
|               | M + NP               | M + G             | M                 |
| 0             | $2.3 \times 10^5$    | $2.3 \times 10^5$ | $2.3 \times 10^5$ |
| 15            | $5.3 \times 10^4$    | $5.5 \times 10^4$ | $4.1 \times 10^4$ |
| 30            | $1.3 \times 10^4$    | $3.2 \times 10^4$ | $2.4 \times 10^4$ |
| 45            | $1.1 \times 10^4$    | $1.7 \times 10^4$ | $1.3 \times 10^4$ |

En resumen las láminas de *M. pyrifera* enriquecidas con bajas concentraciones de nutrientes y microalgas presentaron un mayor valor nutrimental que las láminas sin enriquecer, por lo que los abulones alimentados con las macroalgas enriquecidas por los dos tratamientos (con bajas concentraciones de nutrientes (N:P de 200:5.12  $\mu\text{M}$ ) y con células epifitas con *G. marina*), tuvieron un mayor incremento en peso y talla en comparación con los abulones alimentados con macroalgas sin enriquecer, debido a lo anterior no se rechaza la hipótesis nula de este trabajo de investigación.

## Capítulo 4. Discusión

---

### 4.1 Epifitación de *M. pyrifera* con microalgas

En este trabajo se utilizaron 8 especies de microalgas de diferentes clases en su mayoría bacilariofíceas y cianofíceas, una característica importante por destacar es que 7 de las especies usadas fueron epifitas aisladas de *M. pyrifera*. Siqueiros-Beltrones y Voltolina (2000) mencionan que el tipo de sustrato del que las microalgas sean aisladas influye directamente en su grado de adhesión. *M. pyrifera* habita en ambientes rocosos en zonas costeras con oleaje (Foster y Schiel, 1985).

Los mantos de *M. pyrifera* son uno de los principales productores primarios marinos que constituyen un sustrato favorable para propiciar una gran diversidad de organismos como algas coralinas, briozoarios, hidrozoarios, poliquetos, crustáceos y muchas especies de microalgas; la abundancia de estos organismos epifitos parece estar relacionada con la madurez de las frondas de *M. pyrifera* (Foster y Schiel, 1985). Es por ello que las comunidades asociadas a las láminas de *M. pyrifera* pueden llegar a tener una importante contribución en la calidad nutricional de la macroalga (Siqueiros-Beltrones *et al.*, 2004); por tal motivo, al enriquecer selectivamente con una especie de microalga sería posible tener mayor control en la composición nutricional (Simental *et al.*, 2004).

En esta investigación, los resultados del primer ensayo de enriquecimiento de *M. pyrifera* con 8 especies de microalgas demostraron que todas las especies tuvieron la capacidad para crecer, reproducirse y epifitar a los discos y láminas de *M. pyrifera* (Figura 8 y 14). En todos los tratamientos, la densidad de las células epifitas en los ensayos en discos y en láminas de *M. pyrifera* fueron mayores que las reportadas por Simental *et al.* (2004) quien experimentó la epifitación selectiva en láminas de *M. pyrifera* con la diatomea *Navicula incerta* (Tabla 12). Con el propósito de comparar los resultados de este trabajo respecto a otros disponibles en literatura, la densidad de células epifitas por mililitro se transformó a células por mm<sup>2</sup>. Simental *et al.* (2004) reportó para *M. pyrifera* enriquecida selectivamente con *N. incerta* densidades de 462.77 células por mm<sup>2</sup> al cuarto día de enriquecimiento (Tabla 12). En esta investigación con *Navicula sp.*, se logró obtener una densidad de células epifitas de 7 092.32 cél mm<sup>2</sup> en *M. pyrifera* al día 4 de enriquecimiento (Tabla 12). Estos valores de epifitación con *Navicula sp.* corresponden a casi 10 órdenes de magnitud superior a los reportados por Simental *et al.* (2004). Cabe mencionar que la especie *N. incerta* utilizada en los ensayos realizados por Simental *et al.* (2004) no está reconocida como una diatomea naturalmente epifita en las comunidades asociadas a las láminas de *M. pyrifera* pertenecientes a Baja

California, México (Argumedo-Hernández *et al.*, 2008; Siqueiros-Beltrones *et al.*, 2002). Por otro lado, Porta-Vales (2009) menciona que una de las variables que afecta el crecimiento evaluado como incremento en la densidad celular en cultivos, es la cantidad de células en el inóculo, una variable que no se consideró en este trabajo ni en la investigación de Simental *et al.* (2004) siendo menores los inóculos con los que Simental *et al.* (2004) realizó sus enriquecimientos, por consiguiente las diferencias observadas entre esta investigación con respecto al trabajo de Simental *et al.* (2004) pudieron estar relacionadas con la cantidad de células en el inóculo y la procedencia de las especies.

Los mayores resultados de células epifitas por mm<sup>2</sup> en discos y en láminas de *M. pyrifera* en este trabajo correspondieron a el enriquecimiento con la cianobacteria *Phormidium* sp. con 8 443.3 cél mm<sup>-2</sup> en discos y 222 504.5 cél mm<sup>-2</sup> en láminas (Tabla 12), este resultado está asociado a las altas tasas de crecimiento (Tabla 5 y 6) que se relacionan con el tamaño celular de esta especie 1.27 µm x 2.26 µm (Jiménez-Valera y Sánchez-Saavedra, 2016).

En relación con la densidad de microalgas epifitas en el medio natural, existen trabajos que describen la densidad celular de diatomeas epifitas en *M. pyrifera* en el medio natural como *Cocconeis* cf. *britannica*, la cual presenta densidad de entre 3 000 a 4 000 células por mm<sup>2</sup> (Siqueiros-Beltrones *et al.*, 2002). En esta investigación los resultados de densidad de células epifitas con las diferentes especies de microalgas resultaron ser mayores a los reportados por Siqueiros-Beltrones *et al.* (2002) con la especie *Cocconeis* cf. *britannica* epifita en el medio natural en *M. pyrifera*. La explicación puede estar relacionada a la disponibilidad de células en el medio natural con respecto a los enriquecimientos en ambientes e inóculos controlados.

La interacción entre los organismos epifitos y macroalgas es debido a que la superficie de las macroalgas en general provee un hábitat rico en materia orgánica, muchos de los metabolitos primarios exudados por las macroalgas son carbohidratos, aminoácidos, péptidos y proteínas, los cuales son estimulantes de la colonización microbiana que a su vez crea un sustrato apropiado para cianobacterias y diatomeas (Qian *et al.*, 2007; Steinberg y Nys, 2002). Las interacciones entre macroalgas y bacterias dependen fundamentalmente de la comunicación celular (Steinberg y Nys, 2002). Se ha observado que las macroalgas pueden reducir o aumentar la cantidad de bacterias epifitas produciendo promotores o inhibidores del censado del cuórum (*Quorum sensing*) bacteriano (Goetze *et al.*, 2010) y por consecuencia reducir o aumentar la biopelícula de la comunidad de bacteria y microalgas. Con base en los resultados obtenidos con el uso de las 8 especies de microalgas que epifitaron *M. pyrifera* se considera que todas tienen una relación positiva simbiótica con la macroalga.

**Tabla 12.** Valores promedio de la densidad de células epifitas por unidad de área en mm<sup>2</sup> para diferentes especies y en distintos días de enriquecimiento en discos y en láminas de *M. pyrifera*.

| Especie                        | Cél. mm <sup>-2</sup> |                   |                      |                     |                      |
|--------------------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
|                                | Inóculo               | Día 1             | Día 2                | Día 3               | Día 4                |
| Simental <i>et al.</i> (2004)  |                       |                   |                      |                     |                      |
| <i>Navicula incerta</i>        | 500*                  | --                | 244.85 ± 51.22       | --                  | 462.77 ± 45.07       |
| En esta investigación:         |                       |                   |                      |                     |                      |
| En discos                      |                       |                   |                      |                     |                      |
| <i>Navicula cf. ulvaceae</i>   | 127 500*              | 4 465.86 ± 187.59 | 2 918.28 ± 125.06    | 2 299.25*           | 5 792.35 ± 62.53     |
| <i>Heterococcus sp.</i>        | 13 750*               | 88.43*            | 353.73*              | 88.43*              | 1 061.19 ± 125.06    |
| <i>Amphora tenerima</i>        | 93 750*               | 486.38 ± 62.53    | 2 608.77 ± 62.53     | 4 333.21*           | 6 720.90 ± 250.12    |
| <i>Phormidium sp.</i>          | 44 375*               | 1 193.84 ± 312.65 | 1 636.00 ± 312.65    | 8 843.29 ± 2 501.26 | 15 033.60 ± 2 501.26 |
| <i>Amphora sp.</i>             | 75 000*               | 2 343.47 ± 187.59 | 2 697.20 ± 62.53     | 3 404.66 ± 62.50    | 4 775.38 ± 125.06    |
| <i>Grammatophora marina</i>    | 29 375*               | 3 802.61 ± 375.18 | 4 377.43 ± 187.59    | 4 996.46 ± 62.53    | 6 632.47 ± 125.06    |
| <i>Komvoporon sp.</i>          | 248 750*              | 4 863.81 ± 250.12 | 5 394.41 ± 125.06    | 5 615.49 ± 687.84   | 6 897.77 ± 500.25    |
| <i>Navicula sp.</i>            | 84 375*               | 3 669.96 ± 312.65 | 6 720.90 ± 250.12    | 5 925.00 ± 125.06   | 7 092.32 ± 25.01     |
| En láminas                     |                       |                   |                      |                     |                      |
| <i>Navicula cf. ulvaceae</i> * | 127 500*              | --                | 11 144.47*           | --                  | 35 512.18*           |
| <i>Komvoporon sp.</i>          | 248 750*              | --                | 12 944.14 ± 383.38   | --                  | 15 686.95 ± 601.01   |
| <i>Phormidium sp.</i>          | 44 375*               | --                | 4 321.13 ± 1 225.50  | --                  | 222 504.52 ± 3341.07 |
| <i>Grammatophora marina</i>    | 29 375*               | --                | 13 271.35 ± 2 168.32 | --                  | 12 511.07 ± 441.02   |

\* Dato único

-- Dato no evaluado

Algunos autores mencionan interacciones benéficas entre epifitos y hospederos; un ejemplo es *Haiophila engelmanni*, un pasto marino que tiene baja tolerancia a la radiación ultravioleta de banda angosta que se ve beneficiado por los organismos epifitos en la superficie de sus hojas, ya que se ha encontrado que la biopelícula de epifitos disminuyen la fotoinhibición causada por los rayos UVB (Trocine *et al.*, 1981).

Harlin (1980) reportó que las corrientes marinas y el movimiento de las hojas convierten a las macrofitas en un sustrato favorable para la colonización, ya que el movimiento causa mayor proximidad a la luz y a los nutrientes disueltos en las corrientes, así como mayor interacción con las especies de microalgas que se encuentran en la columna de agua. Los resultados obtenidos con el uso de las 8 especies de microalgas, muestran que el sustrato preferido por las microalgas fueron las láminas de *M. pyrifera* ya que les permitía tener mayor superficie volumen para la captación de luz y nutrientes con respecto a las células que se utilizaban como sustrato al fondo de los recipientes. La asociación de microalgas y macrofitas, además de comprender procesos físicos, también está sujeta a interacciones bioquímicas; las microalgas epifitas se encuentran vinculadas íntimamente al epitelio del hospedero y afectan su metabolismo (Orth y Montfrans, 1984). Penhale y Thayer (1980) observaron que los nutrientes como el carbono y fósforo consumidos por *Zostera marina* L. son subsecuentemente transferidos por las hojas a las comunidades epifitas en lugar de ser transferidos al agua circulante, convirtiéndose en una importante fuente de nutrientes para las epifitas lo que les permite una mayor tasa de crecimiento y generación de biomasa por los organismos epifitos. Lo anterior, contribuye a explicar las diferencias observadas en las bajas tasas de crecimiento para las algas libres en el medio y los valores mayores obtenidos para las epifitas en láminas de *M. pyrifera*. Es evidente que la mayor tasa de crecimiento para las especies de microalgas utilizadas como epifitas en *M. pyrifera*, respecto a las células libres en el medio en los ensayos con láminas de *M. pyrifera*, se debió a que el sustrato del alga favoreció el crecimiento de cada una de las especies utilizadas en este trabajo.

#### **4.1.2 Biomasa en peso**

El peso seco orgánico de *M. pyrifera* se modificó por efecto del enriquecimiento y de los tiempos en ambos ensayos de enriquecimiento (discos y láminas). En general los porcentajes de peso orgánico en *M. pyrifera* al inicio del experimento fueron entre 70% y 84% con discos y con láminas. Simental-Trinidad (2004) indica un aumento de 63% de peso orgánico para *M. pyrifera* sin epifitar y porcentajes de entre 56% y 71% en *M. pyrifera* epifitada con *N. incerta*. En este trabajo se evaluaron porcentajes de peso seco orgánico para *M. pyrifera* sin enriquecer de 84% y para *M. pyrifera* enriquecida con las diversas especies de microalga

en láminas, en valores entre 86% a 88%. Los cuales se ven directamente relacionados con el aumento en la concentración de proteínas del contenido proximal que fue mayor a lo reportado en el trabajo de Simental-Trinidad (2004).

En las macroalgas el porcentaje de peso seco inorgánico en general es alto situándose en valores de entre 30% y 40% (Rodríguez-Montesinos y Hernández-Carmona, 1991; Vega-Villasante *et al.*, 2006). Los resultados de peso seco inorgánico durante el primer ensayo de enriquecimiento con discos de *M. pyrifera* fluctuaron entre un valor mínimo de 19% el día 0 y un máximo de 30% el día 5. Estos resultados fueron similares a los observados en el segundo ensayo de enriquecimiento en láminas de *M. pyrifera*, en donde se tuvieron valores entre 15% y 20% de peso seco inorgánico. Los resultados obtenidos en los ensayos de epifitación con las 8 especies de microalgas, muestran para los discos y las láminas de *M. pyrifera* los mayores valores de peso inorgánico y que corresponden a los días con mayor epifitación (Figura 8 y 14). Lo cual es debido a que las diatomeas contienen una mayor proporción de compuestos inorgánicos ya que posee un capa de sílice (SiO<sub>2</sub>) que es el constituyente principal de la pared celular o frústula (Medlin, 2002) que en consecuencia podría aumentar el peso inorgánico de *M. pyrifera* al ser epifitada. Para *M. pyrifera* epifitada con *N. incerta* Simental-Trinidad (2004) reportó valores entre 27% y 44% de peso seco inorgánico similares a los descritos por Rodríguez-Montesinos *et al.* (2004) y que son parecidos a los observados en esta investigación.

#### 4.1.3 Composición proximal

La composición proximal de *M. pyrifera* en general puede variar entre las diferentes especies, tiempo de cosecha, zona geográfica, corrientes, temperatura, disponibilidad de nutrientes y las asociaciones de organismos epifitos (Rodríguez-Montesinos y Hernández-Carmona, 1991; Simental *et al.*, 2004; Siqueiros-Beltrones *et al.*, 2002). En el ensayo de epifitación con diversas especies de microalgas en discos y en láminas de *M. pyrifera*, se observó que la composición proximal cambia dependiendo de la especie de microalga utilizada y del tiempo de la epifitación. En los enriquecimientos en láminas el porcentaje de proteínas para *M. pyrifera* fue mayor al epifitar con *G. marina* (33%) y *Phormidium* sp. (36%). Sin embargo, para *M. pyrifera* en el medio natural se han observado diferentes porcentajes de proteínas, en su mayoría bajos entre valores de 8.7% en verano y 10.7% en invierno para la localidad de Bahía Tortugas en Baja California (Castro-González *et al.*, 1994). Cuesta-Gómez (2012) menciona porcentajes de proteínas de entre 7% y 12%; Ruíz-Güereca *et al.* (2016) indican valores de proteínas entre 6% y 8%; Simental *et al.* (2004) presentan valores de proteínas entre 5% y 7%. Mientras que para *M. pyrifera* enriquecida con *Navicula incerta* se describen porcentajes entre 6% y 12% (Simental *et al.*, 2004). Los resultados del

porcentaje de proteína reportados por los distintos autores, resultan en valores menores a los obtenidos en esta investigación con la epifitación de *M. pyrifera* con 8 especies de microalgas; sin embargo, el contenido de proteínas obtenidas en *M. pyrifera* sin enriquecer son similares a lo descrito por dichos autores. Lo anterior puede estar relacionado con la época de la recolecta de las algas cuando las condiciones de nutrientes, luz y temperatura favorecieron un alto contenido de proteínas. Para esta investigación la colecta de macroalgas se realizó durante la temporada de invierno.

En cultivos monoespecíficos de *G. marina* se mencionan porcentajes de proteínas entre 4.4% - 8.5% y para *Phormidium* sp., un porcentaje de proteínas de 4.5% (Jiménez-Valera y Sánchez-Saavedra, 2016); los resultados previamente mencionados fueron menores a los obtenidos en esta investigación en condiciones de cultivo similares. Estos valores mayores en el contenido de proteínas son debidos a que probablemente la superficie del alga contribuyó a un incremento en la cantidad de nutrientes disponibles para las células epifitadas.

En el enriquecimiento en láminas los lípidos al inicio del enriquecimiento se encontraban en valores entre 7% y 10%, y posterior al enriquecimiento se tuvieron valores entre 15% y 18%, siendo el enriquecimiento con *G. marina* el que presentó el mayor valor (18%). En el medio natural *M. pyrifera* presenta porcentajes de lípidos entre 1% y 10% (Cuesta-Gómez, 2012; Ruíz-Güereca *et al.*, 2016; Simental *et al.*, 2004; Vega-Villasante *et al.*, 2006), valores similares a los observados en esta investigación para *M. pyrifera* sin enriquecer. Mientras que *G. marina* en cultivos monoespecíficos presenta altos porcentajes de lípidos (26.3% y 34.2%) (Jiménez-Valera y Sánchez-Saavedra, 2016). Por lo cual, el aumento del porcentaje de lípidos en *M. pyrifera* posterior al enriquecimiento, puede estar relacionado con los altos porcentajes de lípidos presentes naturalmente en general en las diatomeas y en particular en *G. marina* según lo descrito en cultivos monoespecíficos por Jiménez-Valera y Sánchez-Saavedra (2016).

El contenido de carbohidratos en las láminas de *M. pyrifera* sin enriquecer utilizadas en esta investigación, presentó bajos porcentajes (7% y 8%). Mientras que el contenido de carbohidratos en el tratamiento de epifitación de *M. pyrifera* con *Phormidium* sp. se tuvieron porcentajes de carbohidratos entre 13% y 16%. Cuesta-Gómez (2012) reportó porcentajes de carbohidratos como extracto libre de nitrógeno entre 27% y 33%; sin embargo, Simental *et al.* (2004) mencionan menores porcentajes (1% y 2%) de carbohidratos en *M. pyrifera* sin enriquecer. Estas diferencias posiblemente por una parte estén asociadas a que el alga utiliza la energía de reserva para síntesis de otros constituyentes como las proteínas y por otro lado también puede estar relacionado con el tipo de metodología que se utilizó para la determinación de carbohidratos las cuales en su mayoría usan el extracto libre de nitrógeno.

Los resultados de la composición proximal de *M. pyrifera* con el enriquecimiento por medio de epifitación selectiva con las 8 especies de microalgas, en general, fueron diferentes a los valores reportados para *M. pyrifera* en el medio natural (Cuesta-Gómez, 2012; Muñoz-Muñoz, 2009; Ortiz *et al.*, 2009; Rodríguez-Montesinos y Hernández-Carmona, 1991; Ruíz-Güereca *et al.*, 2016; Simental *et al.*, 2004) y también a los cultivos monoespecíficos de las especies utilizadas en el enriquecimiento (Jiménez-Valera, 2016). Sin embargo, es importante mencionar que en los ensayos realizados en esta investigación se tuvo la adición de los nutrientes provistos por el medio *f*, el cual además de ser útil para el crecimiento de las microalgas, también puede ser utilizado como fuente de nutrientes y síntesis de proteínas por *M. pyrifera*, ya que se ha comprobado que el uso del medio *f/2* como fertilizante para macroalgas (*Ulva* sp. y *Gracilaria cliftonii*) puede promover un aumento significativo en el contenido de proteínas (Bansemer *et al.*, 2016). El aumento del contenido de las proteínas en *M. pyrifera* en esta investigación pudo deberse al efecto de la adición de nutrientes en el medio y a la contribución de las células epifitas utilizadas.

#### **4.2 Enriquecimiento de *M. pyrifera* con nutrientes (N:P)**

En el medio, natural el nitrógeno y el fósforo son nutrientes limitantes para el crecimiento de las macroalgas, la disponibilidad de estos tiene un impacto substancial en su metabolismo (Harrison y Hurd, 2001). El nitrógeno es un importante componente de proteínas, ácidos nucleicos, pigmentos y otros componentes celulares (Hanisak, 1983). Por otro lado, el fósforo está directamente involucrado en las rutas metabólicas de compuestos energéticos, membranas estructurales, ATP, fotosíntesis y la absorción de nitrógeno (Chopin *et al.*, 1990). Es por ello que la relación N:P puede afectar directamente la fotosíntesis, la tasa de absorción de nutrientes y el crecimiento de las macroalgas (Liu y Vyverman, 2015). En acuicultura el manejo de la concentración de nutrientes depende del producto que se quiera obtener (*e.g.* carragenano, ficocoloides, lípidos, proteínas) para ello es importante comprender la relación C:N:P lo cual permite suministrar los nutrientes necesarios de una manera más económica (Harrison y Hurd, 2001).

En esta investigación se realizaron dos tipos de enriquecimientos adicionando nitrógeno y fósforo con altas y bajas concentraciones, explorando la relación N:P establecida por Redfield (1933), para promover el cambio de la composición proximal en *M. pyrifera*. Es importante enfatizar que la mayoría los trabajos descritos sobre *M. pyrifera* en la literatura están enfocados únicamente a los enriquecimientos con amonio y/o nitrato, por esta razón el enriquecimiento con N:P obtenido en ésta investigación resulta ser una contribución para el conocimiento de *M. pyrifera* como alternativa de método de enriquecimiento con nutrientes y su uso en la acuicultura.

## 4.2.2 Composición proximal

### 4.2.2.1 Enriquecimiento con altas concentraciones

Los resultados obtenidos acerca del efecto de la adición de nutrientes en altas concentraciones, mostraron que la composición proximal de discos de *M. pyrifera* disminuyó en todos los tratamientos ensayados (22:1.37 mM, 44:2.75 mM, 66:4.12 mM, 88:5.5 mM y 1: 0.06 M). Además, se observó un deterioro del tejido de *M. pyrifera* que aumentó con respecto al paso del tiempo. Los resultados obtenidos fueron similares a los descritos por Cuesta-Gómez (2012) para enriquecimientos de *M. pyrifera* utilizando el mismo aporte de nitrógeno (fertilizante industrial líquido) en concentraciones de 1 M y 2 M, en donde encontró también un decremento de los componentes de la composición proximal respecto al paso del tiempo. Wheeler (1979) menciona que un factor importante que influye en la asimilación de nutrientes en *M. pyrifera*, es el corte de las láminas, los cuales pueden disminuir la asimilación de metilamina (análogo del amonio) y por consecuente disminuir la composición proximal de la macroalga. En esta investigación se realizaron cortes de las láminas para evaluar el efecto de la adición de nutrientes (enriquecimientos), similar a la metodología llevada a cabo por Cuesta-Gómez (2012) y Kopczak (1994) en *M. pyrifera*; sin embargo, Kopczak (1994) no reportó algún tipo de estrés fisiológico. Se considera que el decremento de la composición proximal de *M. pyrifera* en las concentraciones de nitrógeno utilizadas, podrían no ser atribuidos a los cortes de las láminas de *M. pyrifera* como Wheeler (1979) menciona, si no que probablemente se deba a las concentraciones utilizadas, las cuales fueron sustancialmente menores en los estudios de Kopczak (1994) (2- 24  $\mu$ M) en comparación con las utilizadas por (1-2M) Cuesta-Gómez (2012) y en esta investigación (22:1.37 mM, 44:2.75 mM, 66:4.12 mM, 88:5.5 mM y 1: 0.06 M).

El mecanismo por el cual un ion o molécula entran a través de la membrana plasmática de la célula de una macroalga puede ser por transporte pasivo, transporte activo o una combinación (Lobban y Harrison, 1997). Acerca de la incorporación de nutrientes por parte de las algas, se ha visto que en general prefieren al amonio respecto al nitrato, debido a que este entra a la célula por transporte pasivo. El transporte pasivo o difusión ocurre mediante el desplazamiento de moléculas a través de un gradiente de concentración mayor a uno menor el cual es, en algunos casos, mediado por proteínas o canales que pueden abrirse o cerrarse dependiendo de la concentración interna y externa (Levy *et al.*, 2006). Existen cuatro procesos involucrados en el uso del nitrógeno por las macroalgas: el primero es la adsorción que se refiere a la propagación a través de la superficie de las láminas (fuera de las células), el segundo es la absorción a través de la membrana celular hacia el citoplasma, el tercero es la asimilación dentro de los cloroplastos y el cuarto es el almacenamiento en aminoácidos, proteínas o pigmentos (Hanisak, 1983; Lobban y Harrison, 1996).

En las macroalgas el amonio posee la ventaja de ser absorbido por transporte pasivo sin gasto de energía, además de que puede ser asimilado y utilizado directamente para la síntesis de aminoácidos (Harrison *et al.*, 1986; Harrison y Hurd, 2001; Lobban y Harrison, 1996). Por lo anterior, podría suponerse que, al adicionar nutrientes al medio y causar un enriquecimiento con amonio, resultaría favorable para *M. pyrifera*. Sin embargo, en esta investigación no fue así para las altas concentraciones utilizadas de N:P. La fuente de nitrógeno (fertilizante industrial) utilizada en este trabajo contenía amonio (7.8%), urea (16.4%) y nitrato (7.8%), además de fosfato de sodio. Los resultados obtenidos con las altas concentraciones de nutrientes, no fueron favorables para aumentar la composición proximal de *M. pyrifera*, lo cual estuvo asociado a las altas concentraciones de nutrientes y posiblemente también a las formas químicas de nitrógeno utilizadas en esta investigación. Goldman y Glibert (1982) mencionan que la incorporación de nutrientes nitrogenados puede disminuir en presencia de más de una forma de nitrógeno, ya que el amonio puede reducir la actividad enzimática de la enzima nitrato reductasa y así disminuir la asimilación de nitrato. Se ha encontrado que la presencia de amonio inhibe la formación de ATP necesario para la fotofosforilación (Menéndez *et al.*, 2002). Por esta razón es posible que en esta investigación el uso del fertilizante con adición de fosfato de sodio, pudo contribuir en la disminución de la absorción y asimilación de los nutrientes y en consecuencia ocasionado una disminución de los componentes proximales en la macroalga. Manley y North (1984) al realizar enriquecimientos del medio con nitrógeno y fósforo en esporofitos de *M. pyrifera*, observaron necrosis en los tejidos debido a altas concentraciones externas de fósforo (6  $\mu\text{M}$ ). En estudios con algas pardas (*Durvillaea potatorum*, *Hormosira banksii*) se ha visto que la exposición a altas concentraciones de amonio (11 a 41  $\text{mg M L}^{-1}$ ), pueden llegar a ser tóxicas para las macroalgas afectando el tejido, la división celular y germinación de esporas (Adams *et al.*, 2008). Debido al efecto negativo de la adición de las altas concentraciones de nutrientes en este ensayo con *M. pyrifera*, se decidió explorar con menores concentraciones y con solo un aporte de nitrógeno, nitrato de sodio, para adicionar al medio como elemento de enriquecimiento de nutrientes para *M. pyrifera*. Mientras que para el aporte de fosfatos se decidió seguir usando el mismo tipo, fosfato de sodio, también en menores concentraciones. Por lo anterior, para definir las concentraciones de nutrientes a utilizar en los ensayos subsecuentes, se tomó en consideración la cantidad de nutrientes en eventos de surgencias en donde habita *M. pyrifera* (Bruland *et al.*, 2001; Harrison y Hurd, 2001; McPhee-Shaw *et al.*, 2007).

#### **4.2.2.2 Enriquecimiento con bajas concentraciones de N:P**

Entre los mecanismos que transportan el nitrógeno a las costas se encuentran las surgencias, fenómeno por el cual emergen aguas profundas ricas en nutrientes (Bruland *et al.*, 2001). El nitrato es la forma de nitrógeno fijado más abundante que comprende alrededor del 88% de nitrógeno total fijado en el océano

y el amonio constituye aproximadamente el 0.3% (Gruber, 2008). En la Corriente de California las concentraciones de nitratos en zonas de surgencias varían de entre 10  $\mu\text{M}$  a 30  $\mu\text{M}$  (Bruland *et al.*, 2001). En los mantos de *M. pyrifera* en Santa Bárbara, California las surgencias proveen aproximadamente el 70% de las fluctuaciones de nitrógeno anual (McPhee-Shaw *et al.*, 2007). En el Pacífico Este en general existen variaciones debidas a las estaciones a lo largo del año, y se encuentran los máximos valores para otoño e invierno; para el nitrógeno entre 30 a 40  $\mu\text{M}$  y para el fósforo aproximadamente en 2  $\mu\text{M}$  (Harrison y Hurd, 2001). La proporción de nitrógeno y fósforo antes mencionada en surgencias en el Pacífico, es cercana a la razón establecida por Redfield (1933) 16:1, lo cual podría indicar que las concentraciones más altas con las que los mantos de *M. pyrifera* están expuestas se encuentran entre 10 a 40  $\mu\text{M}$  para nitrato y 2  $\mu\text{M}$  para fosfato.

En enriquecimientos del medio con suministro de amonio o nitrato para *M. pyrifera* se han utilizado en altas y bajas concentraciones que van desde 2 M, 1M, 44 mM, 1 mM, 80  $\mu\text{M}$  y 24  $\mu\text{M}$  (Cuesta-Gómez, 2012; Kopczak, 1994; Ruíz-Güereca *et al.*, 2016; Stewart, 2015). Es importante destacar que en la mayoría de las investigaciones realizadas con enriquecimiento de nutrientes en el medio natural para *M. pyrifera*, se han realizado solo incluyendo como nutriente nitrógeno. Hasta donde se conoce solo se ha encontrado un trabajo que considera el enriquecimiento *in situ* con la adición de nitrógeno y fósforo (N:P) en una relación 15:1  $\mu\text{M}$  en el cual lograron tener mayores tasas de crecimiento en las algas enriquecidas respecto a las macroalgas sin enriquecer. Sin embargo, no se realizaron pruebas bioquímicas de ningún tipo que nos pudiera dar más información sobre el cambio en la composición de las algas por efecto del enriquecimiento.

En esta investigación el enriquecimiento con bajas concentraciones de nutrientes se llevó a cabo con dos concentraciones, siguiendo con la relación establecida por Redfield (1933) 16:1. En esta investigación las dos concentraciones de N:P utilizadas (14:0.87  $\mu\text{M}$  y 200:12.05  $\mu\text{M}$ ), promovieron un cambio en la composición proximal de *M. pyrifera* y además este cambio estuvo en relación directa con el tiempo de exposición. Las proteínas en *M. pyrifera* aumentaron a un 23% con la adición de 14:0.87  $\mu\text{M}$  (N:P) en el primer día de enriquecimiento, después de esto, no se observó cambio significativo en el contenido de proteínas.

El contenido de proteínas de *M. pyrifera* en el medio natural en temporadas de alta disponibilidad de nutrientes, ocurre entre otoño- invierno y a principios de la primavera, y se encuentran en valores entre 5% y 13% (Ortiz *et al.*, 2009; Rodríguez-Montesinos y Hernández-Carmona, 1991). Estos valores de proteínas son similares a lo evaluado en esta investigación para *M. pyrifera* (15%) recolectadas a inicios de

febrero de 2016, y que correspondió a la temporada de invierno cuando existe una mayor disponibilidad de nitrógeno y fósforo en el medio (Zaytsev *et al.*, 2003). Para *M. pyrifera* enriquecida con 3 formas químicas de nitrógeno, amonio, nitratos y urea, provistas por fertilizantes agrícolas (1 M) se reporta un incremento del porcentaje de proteínas de 10% a 22% (Cuesta-Gómez, 2012). Ruíz-Güereca *et al.* (2016) mencionan un incremento del contenido de proteínas en *M. pyrifera* en valores del 7% a 14% debido al efecto del suministro de cloruro de amonio 1 M, mientras que se tuvieron valores de proteínas en *M. pyrifera* de 18% al utilizar como aporte de nitrógeno un fertilizante al 44 mM. Los porcentajes antes mencionados, resultan similares a los porcentajes de proteínas obtenidos para *M. pyrifera* en esta investigación, pero con concentraciones de nutrientes sustancialmente menores a las utilizadas por Cuesta-Gómez (2012). Estas diferencias pueden deberse a la implementación del uso del fósforo en el enriquecimiento de *M. pyrifera* en esta investigación. Lobban y Harrison (1997) han documentado que la absorción del nitrato se lleva a cabo por transporte activo, el cual utiliza moléculas de ATP para la generación de energía conocidas como ATPasas, las ATPasas desplazan al interior y al exterior de las células iones o moléculas y para este proceso utilizan moléculas de ATP, lo que resalta la importancia del fósforo en el metabolismo y su efecto en la incorporación de nutrientes como el nitrógeno. Chopin *et al.* (1990) sugieren que la determinación del punto crítico de concentración de fósforo para el crecimiento puede minimizar el uso de nitrógeno y maximizar la producción de biomasa.

En *M. pyrifera* el nitrato presenta tasas de saturación relativamente rápidas como estrategia de supervivencia en períodos con limitación de nitrógeno (Gerard, 1982; Harrison y Hurd, 2001), durante esta estrategia se forman reservas de nitrógeno en forma de iones, aminoácidos y proteínas (Gerard, 1982; Pueschel y Korb, 2001; Wheeler, 1979). Esto podría indicar que con la relación N:P a una concentración de 14:0.87  $\mu\text{M}$  en el enriquecimiento de *M. pyrifera* puede contribuir a la formación de reservas de proteínas en la estructura celular de las láminas de *M. pyrifera*.

El porcentaje de carbohidratos y lípidos de las láminas de *M. pyrifera* no presentaron diferencias significativas por efecto de los enriquecimientos con las dos bajas concentraciones de N:P utilizadas en éste trabajo. Resultados similares fueron obtenidos por Cuesta-Gómez (2012) para *M. pyrifera* pero utilizando fertilizantes agrícolas con 3 formas químicas de nitrógeno (amonio, nitratos y urea 1 M). Sin embargo, los porcentajes de carbohidratos y lípidos reportados en esta investigación son menores a los descritos para *M. pyrifera* en el medio natural, posiblemente el metabolismo de almacenamiento de carbohidratos se desvió para la síntesis de proteínas.

En el tratamiento control, sin enriquecimiento de *M. pyrifera*, presentó una disminución en el porcentaje de proteínas y un aumento en el contenido de carbohidratos al segundo día, lo cual es común observar en algas como un efecto de la deficiencia de nitrógeno ya que los carbohidratos son el principal producto del metabolismo inmediatamente después de la limitación de nitrógeno y posteriormente la síntesis de lípidos es predominante, si la deficiencia continua durante varios días (Fogg, 1964).

#### **4.2.3 Biomasa en peso**

Durante los ensayos de enriquecimiento con nutrientes en discos se observó una disminución del porcentaje de biomasa orgánica y un aumento de la biomasa inorgánica con el paso del tiempo desde el día cero hasta el día cinco, como se mencionó anteriormente esto fue debido a la descomposición de los discos con altas concentraciones de nutrientes, por otro lado al realizar los enriquecimientos con bajas concentraciones de nutrientes en láminas de *M. pyrifera* los porcentajes de biomasa inorgánica no cambiaron significativamente, lo que podría atribuirse a que las condiciones utilizadas en esta investigación no generaron necrosis en los tejidos de las láminas de *M. pyrifera*. Harrison y Hurd (2001) mencionan que en el metabolismo del nitrógeno un exceso de  $\text{NH}_3$  o  $\text{NH}_4$  genera la desconexión del proceso de fosforilación, un decremento en la síntesis de carbohidrato y en la permeabilidad de las membranas que a su vez genera necrosis en los tejidos produciendo la muerte celular y aumentando el porcentaje de biomasa en peso orgánico como se observó en este trabajo en los enriquecimientos con altas concentraciones de nutrientes, además mencionan que una óptima concentración de nutrientes en los enriquecimientos con macroalgas las cuales son especie específica, pueden promover un aumento en la biomasa orgánica y una disminución en la biomasa inorgánica; en este trabajo no se observó un cambio significativo en la biomasa orgánica, lo cual puede estar atribuido a que los componentes orgánicos como los lípidos y carbohidratos no cambiaron por efecto del enriquecimiento como se observa en las figuras 26 y 27, el único cambio se observó en la biomasa orgánica fue en forma de proteínas aumentando de 15.3% a 23.3% en el mayor de los casos, es decir un aumento de 7 unidades en porcentaje, por lo que el aumento en la biomasa orgánica total no fue significativo al evaluarse en sumatoria con los demás componentes orgánicos.

#### **4.3 Bioensayo con juveniles de abulón rojo alimentados con *M. pyrifera* enriquecida**

Uno de los principales factores limitantes para el incremento de la producción en granjas de cultivo de abulón es la adecuada alimentación (Demetropoulos y Langdon, 2004; Mardones *et al.*, 2015), la cual debe cumplir con calidad, facilidad de manejo, accesibilidad económica y sobre todo con los requerimientos nutricionales del organismo (Mardones *et al.*, 2015).

Los requerimientos nutricionales de los abulones varían según la especie, edad y condiciones de cultivo como la temperatura y el fotoperiodo (Bansemer *et al.*, 2016). Sin embargo, estos requerimientos se han establecido solo para uso de alimento formulado: entre 30% y 50% de proteína, 30% a 40% de carbohidratos y entre 5% y 6% de lípidos (McBride y Conte, 2000). En la nutrición de abulones con dietas balanceadas, las proteínas son el componente que genera mayor costo (Viana, 1998). El contenido de proteínas son el principal limitante en el alimento suministrado por medio de macroalgas (Bansemer *et al.*, 2016), ya que cuentan con valores de entre 2% y 13% de proteínas (Viana *et al.*, 1993; Argumedo-Hernández, 2005; Ortiz *et al.*, 2009).

*M. pyrifera* es una macroalga que modifica su composición proximal en respuesta a la epifitación selectiva con diatomeas y por la adición de nitrógeno, presentando porcentajes de los componentes proximales en valores de proteínas entre 5%-20%, carbohidratos entre 3-53%, y lípidos entre 1-2% (Manley y North, 1984; Simental *et al.* 2004; Cuesta-Gómez, 2012; Ruíz-Güereca *et al.*, 2016). En esta investigación los valores de la composición proximal de *M. pyrifera* obtenida con el enriquecimiento con nutrientes en bajas concentraciones (14: 0.87  $\mu\text{M}$  y 200:12.05  $\mu\text{M}$ ) mostraron valores de proteínas entre 19% y 33%, lípidos entre 11% y 18%, y carbohidratos entre 9% y 11%.

Para llevar a cabo el enriquecimiento de las hojas de *M. pyrifera* se realizaron dos estrategias, por medio de adición de nutrientes y por epifitación selectiva con microalgas. Ambas estrategias promovieron un aumento en el contenido de proteínas en *M. pyrifera*. Sin embargo, el aumento de este componente fue proveniente de dos fuentes, la primera como producto del metabolismo de nitrato y fosfato de sodio adicionado al medio y la segunda en su gran mayoría atribuida a las células de microalgas epifitas en las hojas de *M. pyrifera*. Para el bioensayo de alimentación de abulones se decidió utilizar ambas estrategias de enriquecimiento, seleccionando los mejores tratamientos experimentales en donde se logró un incremento en la composición proximal de *M. pyrifera*. Los tratamientos seleccionados fueron: epifitar las hojas de *M. pyrifera* con *G. marina* y, adicionar una concentración de N:P de 200:12.05  $\mu\text{M}$ .

#### **4.3.1 Crecimiento**

Los resultados de los bioensayos de alimentación con los juveniles de abulón indican que el crecimiento en términos de talla fue mayor para los organismos alimentados con *M. pyrifera* enriquecida por epifitación con *G. marina*, seguido del obtenido con el tratamiento enriquecimiento con adición de nutrientes y menor en el tratamiento control (*M. pyrifera* sin enriquecer).

Los abulones alimentados con *M. pyrifera* epifitada con células de *G. marina* fueron los que presentaron una mayor ganancia en peso (180.9%), seguida por la obtenida con *M. pyrifera* enriquecida con nutrientes (155.8%) y con el tratamiento control (151.5%).

Para juveniles de abulón rojo con una talla inicial de 6.6 mm y alimentados por 90 días con macroalgas (*Macrocystis pyrifera* y *Porphyra columbina*) se reporta ganancia en peso en valores de entre 548.3% a 1003.9% (Hernández *et al.*, 2009). En abulón rojo de 11 mm alimentados con *Macrocystis pyrifera* y *Macrocystis integrifolia* por 168 días, se reportan porcentajes de ganancia en peso de 446% hasta 520% (Muñoz-Muñoz, 2009). Estos porcentajes de ganancia en peso antes mencionados, son mayores a los encontrados en esta investigación, ya que la ganancia en peso está en función de la talla, edad del organismo y el tiempo de cultivo, por lo anterior los resultados son distintos ya que corresponden a edades diferentes de los juveniles de abulón, en esta investigación los abulones tuvieron una talla inicial de 8.79 mm de longitud de la concha.

#### **4.3.2 Tasa específica de crecimiento**

La tasa específica de crecimiento (TEC), para abulones alimentados con *M. pyrifera* mantenida en los tres tratamientos experimentales, tuvieron la misma tendencia observada en los resultados de ganancia en peso. Los valores mayores de TEC fueron para abulones alimentados con *M. pyrifera* enriquecida con células de *G. marina*.

Kemp *et al.* (2015) mencionan porcentajes de TEC de 0.50% en juveniles de abulón rojo de 20.5 mm alimentados con macroalgas pardas (*M. pyrifera*, *Lessonia berteriana* y *Lessonia spicata*) por 162 días. Muñoz-Muñoz (2009) para abulón rojo con talla de 11 mm y alimentados con *M. pyrifera* por 168 días reporta una TEC del 1%. Los autores antes mencionados indican para juveniles de abulón menores porcentajes de TEC a los descritos en esta investigación. Estas diferencias son debidas al distinto tamaño inicial de los organismos y también a la diferente composición proximal de las macroalgas. Kemp *et al.* (2015) no mencionan la composición proximal de *M. pyrifera*. Sin embargo, en *M. pyrifera* extraída del medio natural en Chile en donde llevó los experimentos, se han reportado porcentajes de 13% de proteínas, 75% de carbohidratos y 0.7% de lípidos (Ortiz *et al.*, 2009). Muñoz-Muñoz (2009) cuantificó porcentajes de 11% a 15% de proteínas y 0.1%-0.4% de lípidos. Los valores de proteínas mencionados por los autores antes citados corresponden a menores porcentajes de proteínas que lo obtenido en esta investigación para los 3 tratamientos experimentales.

Para juveniles tempranos de abulón con talla de 6.6 mm y que fueron alimentados con *Macrocystis* sp. con una composición proximal de 11% proteínas; 0.58% lípidos y 14% carbohidratos, reportan porcentajes de TEC de 1.89% (Hernández *et al.*, 2009), estos valores de TEC antes mencionados son mayores a los evaluados en esta investigación para los juveniles de abulón rojo. Estas diferencias en los valores de TEC, pueden estar relacionadas a que los abulones utilizados en dicha investigación se encontraban en la etapa de transición de alimento, de diatomeas a macroalgas, además de que el tamaño inicial de los organismos era 2 mm menor a los usados en esta investigación. Por lo cual, los valores de TEC puede ser superiores, ya que se ha observado que el porcentaje de TEC es mayor para los organismos de menor edad (Bansemer *et al.*, 2014).

Se ha encontrado que al utilizar macroalgas enriquecidas (*Ulva* sp. y *Gracilaria cliftonii*) con los nutrientes provenientes del medio *f/2* descrito por Guillard y Ryther (1962), al ser empleadas como alimento en *Haliotis laevigata* de 17 mm, los valores de TEC reportados son entre 1.10% a 1.70% (Bansemer *et al.*, 2016). Los valores antes mencionados son menores a lo encontrado en esta investigación en con abulón rojo alimentados con *M. pyrifera* en los 3 tratamientos, en donde el mejor resultado de TEC se obtuvo cuando los abulones fueron alimentados con *M. pyrifera* epifitada por *G. marina* (1.30%). Sin embargo, es importante destacar, que son especies de abulón diferentes y que la temperatura de cultivo utilizada para *H. laevigata* (22 °C) fue mayor a la utilizada en esta investigación (17.7 °C). Se ha encontrado que altas temperaturas de cultivo estimulan el incremento en la tasa de alimentación y promueven altos valores de TEC (Rosen *et al.*, 2000). Se ha visto que el abulón rojo prefiere una temperatura de 18.8 °C y una temperatura crítica máxima de 24 °C, mientras que el rango de tolerancia de la especie va de valores de 9 °C hasta 24 °C (Díaz *et al.*, 2000). Los ensayos en esta investigación se realizaron con un control de la temperatura del agua (17.7 °C) y manteniéndola en valores muy cercanos a la temperatura preferida para esta especie.

Rosen *et al.* (2000) reportó porcentajes de TEC entre 1.17%-1.40% en juveniles de abulón rojo de 11 mm que fueron alimentados por 56 días con dos especies de macroalgas (*Nereocystis luetkeana* y *Palmaria mollis*) enriquecidas con nutrientes ( $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y en presencia de organismos epifitos naturales no cuantificados ni identificados. Se encontró que los tratamientos con epifitos en las macroalgas tuvieron un efecto significativo en el crecimiento de abulones en cultivo (17-19 °C). Los valores de TEC obtenidos fueron similares a los obtenidos en esta investigación con *M. pyrifera* enriquecida selectivamente con *G. marina* y además la temperatura de cultivos se situó en valores similares.

En el medio natural, la presencia de organismos epifitos en las macroalgas es común, estos organismos epifitos a su vez tienen una importante contribución en su valor nutricional y que puede verse incrementado (Simental *et al.*, 2004; Siqueiros-Beltrones y Argumedo-Hernández, 2005; Siqueiros-Beltrones *et al.*, 2016). Los organismos epifitos proliferan en el medio natural así como en condiciones de cultivo de macroalgas y en especial en presencia de luz (Morgan y Simpsonson, 1981) y nutrientes (Rosen *et al.*, 2000). Sin embargo, en muchos casos los organismos epifitos no son mencionados ni atribuidos al cambio en la composición proximal de las macroalgas. Estudios recientes han corroborado que los abulones no son organismos selectivos en su alimentación con diatomeas (Siqueiros-Beltrones y Argumedo-Hernández, 2015), por lo que estos pueden contribuir directamente en el crecimiento de los abulones en cultivo, como lo observado por Rosen *et al.* (2000), Simental *et al.* (2004) y en esta investigación. Las diatomeas son organismos cosmopolitas, de rápido crecimiento y es el alimento comúnmente suministrado a los abulones en cultivo de talla menor a 10 mm de largo de concha (Hahn, 1988) y también sirven como inductoras del asentamiento larval de este grupo de organismos (Rosen *et al.*, 2000).

#### 4.3.3 Tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento (TC) de los abulones es muy variable y depende de la calidad y la cantidad de alimento suministrado (Joll, 1996), la edad del organismo, la calidad del agua, el manejo, además de la temperatura de cultivo ya que esta regula el metabolismo (Díaz *et al.*, 2000; Freeman, 2001).

En ensayos realizados con *Haliotis fulgens* (talla de 5.9 mm y peso de 24.2 mg) alimentados durante 329 días con *M. pyrifera* obtenidas del medio y mantenidos en cultivo entre 13 °C y 21°C, se reportaron tasas de crecimiento (TC) de 48.31  $\mu\text{g día}^{-1}$  para el largo de la concha (TCI) y 3.15  $\text{mg día}^{-1}$  en peso (TCp) (Durazo-Beltrán *et al.*, 2003). Para *Haliotis rufescens* de 150 días con 3.67 mm de talla inicial de la longitud de la concha y mantenidos en cultivo a 16 °C y suministrado como alimento *M. pyrifera* por 30 días, se reportan tasa de crecimiento en términos de longitud (TCI) de 33.36  $\mu\text{m día}^{-1}$  y en términos de peso (TCp) de 142.64  $\mu\text{g día}^{-1}$  (Simental *et al.*, 2004). Los resultados descritos por Durazo-Beltrán *et al.* (2003) resultan similares a las tasas de crecimiento obtenidas en esta investigación a los 30 días de utilizar como alimento *M. pyrifera* sin enriquecer (30.51  $\mu\text{m día}^{-1}$ ). Cabe destacar, que para los otros 2 tratamientos utilizados en ésta investigación (enriquecimiento de N:P de 200:12.05  $\mu\text{M}$  y células de *G. marina*), las tasas de crecimiento fueron mayores. En las macroalgas enriquecidas, la mayor tasa de crecimiento se evaluó en los primeros 15 días para los abulones alimentados con *M. pyrifera* enriquecida con *G. marina* (crecimiento en longitud (TCI) de 124.17  $\mu\text{m día}^{-1}$  y crecimiento en peso (TCp) de 2.82  $\text{mg día}^{-1}$ , esta tendencia se observó en el día

30 de cultivo (TCl de  $75.79 \mu\text{m día}^{-1}$  y la TCp en  $1.58 \text{ mg día}^{-1}$ ) y para el día 45 (TCl de  $54.67 \mu\text{m día}^{-1}$  y TCp de  $1.17 \text{ mg día}^{-1}$ ).

Las mayores tasas de crecimiento en los abulones a los que se suministró *M. pyrifera* mantenida en los 3 tratamientos, coinciden con los valores mayores de la composición proximal de las macroalgas, en donde el mayor contenido proximal se observó en las macroalgas enriquecidas con *G. marina* y seguido de las macroalgas enriquecidas con nutrientes (N:P de 200:12.05  $\mu\text{M}$ ). En otras investigaciones realizadas con juveniles y adultos de distintas especies de abulón, se ha visto que existe una relación directa entre el crecimiento y el contenido proximal del alimento (Joll, 1996; Freeman, 2001). Se ha demostrado que los porcentajes de proteína mayores al 30% en dietas formuladas no son significativos en el crecimiento de los juveniles de abulón (Viana *et al.*, 1993; Uki *et al.*, 1985). Los contenidos de proteínas obtenidos en los 3 tratamientos experimentales estuvieron en valores máximos de 33% y mínimos de 20%.

En ensayos realizados con abulón verde (*Haliotis laevis*) en los que suministraron como alimento algas enriquecidas con nutrientes (medio *f/2*), se evaluaron tasas de crecimiento en términos de longitud (TCl) de  $75.85 \mu\text{m día}^{-1}$  con *Ulva* sp. y  $109.63 \mu\text{m día}^{-1}$  con *Gracilaria cliftonii*. En estos la composición proximal se encontró en valores de proteínas de entre 27% a 38%, lípidos < 2% y carbohidratos entre 31% a 46% (Bansemmer *et al.*, 2016). Estos valores de composición proximal de las algas, son similares a los obtenidos en esta investigación, pero obteniendo tasas de crecimiento menores en términos de longitud (TCl) en el día 45 de alimentación para este ensayo con abulón rojo. Estas diferencias son atribuidas a las diferencias entre especies y a la mayor temperatura de cultivo utilizada por los autores antes mencionados (22 °C) respecto a la utilizada en esta investigación (17.7 °C).

Ruiz-Güereca *et al.* (2016) indican que al mantener juveniles de abulón rojo con una temperatura de cultivo de 20 °C y suministrar como alimento *M. pyrifera* enriquecida con nutrientes (Cloruro de amonio  $1\mu\text{M}$ ) y fertilizante 44 mM (urea, amonio y nitratos) reportó una TCl de entre  $40.73 \mu\text{m día}^{-1}$  y  $45.25 \mu\text{m día}^{-1}$  respectivamente. Estos valores de crecimiento son menores a los descritos en esta investigación. Lo anterior puede atribuirse a los bajos valores de proteínas evaluadas para *M. pyrifera* (14% y 18%) por este autor.

Al mantener juveniles de abulón rojo en cultivo a 16 °C y suministrar durante 30 días como alimento *M. pyrifera* epifitada con *N. incerta*, se encontraron tasas de crecimiento en términos de longitud (TCl) en valores de entre 35- 52  $\mu\text{m día}^{-1}$ ; estos resultado son menores a la tasa de crecimiento evaluada al día 30 de cultivo en esta investigación ( $75 \mu\text{m día}^{-1}$ ). Estas diferencias pueden deberse a la baja temperatura de

cultivo utilizado por Simental *et al.* (2004) y corresponde a casi 2 °C menos respecto a lo utilizado en ésta investigación.

En cultivos de abulón rojo en donde se utilizó como alimento la macroalga *Palmaria mollis* mantenida en distintas irradiancias, se encontraron tasas de crecimiento en términos de longitud de entre 51  $\mu\text{m día}^{-1}$  y 62  $\mu\text{m día}^{-1}$  (Rosen *et al.* 2000); estos valores de tasas de crecimiento se encuentran entre los valores evaluados en este trabajo para abulón rojo alimentado con *M. pyrifera* epifitada con *G. marina* y *M. pyrifera* enriquecida con nutrientes. Es importante destacar que las tasas de crecimiento fueron mayores durante las primeras fechas de medición y decrecieron los valores, respecto al tiempo de cultivo de los juveniles de abulón rojo en ésta investigación.

Cabe destacar que las tasas de crecimiento en términos de longitud descritas en este trabajo son mayores a las observadas en ensayos con dietas formuladas con harina de pescado obteniendo valores de 44.29  $\mu\text{m día}^{-1}$  (Durazo-Beltrán *et al.*, 2003).

Argumedo-Hernández (2009) sugiere que, debido a la gran cantidad de diatomeas encontradas en los contenidos estomacales de abulones extraídos del medio natural, la transición de alimento en abulones en cultivo no debería ser abrupta, sino más bien parcial hasta etapas más avanzadas e incluso hasta su madurez.

#### **4.3.4 Tasa de conversión alimenticia**

Existen dos índices que relacionan el efecto del alimento y el crecimiento: el primero es la eficiencia de conversión alimenticia que se refiere al crecimiento por unidad de alimento suministrado. El segundo es la tasa de conversión alimenticia (TCA) que indica la cantidad de alimento en gramos que se requiere para generar un incremento de 1 gramo en peso del organismo (Fleming *et al.*, 1996).

Los abulones que son alimentados principalmente con macroalgas pardas tienen tasas de conversión alimenticia relativamente bajas en valores de entre 20-30  $\text{g día}^{-1}$  (Freeman, 2001). En abulones alimentados con *M. pyrifera* se reportan tasas de conversión alimenticia entre 16  $\text{g día}^{-1}$  y 70  $\text{g día}^{-1}$  (Muñoz-Muñoz, 2009). En abulones alimentados con dietas formuladas, la tasa de conversión alimenticia, se estima entre 1.5  $\text{g día}^{-1}$  y 1.3  $\text{g día}^{-1}$ , la cual es considerada eficiente (Maguire, 1998).

Para *M. pyrifera* enriquecidas con nutrientes (N:P de 200:12.05  $\mu\text{M}$ ) se obtuvo tasa de conversión alimenticia de 10.5  $\text{g día}^{-1}$  a 6  $\text{g día}^{-1}$  para esta investigación y que resulta en valores menores a lo reportado en abulón rojo alimentados con *M. pyrifera* sin enriquecer obtenida del medio natural por Muñoz-Muñoz (2009). Para *M. pyrifera* enriquecidas por epifitación selectiva con *G. marina*, se observó una tasa de conversión alimenticia de 2.20  $\text{g día}^{-1}$  significativamente menor a lo observado en *M. pyrifera* enriquecida con nutrientes. Estos valores son 0.68 mayores a lo obtenido para dietas formuladas para distintas especies de abulón en cultivo (Maguire, 1998). En esta investigación, se observó que los organismos que presentaron la menor tasa de conversión alimenticia, *M. pyrifera* epifitada con *G. marina*, satisfacían sus requerimientos nutricionales con la ingesta de alimento, y que a su vez presentan un mayor crecimiento. Sin embargo, para el tratamiento de *M. pyrifera* epifitada con *G. marina*, la tasa de eficiencia proteica no fue alta (1.03) comparadas con los valores obtenidos por otros autores que utilizan macroalgas enriquecidas (3.55 a 4.38) (Bansemer *et al.*, 2016).

Las tasas de eficiencia proteica (TEP) obtenidas en ésta investigación para *M. pyrifera* sin enriquecer (tratamiento control) (0.38), fueron menores a las obtenidas por otros autores que utilizan a *M. pyrifera* sin enriquecer (0.1 a 0.5) (Muñoz-Muñoz, 2009). Es posible que la calidad proteica ingerida en *M. pyrifera* mantenida en los tratamientos de enriquecimiento (con nutrientes 200:12.05  $\mu\text{M}$  y con células epífitas de *G. marina*) tenga una mayor calidad que la evaluada en las macroalgas sin enriquecer (tratamiento control).

En otras investigaciones en donde utilizaron macroalgas enriquecidas con nutrientes provenientes del medio *f/2*, se han reportado tasas de eficiencia proteica de 3.51  $\text{g día}^{-1}$  con *Ulva* sp. y 4.48  $\text{g día}^{-1}$  con *Gracilaria cliftonii* para abulón verde (*H. laevigata*) en cultivo (Bansemer *et al.*, 2016). Los valores antes mencionados son similares a lo encontrado en esta investigación para *M. pyrifera* epifitada con *G. marina* (2.20  $\text{g día}^{-1}$ ), posiblemente debido a la semejanza en la composición proximal de las macroalgas usadas como alimento y por el contenido energético 3.81  $\text{kcal g}^{-1}$  similar evaluado por Bansemer *et al.* (2016) y los valores encontrados en esta investigación (4.26  $\text{kcal g}^{-1}$ ). El contenido energético del alimento está relacionado con el contenido de los componentes proximales en las macroalgas, por lo cual es de esperar contenidos energéticos similares, si la cantidad de proteínas, carbohidratos y lípidos es similar en el alimento. En *M. pyrifera* enriquecida con epifitos y distintas formas de nitrógeno, el contenido energético se ha reportado en valores de entre 0.91  $\text{kcal g}^{-1}$  y 3.32  $\text{kcal g}^{-1}$  (Simental *et al.*, 2004; Cuesta-Gómez, 2012; Ruíz-Güereca *et al.*, 2016) que corresponden a valores menores a los descritos en este trabajo. Para diversas formulaciones de dietas destinadas a la nutrición de diversas especies de abulón, el contenido

energético se encuentra entre 3.1 kcal g<sup>-1</sup> y 4.8 kcal g<sup>-1</sup> (Bautista-Teruel *et al.*, 2003; Montaña-Vargas *et al.*, 2005; Cuesta-Gómez *et al.*, 2016) que resultan en valores similares a lo encontrado en esta investigación en el enriquecimiento de *M. pyrifera* con *G. marina* (4.26 kcal g<sup>-1</sup>).

En este estudio los 2 tratamientos de enriquecimiento, uso de nutrientes 200:12.5 µM y con células epífitas de *G. marina*, promovieron un aumento en el contenido de proteínas en *M. pyrifera*. Es importante resaltar que el contenido de carbohidratos en los 3 tratamientos utilizados en este ensayo se encontraron en valores menores a los obtenidos usualmente para esta especie (Simental *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2009; Cuesta-Gómez *et al.*, 2016; Ruíz-Güereca *et al.*, 2016). Los abulones son organismos adaptados fisiológicamente para digerir y utilizar los carbohidratos como una importante fuente de nutrientes para su crecimiento (Shepherd *et al.*, 1992; Bansemer *et al.*, 2016). Bansemer *et al.* (2014) recomiendan, para al abulón verde, que cuando se suministre alimento con un alto contenido de proteínas, el contenido de carbohidratos sea mayor para que estos puedan ser mejor utilizadas como reserva de energía. Por lo anterior, es necesario estudiar las relaciones producidas entre los compuestos energéticos y la composición del alimento suministrado, principalmente el aporte de proteína y carbohidratos, ya que son los principales componentes que satisfacen los requerimientos energéticos, además de que el nivel de proteínas debe ser suficiente para satisfacer los requerimientos de energía y crecimiento (Montaña-Vargas *et al.*, 2005).

La relación P/E puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo, la composición proximal del alimento, la especie y la edad de los organismos, ya que los organismos adultos requiere menor cantidad de proteína en su alimentación respecto a los organismos jóvenes (Freeman, 2001). En esta investigación, se observó un mayor crecimiento en los abulones alimentados con *M. pyrifera* enriquecida con *G. marina* (P/E: 44.51 mg de proteína cal<sup>-1</sup>) debido a la alta cantidad de proteínas y lípidos en las macroalgas generadas con el enriquecimiento. En los tratamientos con menor porcentaje de proteínas los abulones necesitaban más alimento con una TCA de 10.56 g día<sup>-1</sup> a 16.72 g día<sup>-1</sup> respecto al tratamiento con mayor aporte de proteínas en el cual la TCA fue menor significativamente (2.20 g día<sup>-1</sup>), estos resultados nos indican que los abulones alimentados con *M. pyrifera* enriquecida con *G. marina* satisficieron sus requerimientos alimenticios más rápido que los demás tratamientos.

Las diferencias en el crecimiento de los abulones debido a los tratamientos de alimentación, pueden ser atribuidas a la calidad de la proteína ingerida y que podría ser mejor en el tratamiento de enriquecimiento de *M. pyrifera* con células de *G. marina*, ya que las diatomeas tienen altos contenidos de proteínas y de ácidos grasos como HUFAs y PUFAs, así como de otros metabolitos secundarios como las vitaminas y

precursores de enzimas (Brown *et al.*, 1997). Es posible que el alto contenido de ácidos grasos que tienen las diatomeas haya favorecido una mayor supervivencia de abulones que utilizaron como alimento a *M. pyrifera* enriquecida con *G. marina* (98%) respecto a los otros dos tratamientos experimentales con *M. pyrifera* enriquecida con nutrientes (91%) y para el tratamiento control (92%). La supervivencia de los juveniles de abulón en las condiciones experimentales, fue similar a lo reportado para abulón rojo por otros autores (Cuesta-Gómez *et al.*, 2016; Rosen *et al.*, 2000) y mayor a lo reportado con el uso de macroalgas sin enriquecer (Durazo-Beltrán *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2009; Muñoz-Muñoz, 2009; Ruíz-Güereca *et al.*, 2016), así como para enriquecimiento de *M. pyrifera* epifitada con *N. incerta* (Simental *et al.*, 2004), e incluso se lograron mayores valores de supervivencia que lo reportado para el uso de dietas formuladas (Viana *et al.*, 1993; Bautista-Teruel *et al.*, 2003; Durazo-Beltrán *et al.*, 2003).

## Capítulo 5. Conclusiones

---

Dado los altos valores de la densidad de células de las 8 especies de microalgas epifitas en *M. pyrifera* se hace evidente que la composición proximal aumentó por efecto del enriquecimiento con las diatomeas epifitas.

Debido a los altos valores de la composición proximal de la diatomea *G. marina* se infiere que su utilización como fuente de enriquecimiento redujo los mayores valores de la composición proximal de *M. pyrifera* respecto a las otras especies de microalgas utilizadas.

La macroalga *M. pyrifera* mantenida en altas concentración de nutrientes (22:1.37 mM, 44:2.75 mM, 66:4.12 mM, 88:5.5 mM, 1:0.6 M) disminuye su composición proximal conforme aumenta el tiempo de exposición y la concentración de nutrientes. Mientras que *M. pyrifera* mantenida en bajas concentraciones de nutrientes (14:0.87  $\mu$ M y 200:12.05  $\mu$ M) produce un incremento en la composición proximal en relación directa con el tiempo de exposición.

Le epifitización selectiva con *G. marina* promovió un cambio en los porcentajes de composición proximal en *M. pyrifera*, respecto al tratamiento de enriquecimiento con nutrientes (N:P de 14:0.87  $\mu$ M y 200:12.05  $\mu$ M).

Dadas las altas tasas de crecimiento (talla y peso) y de supervivencia en abulón rojo (*H. rufescens*) mediante el consumo de *M. pyrifera* enriquecida con células de *G. marina* y por nutrientes (N:P de 200:12.05  $\mu$ M), se hace evidente que el uso de macroalgas enriquecidas tiene un efecto positivo en el desarrollo de juveniles.

El mayor crecimiento obtenido en cultivo de juveniles de *H. rufescens* con el alimento provisto por *M. pyrifera* enriquecida con *G. marina* sugiere un efecto positivo por relación directa entre el contenido de proteínas y energía.

Se implementó un nuevo sistema para el mantenimiento de juveniles de abulón que facilita la limpieza de las unidades experimentales, garantiza una mayor supervivencia debido a que evita la fuga de organismos, favorece una mayor disponibilidad del alimento y un menor gasto de energía en su búsqueda.

## Recomendaciones

Evaluar el contenido bacteriano en láminas de *M. pyrifera* al realizar enriquecimientos por epifitación con microalgas.

Evaluar el efecto del lavado con agua de uso doméstico de las láminas de *M. pyrifera* respecto a la fisiología del alga y su relación con la capacidad de epifitación con microalgas.

Evaluar el efecto de epifitar láminas de *M. pyrifera* con las 8 especies de microalgas utilizadas en éste trabajo y que puedan coexistir.

En los tratamientos de enriquecimiento de láminas de *M. pyrifera* se recomienda mantener 12 horas a las algas en agua de mar filtrada con aireación para disminuir la cantidad exopolisacáridos del alga.

Durante el proceso de enriquecimiento con nutrientes es necesario evaluar el efecto de recambios de agua respecto a la composición proximal.

Evaluar diferentes razones de C:N:P para hacer enriquecimiento de láminas de *M. pyrifera* respecto a la composición proximal.

Evaluar el efecto de la temperatura y de la irradiancia en láminas de *M. pyrifera* y su efecto en la composición proximal.

Evaluar el efecto de distintos tipos de secado para láminas de *M. pyrifera* respecto a la composición proximal.

Medir el efecto de suministrar como alimento para abulón láminas de *M. pyrifera* enriquecida y sin el proceso de secado al sol.

Conocer el perfil de ácidos grasos y aminoácidos en *M. pyrifera* mantenida con los mejores tratamientos de enriquecimiento obtenidos en ésta investigación.

## Literatura citada

- Adams, M.S., Stauber, J.L., Binet, M.T., Molloy, R., Gregory, D. 2008. Toxicity of a secondary-treated sewage effluent to marine biota in Bass Strait, Australia: development of action trigger values for a toxicity monitoring program. *Marine Pollution Bulletin* 57 (6): 587 - 598.
- Aguilar-May, B. 2002. Remoción de nutrientes con microalgas marinas en un medio equivalente al efluente tipo promedio de una granja camaronícola. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 104 pp.
- Argumedo-Hernández, U. 2005. Variaciones temporales en la estructura de las asociaciones de diatomeas epifitas en láminas apicales de *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Ag. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, Baja California Sur, México. pp. 3 - 19.
- Bansemmer, M.S., Qin, J.G., Harris, J.O., Howarth, G.S., Stone, D.J. 2014. Nutritional requirements and use of macroalgae as ingredients in abalone feed. *Reviews in Aquaculture*, 8(2): 121 – 135.
- Bansemmer, M.S., Qin, J.G., Harris, J.O., Duong, D.N., Hoang, T.H., Howarth, G.S., Stone, D.J. 2016. Growth and feed utilisation of greenlip abalone (*Haliotis laevis*) fed nutrient enriched macroalgae. *Aquaculture*, 452: 62 – 68.
- Bautista-Teruel, M.N., Fermin, A.C., Koshio, S.S. 2003. Diet development and evaluation for juvenile abalone, *Haliotis asinina*: Animal and plant protein sources. *Aquaculture*, 219 (1 - 4): 645 – 653.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37 (917): 911 - 917.
- Boyd, C.E., Tucker, C.S. 2012. Pond aquaculture water quality management. Springer Science y Business. Mississippi, USA. 107 - 108 pp.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315-331.
- Capinpin, E.C., Corre, K.G. 1996. Growth rate of the Philippine abalone, *Haliotis asinina* fed an artificial diet and macroalgae. *Aquaculture*, 144 (1-3): 81 – 89.
- Capinpin-Jr., E.C. 2007. Feeding growth and survival of post-larval abalone *Haliotis asinina* on different benthic diatoms. *Science Diliman*, 19: 49 – 59.

- Carbajal-Miranda, M.J. 2001. Evaluación del crecimiento de postlarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens* Swaison, 1822) utilizando como alimento dietas monoespecíficas y mixta de diatomeas bentónicas. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 81 pp.
- Castro-González, M.I., Carrillo-Domínguez, S., Pérez-Gil, F. 1994. Composición química de *Macrocystis pyrifera* (Sargazo gigante) recolectada en verano e invierno y su posible empleo en alimentación animal. *Ciencias Marinas*, 20 (1): 33 - 40.
- Chen, Y. 2007. Immobilization of twelve benthic diatom species for long-term storage and as feed for post-larval abalone *Haliotis diversicolor*. *Aquaculture*, 263: 97–106.
- Correa-Reyes, J.G. 2001. Selección de especies de diatomeas bentónicas para el cultivo del abulón. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 135 pp.
- Correa-Reyes, J.G., Sánchez-Saavedra, M.P., Viana, M.T., Flores-Acevedo, N., Vásquez-Peláez, C. 2009. Effect of eight benthic diatoms as feed on the growth of red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae. *Journal of Applied Phycology*, 21: 387 – 393.
- Cox, K.W. 1962. California Abalones, family Haliotidae. California. Fish Bulletin 18. The resources agency of California. Department of fish and game. Marine Resources Operations. 133: 60-57.
- Cuesta-Gómez D.M., Ruíz-Güereca D.A., Sánchez-Saavedra M.P. 2016. Evaluation of different protein content in formulate diet on growth and survival of juvenile red abalone (*Haliotis rufescens*). *Aquaculture 2016. Memorias del congreso: World Aquaculture Society. National Shellfisheries Association, National Aquaculture Association. Las Vegas, Nevada 22 al 26 de febrero.*
- Cuesta-Gómez, D.M. 2012. Crecimiento e incremento gonadal del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* alimentado con *Macrocystis pyrifera* y *Ulva lactuca* enriquecidas con nutrientes. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 103 pp.
- Demetropoulos, C.L., Langdon, C.J. 2004. Effects of nutrient enrichment and biochemical composition of diets of *Palmaria mollis* on growth and condition of Japanese abalone, *Haliotis discus hannai* and red abalone, *Haliotis rufescens*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 308(2), 185 – 206.

- Díaz, F., del Río-Portilla, M.A., Sierra, E., Aguilar, M., Re-Araujo, A.D. 2000. Preferred temperature and critical thermal maxima of red abalone *Haliotis rufescens*. *Journal of Thermal Biology*, 25 (3): 257 - 261.
- DIFCO Manual. 1985. Difco manual: dehydrated culture media and reagents for microbiology. Difco laboratories.
- Druehl, L. D. 1984. Morphological and physiological responses of *Macrocystis pyrifera* to nitrate enrichment. *Hydrobiologia*, 474: 471 – 474.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350 – 356.
- Durazo-Beltrán, E., Toro-Vázquez, J.F., Vázquez-Peláez, C., Viana, M.T. 2003. Effect of the seaweed *Macrocystis pyrifera* and a formulated diet on growth and fatty acid composition in the green abalone, *Haliotis fulgens*, under commercial culture conditions. *Ciencias Marinas*, 29: 645 – 654.
- Fleming, A.E., Van Barneveld, R.J., Hone, P.W. 1996. The development of artificial diets for abalone: A review and future directions. *Aquaculture*, 140 (1): 50 – 53.
- Fogg G.E. 1964. Environmental conditions and the pattern of metabolism in algae. En Jackson, D. (Ed.), *Algae and Man*. Plenum Press, New York, 77 - 85.
- Fogg, G.E., Thake, B. 1983. *Algal culture and phytoplankton ecology*. University of Wisconsin Press. Londres. 267 pp.
- Foster, S., Schiel, R. 1985. The ecology of giant kelp forests in California: A community profile. US Fish; Wildlife Service Biological Report, Vol. 85. 153 pp.
- Freeman, K.A. 2001. *Aquaculture and related biological attributes of abalone species in Australia – a review*. Fisheries Research Report. Australia. 128 pp.
- Geibel, J., Demartini, J.D., Haaker, P.L., Karpov, K. 2010. Growth of red abalone, *Haliotis rufescens* (Swainson), along the north coast of California. *Journal of Shellfish Research*, 29: 441 – 448.
- Gerard, V.A. 1982. Growth and utilization of internal nitrogen reserves by the giant kelp *Macrocystis pyrifera* in a low-nitrogen environment. *Marine Biology*, 66: 27 – 35.

- Goecke, F., Labes, A., Wiese, J., Imhoff, J.F. 2010. Review chemical interactions between Marine macroalgae and bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 409:267 – 300.
- Goldman J.C., Glibert, P.M. 1982. Comparative rapid ammonium uptake by four species of marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 27: 814 - 827 p.
- González-Fragoso, J., Ibarra-Obando, S.E., North, W.J. 1991. Frond elongation rates of shallow-water *Macrocystis pyrifera* (L) Ag in northern Baja-California, Mexico. *Journal of Applied Phycology*, 3:311 – 318.
- Gordon, N., Neori, A., Shpigel, M., Lee, J., Harpaz, S. 2006. Effect of diatom diets on growth and survival of the abalone *Haliotis discus hannai* postlarvae. *Aquaculture*, 252: 225 – 233.
- Guillard, R.R.L., Ryther, J. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. *Canadian Journal in Microbiology*, 8 (2): 229 – 239.
- Hahn, K.D. 1988. *Handbook of Culture of abalone and Other Marine Gastropods*. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos, Florida. 348 pp.
- Hanisak, M.D. 1983. The nitrogen relationship of marine macroalgae. *Nitrogen in the Marine environment*. Academic, Press, New York. pp. 699 – 730.
- Harrison, P. J., Hurd, C.L. 2001. Nutrient physiology of seaweeds: Application of concepts to aquaculture. *Cahiers de Biologie Marine*, 42 (1 - 2): 71 – 82.
- Harrison, P. J., Druehl, L.D., Lloyd, K.E., Thompson, P.A. 1986. Nitrogen uptake kinetics in three year-classes of *Laminaria groenlandica* (Laminariales: Phaeophyta). *Marine Biology*, 93 (1): 29 – 35.
- Hernández, J., Uriarte, I., Viana, M.T., Westermeier, R., Farías, A. 2009. Growth performance of weaning red abalone (*Haliotis rufescens*) fed with *Macrocystis pyrifera* plantlets and *Porphyra columbina* compared with a formulated diet. *Aquaculture Research*, 40: 1694 – 1702.
- Jarayabhand, P., Paphavasit, N. 1996. A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture*, 140: 159 – 168.
- Jiménez-Valera, S. 2016. Aislamiento y caracterización bioquímica de microalgas de Baja California como alternativas para la producción de lípidos. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 175 pp.

- Jiménez-Valera, S., Sánchez-Saavedra, M.P. 2016. Growth and biochemical composition of microalgae species isolated from the Baja California Peninsula, México. *Latin American Journal of Aquatic Research* 44(4): 689 - 702.
- Joll, L. 1996. Abalone in the wild- life history and habitat in WA. En: Forster, A. (Ed.). *Proceedings of the Abalone Aquaculture Workshop, December 1995, Albany, Western Australia*. Aquaculture Development Council and Fisheries Department of Western Australia. pp 11 - 13.
- Kawamura, T., Roberts, R.D., Takami, H. 1998. A review of the feeding and growth of postlarval abalone. *Journal of Shellfish Research*, 17: 615 - 625.
- Kemp, J.O.G., Britz, P.J., Toledo Aguero, P.H. 2015. The effect of macroalgal, formulated and combination diets on growth, survival and feed utilization in the red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture*, 448: 306 – 314.
- Kopczak, C.D. 1994. Variability of nitrate uptake capacity in *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyta) with nitrate and light availability. *Journal of Phycology*, 30: 573 – 580.
- Ladah, L. B., Zertuche-González, J. 1999. Giant kelp (*Macrocystis pyrifera*, Pkaeophyceae) recruitment near its souther limit in Baja California after mass disappearance during ENSO. *Journal of Phycology*, 35: 1106 – 1112.
- Leighton, D.L. 2000. *The Biology and Culture of the California Abalones*. Dorrance Publishing. Pittsburg, Pensilvania. 216 pp.
- Levy, M.N., Koeppen, B.M., Stanton, B.A. 2006. *Principios de fisiología*. 4th ed. Madrid, Elsevier España. 257 pp.
- Liu, J., Vyverman, W. 2015. Differences in nutrient uptake capacity of the benthic filamentous algae *Cladophora* sp., *Klebsormidium* sp. and *Pseudanabaena* sp. under varying N/P conditions. *Bioresource Technology*, 179:234–42.
- Lobban, C., Harrison, P.J. 1996. *Seaweed Ecology and Physiology* Harrison: Books. Cambridge University Press. New York. 295 pp.
- Lovell, L., Langstroth, L., Newberry, T. 2000. *A living bay: the underwater world of Monterey Bay*. University of California Press. 244 pp.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265 - 275.
- Lucas, C.E. 1947. The ecological effects of external metabolites. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 22 (3): 270 – 95.
- Maestrini, S.Y., Bonin, D.J. 1981. Allelopathic relationships between phytoplankton species. En: *Physiological bases of phytoplankton ecology*. T. Platt. (Ed.). Department of Fisheries and Oceans. *Canadian Bulletin Fisheries and Aquatic Science* 29: 323 – 338 pp.
- Maguire, G.B., 1998. Nitrogen budgets for land-based abalone farms. A discussion document. En: Hone, P. (Ed). *Proceedings of the 5th Annual Abalone Aquaculture Workshop, July, 1998, Hobart, Tasmania*. Fisheries Research and Development Corporation. pp 88 - 92.
- Manley, S.L., North, W.J. 1984. Phosphorus and the growth of juvenile *Macrocystis pyrifera* (Paeophyta) Sporophytes. *Journal of Phycology* 20: 389 – 393.
- Mardones, A., Cordero, R., Augsburger, A., De los Ríos-Escalante, P. 2015. Desarrollo del ensilado del alga *Gracilaria chilensis* para la alimentación del abalón rojo *Haliotis rufescens*. (Spanish). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43:295–303.
- Martínez, A.M., Barajas, F.M., Jaramillo, M.C.R., Serrano, A.P., Castro, H.L., Villanueva, M.R. 1994. Desarrollo científico y tecnológico del cultivo del abulón. Manual. Dirección General de Acuicultura. Secretaría de Pesca, México. 77 pp.
- McBride, S., Conte, F.S. 2000. California abalone aquaculture. Inform. Department of Animal Science Universidad de California. California Aquaculture, USA: 1–5 pp.
- McCormick, T.B. 2000. Abalone (*Haliotis* spp.) aquaculture: present status and stock enhancement tool. pp. 55 – 60. En: A. Campbell (Ed.). *Workshop on Rebuilding Abalone Stocks in British Columbia*. Canada: NRC Research Press. 693 pp.
- Medlin, L.K. 2002. Why silica or better yet why not silica? speculations as to why the diatoms utilise silica as their cell wall material. *Diatom Research*, 17(2):453–459.
- Menéndez, M., Herrera, J., Comín, F.A. 2002. Effect of nitrogen and phosphorus supply on growth , chlorophyll content and tissue composition of the macroalga *Chaetomorpha linum* (O.F. Müll.) Kütz in a Mediterranean coastal lagoon. *Scientia Marina*, 66 (4): 355 – 364.

- Montaño-Vargas, J., Viana, M.T., Abramo, L.R.D., Shimada, A., Vásquez-Peláez, C. 2005. Growth and energy utilization of juvenile pink abalone *Haliotis corrugata* fed diets containing different levels of protein and two starch: lipid ratios. *Journal of Shellfish Research*, 24 (1): 127 – 137.
- Morgan, K.C., Simpson, F. J. 1981. The cultivation of *Palmaria palmata*. Effect of light intensity and temperature on growth and chemical composition. *Botánica Marina*, 24: 547 – 552.
- Muñoz-Muñoz, L.A. 2009. Variedades mejoradas de *Macrocystis pyrifera* (L.) C. AG y *Macrocystis integrifolia* y su utilización en la alimentación de abalón rojo, *Haliotis rufescens* Swainson. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile, Escuela de Acuicultura y Pesquerías, Chile. 52 pp.
- Myklestad, S., Haug, A. 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 9 (2): 125 – 136.
- Orth, R.J., Montfrans, J. Van. 1984. Epiphyte seagrass relationships with an emphasis on the role of micrograzing: A review. *Aquatic Botany*, 18 (1040): 43 – 69.
- Ortiz, J., Uquiche, E., Robert, P., Romero, N., Quitral, V., Llantén, C. 2009. Functional and nutritional value of the Chilean seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystis pyrifera*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111 (4): 320 – 327.
- Pande, S.V, Parvin, R., Venkitasubraimanian, T.A. 1963. Microdetermination of lipids and serum total acids. *Analytical Biochemistry*, 17: 415 – 423.
- Penhale, P.A., Thayer, G.W. 1980. Uptake and transfer of carbon and phosphorus by eelgrass (*Zostera Marina* L.) and its epiphytes. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 42 (79): 113 - 123.
- Ponce-Díaz, G., Sánchez-Hernández, S., Yuen-Sánchez, E. 2003. Estudio de la Cadena Productiva de Abulón. CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, México). Baja California, 78 pp.
- Poore, G.C.B., 1972. Ecology of New Zealand abalones, *Haliotis* species (Molusca: Gastropoda). *New Zealand Journal of Marine Freshwater Research*, 6 (1 and 2): 534 - 559.
- Porta-Vales, A. 2009. Optimización del cultivo de diatomeas bentónicas para el cultivo de post-larvas de abalón (*Haliotis tuberculata coccinea* Reeve, 1846). Tesis de Maestría. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. España. 126 pp.

- Qian, P. Y., Lau, S. C. K., Dahms, H. U., Dobretsov, S., Harder, T. 2007. Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: Implications for antifouling and aquaculture. *Marine Biotechnology*, 9 (4): 399 – 410.
- Redfield, A.C. 1933. On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. University Press of Liverpool, James Johnston Memorial Volume. Reino Unido. 176 - 192 pp.
- Reynolds, C. 2006. Ecology of Phytoplankton. Growth and replication of phytoplankton. Cambridge University Press. 1st ed., Vol. 1. 435 pp.
- Rhee, G.Y. 1978. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. *Limology and Oceanography*, 23: 10 - 25.
- Rodríguez-Montesinos, Y.E., Hernández-Carmona, G. 1991. Seasonal and geographic variations of *Macrocystis pyrifera* chemical composition at the western coast of Baja California. *Ciencias Marinas*, 17: 725 - 736.
- Romero, C.C.R. 2015. Efecto de la absorción y de la composición espectral de la luz sobre el crecimiento y la composición proximal de *Amphora* sp. y su influencia en la preservación en frío y en la criopreservación. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 124 pp.
- Rosen, G., Langdon, C.J., Evans, F. 2000. The nutritional value of *Palmaria mollis* cultured under different light intensities and water exchange rates for juvenile red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture*, 185(1 - 2): 121 – 136.
- Ruíz-Güereca, D.A., Cuesta-Gómez D.M., Sánchez-Saavedra M.P. 2016. Growth of juvenile red abalone (*Haliotis rufescens*) fed with giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) enriched with nutrients. World Aquaculture Society. National Shellfisheries Association, National Aquaculture Association. Las Vegas, Nevada.
- Rupérez, P. 2002. Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*, 79 (1): 23 – 26.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación). 2012. Carta Nacional Acuícola. México. Diario Oficial. Segunda Sección. 6 de junio. 80 pp.

- Sánchez-Saavedra M.P. 2004. El uso de microalgas bentónicas en la acuicultura. En: L.R., Martínez-Córdova, M. Martínez-Porchas (Eds.). Alimento natural en acuicultura. AGT Editor, México. 136 pp.
- Sánchez-Saavedra M.P., Voltolina, D., Simental, J.A., Carbajal-Miranda, M.J. 2008. Removal of epiphytes of the kelp *M. pyrifera* (L.) Agardh using different biocides. *Hidrobiologica*, 18: 99 – 104.
- SEPESCA. 1993. NORMA Oficial Mexicana 005-PESC-1003. México.
- Shepherd, S.A., Tegner, M.J., Guzmán, S.A. 1992. Abalone of the World: Biology, Fisheries and Culture (1 edición). Fishing News Books. Cambridge. 608 pp.
- Simental, J. A., Sánchez-Saavedra, M.P. 2003. The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aquacultural Engineering*, 27:265 – 272.
- Simental, J.A., Sánchez-Saavedra, M.P., Carbajal-Miranda, M. 2004. Growth and survival of juvenile of red abalone (*Haliotis rufescens*) fed with macroalgae enriched with a benthic diatom biofilm. *Journal of Shellfish Research*, 23 (4): 995 - 999.
- Simental-Trinidad, J.A. 2004. Enriquecimiento de láminas de *Macrocystis pyrifera* con películas de *Navicula incerta* y su utilización como alimento para juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*). Tesis doctoral. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 112 pp.
- Siqueiros-Beltrones, D.A., Argumedo-Hernández, U. 2008. Cambios en la estructura de la asociación de diatomeas epifitas de *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Ag. *Acta Botánica Mexicana*, 82(66): 43 – 66.
- Siqueiros-Beltrones, D.A., Argumedo-Hernández, U. 2015. Diatomeas epifitas consumidas por adultos de abulón (*Haliotis* spp.) en Baja California Sur, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86 (1): 111 – 122.
- Siqueiros-Beltrones, D.A., Serviere-Zaragoza, E., Hernández, U.A. 2002. Epiphytic diatoms of *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Ag. from the Baja California Península, México. *Océánidas*, 17: 31 - 39.
- Siqueiros-Beltrones, D.A., Valenzuela-Romero, G., Hernández-Almeida, O.U., Argumedo-Hernández, U., López-Fuerte, F.O. 2004. Catálogo iconográfico de diatomeas de hábitats rocosos y su incidencia en la dieta de abulones (*Haliotis* spp.) juveniles de Baja California Sur, México. *Océánidas*, 19 (2): 29 – 103.

- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321 - 343. En: Stein (Ed.). Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Nueva York: Cambridge University Press. 448 pp.
- Steinberg, P.D., Nys, R. 2002. Chemical mediation of colonization of seaweed surfaces. *Journal of Phycology*, 38(4): 621–629.
- Stewart, C.J. 2015. The in situ nitrogen (ammonium and nitrate) uptake kinetics of *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh: applications for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in Big Glory Bay, Stewart Island, New Zealand. Tesis de maestría. Universidad de Otago. Nueva Zelanda. 126 pp.
- Tacon, A.G.J. 1990. Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. Argon Laboratories Press, Redmond. Washington, USA. 453 pp.
- Trocine, R.P., Rice, J.D., Wells, G. N. 1981. Inhibition of seagrass photosynthesis by ultraviolet-B radiation. *Plant Physiology*, 68: 74 - 81.
- Uki, N., Kemuyama, A., Watanabe, T. 1985. Nutritional evaluation of several protein sources in diets for abalone *Haliotis discus hannai*. *Bulletin of the Japan Society for the Science and Fish*, 51: 1835-1839.
- Vega-Villasante, F., Cupul-Magaña A., Nolasco-Soria H., O. Carrillo-Farnés. 2006. Las algas marinas *Sargassum* spp. y *Macrocystis pyrifera*: ¿Una alternativa para el forraje del ganado bovino en la península de Baja California?. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 40 (4): 439 - 448.
- Viana, M.T. 1998. Nutrición de Abulón. En R. Civera-Cerecedo, C. J. Pérez-Estrada, D. Ricque-Marie, y L.E. Cruz-Suárez (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. La Paz, Baja California Sur. pp. 33 – 41.
- Viana, M.T., López, L.M., Salas, A. 1993. Diet development for juvenile abalone *Haliotis fulgens* evaluation of two artificial diets and macroalgae. *Aquaculture*, 117: 149 – 156.
- Vivanco-Aranda, M., Gallardo-Escárate, C.J., del Río-Portilla, M.Á. 2011. Low-density culture of red abalone juveniles, *Haliotis rufescens* Swainson 1822, recirculating aquaculture system and flow-through system. *Aquaculture Research*, 42 (2): 161 – 168.
- Wheeler, P.A. 1979. Uptake of methylamine (an ammonium analogue) by *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta). *Journal of Phycology*, 15: 12 – 17.

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.

Zaytsev, O., Cervantes-Duarte, R., Montante, O., Gallegos-García, A. 2003. Coastal upwelling activity on the Pacific shelf of the Baja California Peninsula. *Journal of Oceanography*, 59(4): 489-502.