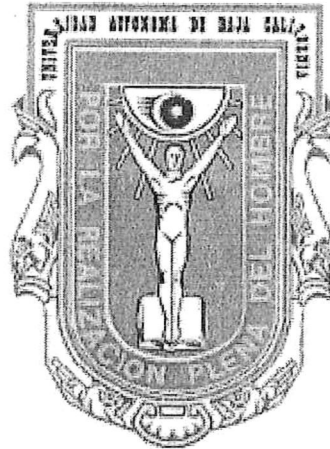
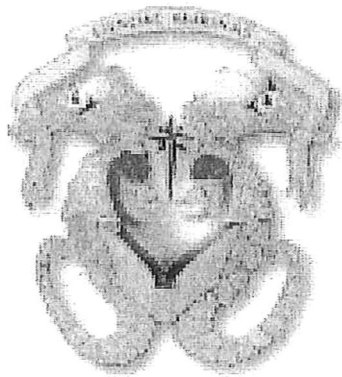


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LARVAS
FIJADORAS Y POSLARVAS DE OSTIÓN JAPONÉS (*Crassostrea*
gigas) EN PRESENCIA DE ALIMENTO VIVO E INERTE.



TESIS
Que para obtener el título de
OCEANOLOGO
PRESENTA:
Monica Irania Hernandez Luna

Ensenada, Baja California, Diciembre de 2005.


RESUMEN

Se determinó el crecimiento (talla, peso), mortalidad y contenido bioquímico (energía bruta, carbono y nitrógeno elemental, razón P:E y razón C:N) de larvas fijadoras y poslarvas tempranas (hasta 3 semanas de edad) del ostión japonés de *Crassostrea gigas*. Las poslarvas fueron alimentadas con microalgas vivas (*Thalassiosira pseudonana* e *Isochrysis aff. galbana* (clon T-Iso) y alimento inerte Algamac 2000 (ALG-2000) con el fin de establecer valores de referencia de acuerdo a su estado nutricional. Durante la metamorfosis la razón C:N aumentó de 7.87 a 23.17 en la concha y en el tejido disminuyó de 4.96 a 4.14. También disminuyó significativamente la energía bruta en un 30%, así como el contenido absoluto de carbono en el tejido y de nitrógeno en la concha, mientras que la razón P:E aumentó de 23.3 a 35.47. Lo anterior sugiere que la energía perdida durante la metamorfosis fue obtenida principalmente de las proteínas de la concha y lípidos del tejido. En etapa poslarval la mayor talla se observó en los organismos alimentados con el tratamiento THA ($1,669 \pm 30 \mu\text{m}$, $67.43 \mu\text{m}/\text{día}$) y la menor en el tratamiento con ALG-2000 ($541 \pm 6.12 \mu\text{m}$, $0.51 \mu\text{m}/\text{día}$). Los organismos sometidos a THA también mostraron la menor mortalidad acumulada después de tres semanas (47.2%) en comparación con los de ALG-2000 (86.3%). Al final del experimento los organismos alimentados con THA exhibieron una razón C:N en el tejido de 3.5, y un aumento de la razón P:E de 72.25 mg proteína/KJ. En contraste, los organismos ALG-2000 mostraron una razón C:N en el tejido de 4.9 y una razón P:E de 48.45 mg proteína/KJ. Se concluye que la dieta comercial Algamac 2000 no es apta para el cultivo de poslarvas tempranas de *C. gigas*, ya que produce un mínimo de crecimiento ($0.51 \mu\text{m}/\text{d}$). Asimismo, la combinación de las razones C:N y P:E del tejido reflejan la calidad de la dieta en poslarvas de *C. gigas* de tres semanas de edad. Se sugiere que los valores de P:E de 72.25 mg proteína/kJ, y de C:N entre 3.5 y 4.7 reflejan una dieta de buena calidad (THA). Valores de P:E de 48.44 mg proteína/kJ y de C:N >5 reflejan una dieta de mala calidad (ALG-2000).


CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LARVAS
FIJADORAS Y POSLARVAS DE OSTIÓN JAPONÉS (*Crassostrea*
gigas) EN PRESENCIA DE ALIMENTO VIVO E INERTE.

T E S I S
QUE PRESENTA:
Monica Irania Hernandez Luna

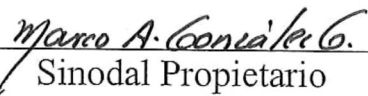
Aprobada por:



Presidente del Jurado
Dr. Zaúl García Esquivel



Sinodal Propietario
M.C. Enrique Valenzuela E.



Sinodal Propietario
M.C. Marco A. González G.

DEDICATORIA

A mi padre que en gloria este, al darme fuerza para salir adelante en los momentos más difíciles.

A mi madre quien supo comprenderme y buscar lo mejor para mi, dándome la oportunidad de salir adelante y luchar por un futuro mejor.

A mis hermanos
Claudia, Vanessa y a mis amores Francisco y Marcos.

A mis viejitos queridos Victorino Hernández y Leonor Luna quienes fueron otros padres para mi.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Autónoma de Baja California por el apoyo a través de la beca tesis en el proyecto de la 10s Convocatoria UABC titulado “Uso de micropartículas inertes como fuente de alimento para poslarvas tempranas del ostión, *Crassostrea gigas*”

A mi director de tesis, el Dr. Zaúl García Esquivel por su apoyo, tiempo y paciencia y sobre todo por darme la oportunidad de haber trabajado en este proyecto.

A mis sinodales MC. Enrique Valenzuela Espinosa y al Oc. Marco Aurelio González Gómez por el tiempo dedicado a la revisión de este escrito, así como sus comentarios y apoyo.

Agradezco con todo mi corazón a la familia Ponce Mendoza por su cariño y apoyo incondicional durante la carrera, en especial a la Sra. Albertina y Don Román, por ser una gran familia muchas gracias.

A la familia Ocampo Mendoza por sus consejos y apoyo incondicional.

A la familia Escoto Esparza por su apoyo incondicional durante la carrera, en especial a la Sra. Raquel Esparza por su cariño y apoyo.

A mi gran amigo Ildefonso García Galván por su amistad cariño y apoyo cuando mas lo necesite.

A mis amigas Karina y Lupita Lugo por su cariño y comprensión y por los momentos de apoyo, tristezas y alegrías que compartimos.

A la psicóloga Carmen Meza por su apoyo, cariño y comprensión.

INDICE

	Página
RESUMEN	i
PÁGINA DE APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE	v
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ANEXOS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Reservas Endógenas y metamorfosis	5
2.2 Tasas de Crecimiento	6
2.3 Mortalidad	7
2.4 Alimento	8
2.5 Razón P:E	8
2.6 Razón C:N	9
3. OBJETIVOS	11
4. METODOLOGÍA	12
4.1 Diseño General	12
4.2 Evaluaciones	13

4.3	Peso	14
4.4	Talla	14
4.5	Mortalidad	15
4.6	Energía	15
4.7	Carbono, Nitrógeno y Proteínas Totales	16
4.8	Estadística.....	17
5. RESULTADOS	18
5.1	Metamorfosis	18
5.2	Post-metamorfosis	19
6. DISCUSIÓN	23
6.1	Metamorfosis	23
6.2	Post-metamorfosis	26
7. CONCLUSIÓN	31
8. BIBLIOGRAFIA	32
9. TABLAS	39
10. FIGURAS	42
11. ANEXOS	44

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Contenido porcentual de carbono y nitrógeno orgánico en organismos completos, tejido (peso libre de ceniza), y concha de larvas pre-metamórficas (día 0) y poslarvas tempranas del ostión <i>Crassostrea gigas</i> . Las poslarvas fueron alimentadas con tres tratamientos distintos: <i>Thalassiosira pseudonana</i> , <i>Isochrysis aff. galbana</i> (Clone T-Iso) y microalgas comerciales inertes (<i>Algamac 2000</i>)	40
Tabla 2.	Cambios corporales absolutos en el contenido orgánico (peso libre de cenizas, PLC), cenizas, energía bruta, carbono (C) y nitrógeno (N) de <i>Crassostrea gigas</i> , durante el período de metamorfosis. Los promedios con distintos subíndices dentro de una misma variable indican diferencias significativas (Prueba t-Student, $\alpha < 0.05$) entre la etapa de larva pre-metamórfica (día 0) y poslarva recién metamorfozadas (día 2)	41
Tabla 3.	Contribución del tejido y la concha de <i>C. gigas</i> a las pérdidas relativas (en paréntesis) y absolutas de carbono (C) y nitrógeno (N) durante la metamorfosis. Los promedios con distintos subíndices dentro de una misma variable indican diferencias	

significativas (Prueba t-Student, $\alpha < 0.05$) entre la etapa de larva pre-metamórfica (día 0) y poslarva recién metamorfozadas (día 2).

PGN = Pérdidas o ganancias netas 41

Tabla 4. Ecuaciones de ajuste lineal para los cambios en la talla (T_a , $\mu\text{m}/\text{ind}$), peso seco (P_s , $\mu\text{g}/\text{ind}$) y peso libre de ceniza (PLC , $\mu\text{g}/\text{ind}$) de *Crasostrea gigas* en función del tiempo (días, d). Las poslarvas fueron alimentadas con las microalgas *Thalassiosira pseudonana* (THA), *Isochrysis galbana* (T-ISO) y el alimento comercial Algamac 2000 (ALG-2000) 42

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1 Cambios temporales en la talla (a), peso seco (b), peso libre de cenizas (c, PLC, línea continua), proteínas (c, línea discontinua) y mortalidad acumulativa (d) en larvas pre-metamórficas y poslarvas tempranas de <i>Crassostrea gigas</i> . Las poslarvas fueron alimentadas con las microalgas <i>Thalassiosira pseudonana</i> (THA), <i>Isochrysis aff. galbana</i> (Clone T-Iso) y alimento comercial Algamac 2000 (ALG-2000). La línea punteada indica que no hubo datos durante ese período	43
Fig. 2 Cambios temporales en el contenido de energía bruta del tejido (a), razón proteína:energía del tejido (b, P:E), y razón carbono:nitrógeno (C:N) de la concha (c) y el tejido (d) de larvas pre-metamórficas y poslarvas tempranas de <i>Crassostrea gigas</i> . Las poslarvas fueron alimentadas con las microalgas <i>Thalassiosira pseudonana</i> (THA), <i>Isochrysis aff. galbana</i> (Clone T-Iso) y alimento comercial Algamac 2000 (ALG-2000). La línea punteada indica que no hubo datos durante ese período	44

LISTA DE ANEXOS

	Página
ANEXO I Pruebas t-Student aplicadas para comparar los promedios de talla, peso seco, proteínas totales, energía bruta, y contenido porcentual de carbono y nitrógeno orgánico en larvas pre-metamórficas (día 0) y poslarvas metamorfizadas (día 2) de <i>Crassostrea gigas</i> . Las comparaciones del contenido de carbono y nitrógeno se realizaron en organismos completos, así como en la concha, y el tejido del organismo. t = estadístico de prueba, gl = grados de libertad, p = probabilidad de rechazo de H_0	45
ANEXO II Análisis de varianza para comparar el efecto de tres tipos de alimento sobre la talla, peso seco, peso libre de ceniza, mortalidad acumulada, y contenido porcentual de carbono y nitrógeno orgánico en poslarvas de <i>Crassostrea gigas</i> , de 22 días de edad. Las comparaciones del contenido de carbono y nitrógeno se realizaron en organismos completos, así como en la concha, y el tejido del organismo. Las poslarvas fueron alimentadas con tres tratamientos distintos: <i>Thalassiosira pseudonana</i> , <i>Isochrysis aff. galbana</i> (Clone T-Iso) y microalgas comerciales inertes (Algamac 2000). gl = grados de libertad, SS = suma de cuadrados, MS	

	media cuadrada, F = estadístico de prueba, p = probabilidad de rechazo de H_0	46
ANEXO III	Datos crudos y promedios de carbono y nitrógeno en organismos completos de <i>C. gigas</i>	47
ANEXO IV	Datos crudos y promedios de carbono y nitrógeno en tejido de <i>C. gigas</i>	48
ANEXO V	Datos crudos y promedios de carbono y nitrógeno en concha de <i>C. gigas</i>	49

1. INTRODUCCIÓN

Una de las etapas más importantes durante el desarrollo de los moluscos bivalvos es la metamorfosis y la primera semana después de la metamorfosis. Durante la metamorfosis se pueden presentar varios problemas, entre los que se encuentran una baja sobrevivencia post-metamórfica, pérdida de peso, alta mortalidad y disminución de reservas energéticas. Por lo tanto, es de esperarse que una baja calidad nutricional de larvas pre-metamórficas incida en la magnitud de la mortalidad que se registra durante el desarrollo temprano de la poslarva. En Bahía San Quintín se presentaron altas mortalidades de ostiones juveniles y adultos durante el período 1998-2001. Actualmente se siguen presentando con menor intensidad, pero hasta la fecha no se sabe cuales son las causas responsables de ese suceso. Esto también ha sido reportado en bahías de Sonora y el norte de California (García-Esquivel et al., 1999). También se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la tasa de crecimiento de las poslarvas tempranas de *C. gigas* y la tasa de crecimiento en lotes de larvas de lento, mediano y rápido crecimiento (Collet et al., 1999).

La calidad nutricional de un organismo es un término difícil de definir, ya que para establecer un criterio de calidad es necesario identificar los niveles de reservas de micro o macromoléculas las cuales producen cambios sustanciales en la tasa de crecimiento y/o mortalidad. Asimismo, los primeros estudios sobre requerimientos energéticos de larvas/poslarvas de moluscos bivalvos se enfocaron al estudio de reservas lipídicas (Holland y Spencer, 1973; Waldock y Nascimento, 1979). Posteriormente se llegó a la conclusión que tanto las reservas energéticas de lípidos como proteínas tienen un papel

crítico en la metamorfosis de ostiones y almejas (ej. Rodríguez et al., 1990; Videla et al., 1998; Farias et al., 1998; García-Esquivel, 2001).

La disponibilidad de equipo para evaluar de forma rápida la composición elemental y energética de organismos en muestras pequeñas ha permitido estudiar los cambios en la composición bioquímica/nutricional, usando un mayor número de réplicas y mejor resolución. Se han realizado estudios de composición elemental de carbono (C) y nitrógeno (N) en peces (Pfeiler et al., 1998), copépodos (Van-Nieuwerburgh et al., 2004; Koski, 1999; Walbe y Larsson, 1999), lombrices (Schmidt et al., 1999), Crustáceos (Gorokhova y Hansson, 2000) y bivalvos (Williams y McMahon, 1989) con el fin de establecer la razón C:N típica de estos organismos.

Los valores de C y N por si solos no muestran datos dinámicos, pero la cuantificación de estos a lo largo del tiempo permiten saber si uno o ambos elementos están cambiando. Por lo tanto es posible asociar esos cambios con los niveles relativos de proteínas, lípidos y carbohidratos. Por este motivo se usa la razón C:N para detectar la acumulación o disminución relativa de proteínas en el tejido de un organismo. Como las proteínas componen aproximadamente el 16% del nitrógeno total, y basado en este conocimiento se obtuvo el valor típico de 5.8 para convertir el nitrógeno orgánico elemental de un organismo acuático a proteína total (Gnaiger y Bitterlich, 1984). Por lo tanto, la cuantificación del nitrógeno orgánico no solo permite calcular proteínas del tejido de un organismo, sino también conocer si estas aumentan o disminuyen en relación a la dupla lípidos-carbohidratos por medio de la razón C:N. La razón de esto es que solo las proteínas contienen nitrógeno. Por lo tanto, un aumento en la razón C:N

implica una disminución en la cantidad relativa de proteínas en el tejido, mientras que valores bajos de C:N implican un aumento en la cantidad relativa de proteínas. Con excepción de fitoplancton, en la mayoría de las especies animales se desconoce que valor de la razón C:N representa una condición nutricional “pobre” o “buena”, por lo que es necesario establecer valores de referencia específicos de C:N, energía bruta y ver si existe una relación entre estas variables y las tasas de crecimiento y mortalidad.

Hasta ahora los criterios de calidad larval y poslarval de moluscos bivalvos están limitados a la evaluación de un cierto grupo de bacterias y protozoarios patógenos. No obstante, la ausencia de estos microorganismos no garantiza que la larva/poslarva sea de buena calidad, ya que esta última depende entre otros factores de la condición nutricional y genética. Un organismo con baja reserva energética probablemente sea incapaz de llegar más allá de un cierto estadio de desarrollo. En los últimos años la demanda de semilla de ostión por parte de los acuicultores en la parte sur de Ensenada se ha incrementado (observación personal), por lo que es importante determinar valores de referencia en la calidad nutricional (bioquímica) de larvas fijadoras y poslarvas tempranas. Es probable que una parte de la mortalidad de ostión reportada en el período 1998-2000 (García-Esquivel et al. 2004) tenga una relación con la cantidad de reservas presentes en las larvas pre-metamórficas compradas en Estados Unidos.

Por otra parte, la condición nutricional de un organismo depende fuertemente de la calidad del alimento que ingiere, entendiendo por calidad todos aquellos atributos (tamaño, palatabilidad, digestibilidad, composición bioquímica) que hacen que el alimento no solamente se ingiera, sino que también se incorpore en forma de tejido.

Brown y McCausland (2000) evaluaron el crecimiento de juveniles de ostión *Crassostrea gigas* alimentados con microalgas (*Isochrysis sp.*) y dietas secas (Algamac 2000, Microfeast MB-30) como alimento suplementario. Los autores encontraron que el crecimiento de los organismos en presencia de alimento vivo fue hasta dos veces mayor que en las dietas secas, lo cual sugiere que el uso de estos tratamientos puede ser importante para cuantificar los cambios en las reservas nutricionales de los organismos con “pobre” y “buen” crecimiento. También se han realizado estudios con Algamac 2000 como alimento para enriquecer el alimento de copépodos y nauplios de *Artemia* (Shields et al., 1999) y rotíferos (Pousao et al., 2001).

En el presente estudio se determinaron los cambios en la composición bioquímica de larvas fijadoras y poslarvas de ostión japonés *Crassostrea gigas* bajo distintas condiciones de alimentación, con el fin de establecer valores de referencia que permitan establecer criterios de calidad referentes al estadio nutricional de *C. gigas*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Reservas Endógenas y Metamorfosis

La metamorfosis en moluscos bivalvos se caracteriza por cambios morfológicos drásticos en un período corto (24 a 48 h), que inicia con el asentamiento de la larva. Entre los cambios más evidentes se incluyen la migración del ano y la boca, la sustitución del velum por las branquias, la aparición del músculo aductor, desaparición de la mancha ocular, y generación de la disoconcha (Baker y Mann, 1994).

El uso de reservas endógenas durante la metamorfosis es intenso, y refleja la incapacidad de los bivalvos para capturar partículas de alimento durante este período (Sastry, 1979; Hickman y Groffydd, 1971; Holland, 1978; Waller, 1981). En general, las proteínas y lípidos tienen una función crítica durante la metamorfosis de distintas especies de ostras. Videla et al. (1998) mencionan que la disminución en el peso seco de las larvas de *Ostrea chilensis* durante la metamorfosis ocurre a expensas de la materia orgánica, principalmente de proteínas, lípidos y carbohidratos, ya que la materia inorgánica continúa casi constante. En esta especie las proteínas contribuyen con el 61.5 %, los lípidos con 24.6 % y los carbohidratos con el 13.9 % de los 12.77 mJ de energía requerida por *O. chilensis* para completar la metamorfosis en un período de 36 h, además mencionan que las proteínas y lípidos son la principal fuente de energía durante la metamorfosis en *O. chilensis* contribuyendo con 69.3 y 24.3% de la energía total requerida en ese período, mientras que los carbohidratos aportan solo el 6.4%. Rodríguez et al. (1990) encontraron que la energía catabolizada durante la metamorfosis de *O. edulis* fue aportada principalmente por las proteínas (62%), seguida por lípidos

(28%) y carbohidratos (10%). También Bartlett (1979) demostró que *Crassostrea gigas* acumula más energía en forma de proteínas que lípidos neutrales durante la etapa larval tardía, lo cual sugiere que en estas especies las proteínas son las principales reservas de energía durante la metamorfosis, y concuerda con lo propuesto por His y Maurer (1988) y Rodríguez et al. (1990).

Labarta et al., (1999) encontró una pérdida de energía total de 3.1 KJ/gr, equivalente al 51.5% del contenido de energía durante la metamorfosis de *O. edulis*. Esta pérdida estuvo acompañada de una disminución en el porcentaje de lípidos y el aumento en el porcentaje de proteínas con respecto al estadio larval. De las pérdidas totales de energía durante la metamorfosis, los lípidos contribuyeron con el 52.1%, 6.1 % de carbohidratos y 41.7 % de proteínas. García-Esquivel et al., (2001) reportaron una pérdida de energía relativa del 25% en *C. gigas*, durante la metamorfosis en dos lotes de ostiones de baja sobrevivencia, y en lotes de alta sobrevivencia obtienen una pérdida entre 16.3-16.5% de energía. Los lípidos contribuyeron entre un 34% y 62% de la energía total perdida durante la metamorfosis, en la cual las proteínas contribuyen entre 66 y 38%.

2.2. Tasas de Crecimiento

Labarta et al., (1999) menciona que durante la metamorfosis en *O. edulis*, las altas tasas de crecimiento corresponden al peso inorgánico (0.254 $\mu\text{g}/\text{ind}$), como un indicador en el crecimiento de la concha, y una disminución de la energía total en cada uno de los sustratos bioquímicos (proteínas, lípidos y carbohidratos). En la etapa poslarval las altas tasas de crecimiento continúan en la concha (0.194 $\mu\text{g}/\text{ind}$), obteniendo un incremento

de la energía en cada una de las variables bioquímicas. Las tasa de crecimiento durante la metamorfosis hasta las 72 h fueron de 0.181 μm y en poslarvas de 0.63 μm en un periodo de 72h-10 días. García-Esquivel et al. (2001) reportaron en larvas metamórficas de 4 lotes diferentes una tasa de crecimiento entre 9-82 $\mu\text{m}/\text{día}$, y de 64.7-115 $\mu\text{m}/\text{día}$ en poslarvas de una semana de edad.

2.3. Mortalidad

La mortalidad se puede deber a una diferencia energética, variabilidad genética, o acumulación limitada de reservas energéticas, entre otros. Durante el proceso de metamorfosis las mortalidades documentadas en la bibliografía son variables: para *Crassostrea gigas*, Utting (1986) señala una mortalidad entre 3-11 % en el proceso de la metamorfosis. Chu et al. (1987) señalan un 50% y Osman et al. (1989) observan un 20% en *Crassostrea virginica* en el mismo periodo. Labarta (1997) atribuye que cuando la mortalidad se aproxima al 50 % en *O. edulis* es debido prácticamente a un agotamiento de las reservas lipídicas, y es cuando la larva usa reservas proteicas. Por otra parte Rodríguez et al., (1990) menciona que una posible causa de alta mortalidad se debe a un inadecuado almacenamiento de energía en las larvas antes de la metamorfosis. García-Esquivel (2001) encontraron un porcentaje de mortalidad acumulativo inferior al 25 % en un periodo de 0-2 días post-asentamiento, en 4 lotes de larvas de *Crassostrea gigas* (3.2, 10.1, 18.5 y 24 %), y un porcentaje de mortalidad poslarval por abajo del 52 %, dentro de la primera semana post- fijación, siendo diferente en cada uno de los lotes (19.7, 8.7, 52.3 y 49.7 %).

2.4. Alimento

Brown y McCausland (2000) evaluaron el crecimiento en poslarvas de 400-500 μm de Ostión *Crassostrea gigas* alimentados con microalgas (*Isochrysis sp.*) y dietas secas (Algamac 2000, Microfeast MB-30) como alimento suplementario. Encontraron que el crecimiento de los organismos en presencia de alimento vivo después de 26 días fue hasta dos veces mayor que en las dietas secas. Por otra parte Utting (1986) recomienda el uso de dietas microalgales ricas en proteínas en el cultivo larvario de *Crassostrea gigas* antes de la metamorfosis, obteniendo después de esta etapa un crecimiento en la concha mayor en dietas con bajo contenido proteico.

2.5. Razón P:E

El porcentaje de energía total es derivado tanto de ingredientes proteicos como no proteicos, esto puede ser expresado por medio de la razón entre la proteína y la energía bruta de la dieta de los organismos. De esta manera la razón P:E de una dieta indica la importancia relativa de las proteínas con respecto al contenido calórico total (Steffens, 1989; Gómez-Montes, 2002).

Debido a la importancia de la razón P:E, se han realizado diversos estudios en alimento, utilizando dietas con diferente contenido proteico y energético, y así determinar el efecto de estas en el crecimiento y metabolismos de los organismos. Algunos de ellos son, en el camarón *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris* (Cruz et al. 2001), en abulón *Haliotis fulgens* (Gómez-Montes et al. 2003) y peces (Li y Novell, 1992; Coloso et al. 1988), pero aun no se conoce la importancia de la razón P:E como

indicador del estado nutricional en organismos directamente, siendo este el primer trabajo donde se obtiene la razón P:E en larvas y poslarvas del ostión japonés *C. gigas*.

2.6. Razón C:N

Se han realizado estudios de razón C:N en crustáceos, *Mysis mixta* (Gorokhova y Hansson, 2000), en peces (Pfeiler et al., 1998), copépodos (Van-Nieuwerburgh et al. 2004; Koski, 1999; Walve y Larsson, 1999), lombrices de tierra (Schmidt et al. 1999). Sin embargo, no se conocen estudios realizados en ostiones, por lo que los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuirán a establecer los valores de referencia de C y N bajo distintas condiciones nutricionales en larvas y poslarvas de *Crassostrea gigas*.

Gorokhova y Hansson, 2000 encontraron una razón C:N de 3.8 en juveniles de 7-12 mm en *Mysis mixta*, y 42.9 % de C y 11.2 % de N durante el crecimiento y maduración de hembras y machos. Pfeiler et al., (1998) obtiene una razón C:N de 4.23 y 4.03 en larvas metamórficas (Leptocephali) tempranas (58.4 mm) y avanzadas (31mm) en el pez sábalo (*Albula sp*). Por otra parte en los copépodos *Centropages sp.* y *Pseudos/Paracalanus spp.* se obtuvieron razones de C:N de 5.5-6 (Van-Nieuwerburgh et al. 2004). Koski, (1999) obtuvo en copépodos una razón C:N de 4 en *Euriterma affinis* y 4.5 en *Acartia bifilosa*, este autor reporta que la razón C:N en *E. affinis* incrementa cuando incrementa el suministro de alimento. Los cladóceros *Bosmina longispina maritima* y *Evadne nordamanni* tienen una razón C:N de 5.1 – 5.7 (Walve y Larsson, 1999).

Schmidt et al., (1999) mencionan que la razón C:N del tejido (5.0) y el mucus (5.95) de la lombriz de tierra *Lumbricus festivus* cambia significativamente cuando varía su condición nutricional. Así, bajo condiciones de alimentación con maíz el valor C:N cambió a 4.46 en el tejido y 4.08 en el mucus. En condiciones de hambruna el tejido obtuvo una razón C:N de 4.41 y 4.17 para el mucus. La disminución en los valores de C:N fue atribuída a que el C en el mucus es remplazado por el C de la dieta, mientras que las lombrices hambreadas lo extraen del tejido del cuerpo (Schmidt et al., 1999).

3. OBJETIVOS

- Determinar los cambios en el crecimiento (talla, peso) y mortalidad de larvas y poslarvas tempranas de *C. gigas* alimentadas con microalgas vivas e inertes.
- Determinar los cambios en el contenido bioquímico (energía bruta, carbono y nitrógeno elemental, razón C:N, razón proteína:energía) de larvas y poslarvas tempranas de *C. gigas* alimentadas con microalgas vivas e inertes.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño General

Se manipuló la fuente de alimento ofrecido con el fin de evaluar su efecto sobre la calidad nutricional de un lote de larvas/poslarvas de *Crassostrea gigas*, evaluada en términos de energía bruta, peso seco y peso libre de ceniza, talla, mortalidad y razones P:E y C:N. Se utilizaron dos tratamientos de microalgas vivas: la diatomea *Thalassiosira pseudonana* y la flagelada *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-Iso). También se utilizó un tercer tratamiento consistente en microalgas secas disponibles comercialmente (Algamac 2000). Para un fácil manejo del alimento este se abreviara de la siguiente manera *Thalassiosira pseudonana* (THA), *Isochrysis aff. galbana* (ISO) y para alimento inerte Algamac 2000 (ALG-2000).

Una vez que estuvo listo el alimento, se obtuvieron larvas fijadoras de la granja Acuícola San Quintín, S.A. de C.V. e inmediatamente se colectaron muestras para determinar el contenido de energía bruta, carbono (C), nitrógeno (N), peso y talla. Posteriormente se colocaron en una cama de fijación tapizada con portaobjetos de vidrio que sirvió como sustrato, en donde permanecieron por 24 h. Después de ese tiempo los organismos se desprendieron de los portaobjetos con una navaja de un filo y se colocaron nuevamente en las camas durante cinco días. Esto con el fin de que: a) se completase la metamorfosis, y b) que los organismos vivos siguieran creciendo y los muertos o dañados pudieran descartarse. Durante ese período los organismos se alimentaron exclusivamente con *I. galbana*, y al quinto día se distribuyeron en tamices contenidos dentro de tanques cónicos de 35 litros, los cuales se usaron como unidades

experimentales. Se utilizaron tres tanques (réplicas) por cada tratamiento, para un total de 9 tanques. El cultivo se realizó en ciclo cerrado con aireación constante por medio de “airlift” y recambios de agua cada 24 h. El alimento se adicionó en cada unidad experimental a una concentración de 100 cel μl^{-1} y su equivalente en peso seco en el caso de Algamac 2000. Los muestreos subsecuentes de organismos se realizaron los días 2, 5, 9, 15, 19, 22 post-fijación, con el fin de tener una historia completa de los cambios ocurridos durante y después de la metamorfosis. Cabe mencionar que en el tratamiento de Algamac 2000 los muestreos se realizaron a partir del día 15, debido al escaso crecimiento de los organismos, lo que se tradujo en poca muestra. Las muestras para determinar mortalidad, peso y talla se procesaron el día del muestreo, mientras que, las de análisis bioquímico (energía bruta, carbono y nitrógeno elemental) se liofilizaron y conservaron en seco a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (con diédrita) hasta su posterior análisis en el laboratorio.

4.2. Evaluaciones

Se utilizó la metodología descrita por García-Esquivel et al. (2001) para cuantificar el peso seco y peso del tejido. Se midió la talla y mortalidad en un lote de larvas/poslarvas de *C. gigas*. Asimismo, en cada fecha de muestreo se colectaron muestras de ostiones de 300 mg y de 50 mg para determinar la cantidad de energía bruta, el contenido de carbono y nitrógeno elemental respectivamente.

4.3. Peso

En cada fecha de muestreo se colectaron cinco muestras de poslarvas con una pipeta de plástico, se transfirieron a cajas Petri donde se contabilizaron, y posteriormente se colocaron en recipientes de aluminio previamente pesadas y calcinadas. Las muestras se enjuagaron con agua destilada para eliminar sales, y posteriormente se secaron en una estufa de aire forzado, modelo 1370FM a 90°C por 24 horas. Se pesaron en una balanza analítica (Mettler Toledo, con una precisión de $\pm 1 \mu\text{g}$) para obtener el peso seco y se combustionaron en una mufla modelo FB1415M a 450 °C por 24 h para obtener el peso de cenizas. El peso libre de ceniza (PLC) se obtuvo por diferencia como:

$$\text{PLC} = (\text{Peso seco} - \text{Peso de ceniza})$$

4.4. Talla

Para evaluar el crecimiento de las larvas y poslarvas en cada fecha de muestreo se realizó lo siguiente: En larvas de 0 y 2 días se obtuvo una muestra de 25-50 organismos de cada réplica y fueron colocadas en frascos de vidrio de 25 ml con formol al 4%. En poslarvas el número de organismos muestreados varió de acuerdo al tamaño de las poslarvas, obteniendo así una muestra de cada replica en cada uno de los tratamientos. Posteriormente se midió el largo de cada organismo bajo el microscopio compuesto marca Carl Zeiss modelo Axiolab.

4.5. Mortalidad

Durante la etapa de fijación se colocaron en la cama de fijación portaobjetos previamente marcados con seis áreas aproximadas 1 cm^2 c/u. Una vez terminada la etapa de fijación, las áreas se fotografiaron para tener un censo inicial de la densidad de poslarvas por mm^2 y se regresaron a las camas. En cada uno de los tanques cónicos se colocó un portaobjetos para evaluar mortalidad, al momento de iniciar los distintos tratamientos. La mortalidad se evaluó en cada fecha de muestreo mediante fotografía de las mismas áreas. Las imágenes fueron procesadas en la computadora y el porcentaje de mortalidad acumulativa (%MO) en larvas y poslarvas fue estimado directamente de la siguiente fórmula:

$$\%MO = (\text{Ostiones muertos al tiempo } t / \text{Ostiones totales al inicio}) \times 100$$

4.6. Energía

Aproximadamente 200 mg de muestra liofilizada fueron molidas en un mortero y comprimidas en un pastillador marca Parr. Las pastillas se secaron a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 hrs para eliminar la humedad, se pesaron, y la energía bruta (cal/g) se determinó por combustión con oxígeno en una bomba calorimétrica automática (Parr 1281), utilizando aprox. 560 mg de aceite mineral (11,000 cal/gr) como coadyuvante de la combustión para cada muestra. Antes de correr las muestras se estandariza la bomba calorimétrica con pastillas de ácido Benzoico y posteriormente cada 10 muestras, con la finalidad de que este bien calibrado. La energía bruta (calorías/g) de las muestras se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación

$$\text{Energía Bruta (cal/g)} = [(EE * T) - CC - (Sp * Pa)] / PLC$$

donde EE = Es el equivalente energético del calorímetro, o la energía requerida para aumentar la temperatura en un grado.

T = Incremento de temperatura (°C) generada por la muestra,

CC = Energía bruta (cal/g) asociada al calentamiento del alambre y combustión del hilo usados en cada determinación.

Sp = Energía bruta (11,000 cal/gr) del aceite mineral o Spike.

Pa = Peso (g) del aceite mineral

P = Peso orgánico (tejido libre de cenizas, PLC) del organismo

4.7. Carbono, nitrógeno y proteínas totales

Debido al alto contenido de carbono en la concha de las larvas/poslarvas, se utilizaron dos tipos de muestras: a) liofilizados de organismos enteros (tejido más concha) y b) muestras de organismos precalcificados a 450 °C (sin materia orgánica). Lo anterior permitió cuantificar directamente el contenido porcentual de C y N en las muestras secas (concha más tejido) y en las cenizas (concha). El porcentaje de C y N orgánico se determinó automáticamente en aproximadamente 2 mg de muestra, utilizando un autoanalizador orgánico elemental (LECO CHNS-932). Los valores absolutos de C y N por individuo ($\mu\text{g/org}$) se calcularon multiplicando el % de cada elemento por el peso correspondiente a la concha o el peso seco, mientras que el contenido absoluto de C y N en el tejido ($\mu\text{g/org}$) se calculó de la siguiente manera:

$$(\mu\text{g } E_{\text{tej}}) = (PS * \%E_{\text{Ps}}) - (PC * \%E_{\text{Pc}})$$

donde PS = peso seco del organismo, PC= peso de la concha (ceniza) del organismo, %E= el porcentaje del elemento (C o N) presente en el organismo completo (p_s) y en la concha (p_c). El porcentaje de C o N en el tejido se calculó dividiendo ($\mu\text{g } E_{\text{tej}}$) entre el peso orgánico (PLC) del ostión.

La cantidad de proteínas totales se estimó multiplicando el %N de la muestra por un factor de 5.8 (Gnaiger y Bitterlich, 1984). Las razones P:E (mg/KJ) y C:N (%C:%N) se estimaron directamente a partir de los datos generados de la forma descrita arriba.

4.8. Estadística

Para comparar los promedios de las variables medidas (peso seco, peso libre de ceniza, talla, energía, proteínas, %C y %N) antes y después de la metamorfosis (0 a 2 días post-fijación se aplicó una prueba t de Student. Para comparar el efecto de los distintos tratamientos el peso seco, peso libre de ceniza, talla, mortalidad, energía, proteínas, % C y %N se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) hacia el final del experimento. Solo en caso que los efectos fueran significativos se aplicó una prueba de Tukey para comparación múltiple de medias, con el fin de identificar diferencias específicas entre tratamientos. Todas las pruebas estadísticas se llevaron a cabo utilizando el programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientifics) en una computadora personal. Las tasas de crecimiento en concha ($\mu\text{m/d}$) y tejido ($\mu\text{g/d}$) obtenido por la poslarvas en cada tratamiento se calcularon mediante regresión lineal, y las pendientes se compararon análisis de covarianza (ANCOVA) de acuerdo a lo indicado por Zar (1984).

5. RESULTADOS

5.1. Metamorfosis

Las poslarvas de ostión aumentaron significativamente la talla (304 ± 2.4 a 361 ± 6.8 μm) durante los dos primeros días post- asentamiento (Fig. 1a, ANEXO I), mientras que el peso seco (Fig. 1b) no presentó un cambio significativo (ANEXO I).

Durante el mismo período el peso libre de ceniza (PLC) disminuyó significativamente de 2.99 ± 0.14 $\mu\text{g}/\text{ind}$ a 1.95 ± 0.06 $\mu\text{g}/\text{ind}$ (Fig. 1c, Tabla 2) y la mortalidad fue insignificante durante las primeras 48h post- asentamiento (Fig. 1d).

El contenido porcentual de carbono (C) y nitrógeno (N) en organismos enteros fué mayor antes de la metamorfosis (22.7% C y 3.8% N), y disminuyó significativamente (ANEXO I) una vez que esta se completó (19.2% C y 2.8% N). El contenido porcentual de carbono y nitrógeno en la concha fue también mayor antes de la metamorfosis (13.7% C y 1.8% N) y disminuyeron una vez que esta fue completada (11.9% C y 0.6% N), encontrando diferencias significativas (Tabla 1, ANEXO I). En el tejido ocurrió lo contrario (Tabla 1), siendo menor el porcentaje de carbono y nitrógeno antes de la metamorfosis (45.8% C y 9.2% N) y mayor una vez que esta ocurrió (50.4% C y 12.2% N), encontrando diferencias significativas (ANEXO I). Por otra parte el valor absoluto de C y N en el tejido mostró un patrón inverso al del contenido relativo, encontrando que hubo una disminución significativa del carbono orgánico, pero no del nitrógeno al término de la metamorfosis (Tabla 3). Las pérdidas netas promedio durante la metamorfosis fueron de 0.41 μg C/ind (16.6%) y de 0.04 μg N/ind (9.5%) respectivamente. El mismo patrón se observó en el organismo completo y en la concha

(Tablas 2 y 3), aunque la magnitud de las pérdidas fue más evidente en el caso del nitrógeno, el cual disminuyó en la concha desde 0.14 hasta 0.05 $\mu\text{g N/ind}$ (21.4%). En el caso del C no se encontraron diferencias significativas en concha, pero si en organismos enteros (Tablas 2 y 3).

Las proteínas totales del tejido disminuyeron significativamente de $1.6 \pm 0.08 \mu\text{g/ind}$ a $1.4 \pm 0.04 \mu\text{g/ind}$ (14%) durante la metamorfosis (Fig. 1c, ANEXO I), mientras que la energía bruta también disminuyó de 1.31 kJ/gr a 1.14 kJ/gr en un 13% durante el mismo período (Fig. 2a), encontrando diferencias significativas entre los días 0 y 2 (ANEXO I). La pérdida absoluta de energía durante la metamorfosis fue 30 mJ/ind, o 43% de la energía contenida en la larva pre-metamórfica, siendo esta disminución estadísticamente significativa (Tabla 2). Finalmente la razón P:E en el tejido aumentó de 23.3 a 35.5 mg/kJ (Fig. 2b), en tanto que la razón C:N en la concha aumento de 7.87 a 23.17 (Fig. 2c). La razón C:N del tejido disminuyo de 4.96 a 4.14 (Fig. 2d) para el mismo periodo de tiempo.

5.2. Post-metamorfosis

Se encontraron diferencias significativas las tallas, peso seco y peso libre de cenizas de juveniles de *C. gigas* en los tres tratamientos (prueba de tukey $P < 0.05$, ANEXO II).

Los organismos alimentados con THA mostraron mayor crecimiento que aquellos alimentados con ALG-2000, alcanzando una talla promedio de $1,669 \pm 30.2 \mu\text{m}$ y $541 \pm 6.12 \mu\text{m}$, respectivamente (Fig. 1a). Así mismo, la tasa de crecimiento (Tabla 4) fue significativamente diferente entre los distintos tratamientos (ANCOVA, $F=37.34$, $p <$

0.005), siendo mayor en el tratamiento con THA (67.43 $\mu\text{m}/\text{día}$), seguida por ISO (30 $\mu\text{m}/\text{día}$), y ALG-2000 (0.51 $\mu\text{m}/\text{día}$). El mismo patrón se observó en las tasas de crecimiento expresadas como peso seco (THA de 17.40 $\mu\text{g}/\text{día}$ vs 1.91 $\mu\text{g}/\text{día}$ ALG-2000) y peso libre de ceniza (THA 0.90 $\mu\text{g}/\text{día}$ vs 0.30 μg ALG-2000), las cuales se muestran en la (Tabla 4).

Por otra parte, se obtuvieron diferencias significativas en la mortalidad de las poslarvas sometidas a los tres tratamientos (prueba de tukey $P < 0.05$, ANEXO II), siendo mayor en el tratamiento con ALG-2000 (86.3%) y menor en THA (47.2%).

El porcentaje de carbono en organismos enteros aumentó con la edad, y fue mayor en el tratamiento con ISO (15.5 a 17.5 %) y menor en THA (14.3 a 15.7 %), encontrando diferencias significativas entre ALG-2000 con respecto a THA e ISO al final del experimento (prueba de tukey $P < 0.05$, ANEXO II). El efecto de los tratamientos también afectó significativamente en el porcentaje de nitrógeno (prueba de tukey $P < 0.05$, ANEXO II). El porcentaje de nitrógeno se mantuvo entre 1.3 a 1.8 %N en los organismos del tratamiento ISO, 1.3 a 1.7 %N en THA y 1.7 a 1.9 %N en (ALG-2000) a lo largo del tiempo.

Por otra parte, los valores relativos de carbono en el tejido mostraron la misma tendencia que aquellos observados en los organismos enteros. Aun cuando la magnitud de los valores aumentó, dicho aumento no fue estadísticamente diferente entre los tratamientos al final del experimento (Tabla 1, ANEXO II). Los valores mas altos a lo largo del experimento se observaron en organismos alimentados con ISO (41.5 a 51.3 %C) y los mas bajos en THA (29.4 a 40.4 %C). El contenido relativo de nitrógeno en el

tejido de *C. gigas* no mostró variaciones claras en función del tiempo dentro de cada tratamiento (Tabla 1), variando este entre 8.4 a 10.8 % en el tratamiento con ISO, 7.9 a 10.4 % en THA, y 6.8 a 7.9 % con ALG-2000. Las diferencias entre tratamientos fueron significativas al final del experimento (ANEXO II), siendo los organismos THA quienes mostraron los mayores valores, seguidos por ISO y ALG-2000. En la concha no se encontraron efectos significativos de los tratamientos sobre el contenido porcentual de carbono o nitrógeno (ANEXO II). Los cambios temporales de C y N se mantuvieron entre 11.6 a 12.3 %C y 0.3 a 0.7 %N para los organismos alimentados con THA, 11.6 a 11.9 %C y 0.3 a 0.4 %N en ISO, y 11.1 a 11.4 %C y 0.4 a 0.5 %N en ALG-2000 (Tabla 1).

El contenido de proteína en el tejido de los organismos también fue afectado significativamente (prueba de tukey $P < 0.05$, ANEXO II, Fig. 1c) por las distintas dietas, siendo mayor en la dieta THA (16.99 μg proteína/ind) y menor en ALG-2000 (2.98 μg proteína/ind). Por otra parte la energía bruta por unidad de peso disminuyó continuamente a lo largo del experimento. Para la comparación entre los tres tratamientos se utilizaron los datos correspondientes al día 19, debido a la falta de muestra en el tratamiento con ALG-2000 en el día 22. El contenido de energía bruta en poslarvas alimentadas con ISO disminuyó hasta 0.59 KJ/gr al final del experimento, mientras que los alimentados con THA fue 0.39 KJ/gr. En el tratamiento ALG-2000 el contenido de energía se mantuvo en 0.47 KJ/gr los días 15 y 19. Las diferencias en el contenido de energía bruta, comparadas en el día 19, fueron significativas entre los distintos tratamientos (prueba de tukey $P < 0.05$, ANEXO II).

La razón proteína:energía tendió a ser mayor en el tratamiento con THA (72.25 mg/KJ) y menor en ISO y ALG-2000 (47.43 y 48.44 mg/KJ). No se realizaron comparaciones estadísticas para esta variable o para la razón C:N debido a que fueron calculadas a partir de valores promedio de proteína y energía (ver materiales y métodos).

La razón carbono:nitrógeno de la concha varió a lo largo del experimento en los tres tratamientos. Los valores máximos de C:N en la concha coincidieron con los valores mínimos de C:N en el tejido y viceversa, siendo más notorio en el tratamiento THA. Por otro lado, al final del experimento (día 22), se encontró que las poslarvas alimentadas con ISO obtuvieron un valor de razón C:N = 31.9, mientras que en ALG-2000 y THA no se encontraron diferencias claras, obteniendo una razón C:N = 23.2 para ALG-2000 y 23.3 en THA.

Por otra parte la razón C:N en el tejido (Fig. 2d) se mantuvo sin muchos cambios a lo largo del experimento en el tratamiento con ISO. Sin embargo el tratamiento THA presentó variaciones los días 15 y 19 con una razón C:N de 4.7 y 3.5 respectivamente, mientras que al final del experimento (día 22), la razón C:N fue mayor en ALG-2000 (C:N = 5.4) y menor en THA (C:N = 4.40).

6. DISCUSIÓN

6.1. Metamorfosis

El incremento en las tallas durante la metamorfosis, se debe principalmente a la concha, lo cual se puede corroborar con una disminución en el peso libre de ceniza (tejido), como una prioridad adaptativa de las larvas metamórficas, mismo que concuerda con lo expuesto por García-Esquivel et al. (2001) en lo referente al aumento en la talla, aun cuando se tiene perdidas netas de reservas y de proteínas estructurales.

Bioquímicamente la metamorfosis se caracterizó por una disminución de reservas energéticas y carbono provenientes del tejido, combinado con una significativa pérdida de nitrógeno en la concha. La aproximación metodológica empleada en el presente estudio permitió identificar la importancia de las proteínas de la concha como fuente de energía durante la metamorfosis de *C. gigas*, amortiguando de esta manera las pérdidas de este compuesto en el tejido. En este sentido, fue evidente que la mayor contribución a las pérdidas totales de nitrógeno durante esa etapa provino de la concha, y en menor medida del tejido (Tabla 3). Por el contrario, las mayores pérdidas de carbono provinieron del tejido y en menor grado de la concha (Tabla 3). Si consideramos que los carbohidratos, representan solo un mínimo porcentaje de las macromoléculas energéticas presentes en las larvas metamórficas de ostiones (Rodríguez et al., 1990; Whyte et al., 1987; Haws, 1993; Videla et al., 1998; García-Esquivel et al., 2001), entonces es de esperarse que la principal reserva energética del tejido que se utilizó durante la metamorfosis de *C. gigas* fueron los lípidos. Un análisis más detallado, indica que tanto las proteínas perdidas ($0.13 \mu\text{gN/ind} \times 5.8 = 0.75 \mu\text{g proteína/ind} = 18.09 \text{ mJ/ind}$) como

los lípidos, contribuyeron de manera proporcional a la pérdida total de energía (-30 mJ/ind) durante la metamorfosis, aún cuando las proteínas provinieron principalmente de la concha y los lípidos del tejido. La contribución de los lípidos del tejido, también se evidenció con un aumento de la razón P:E y la disminución de la razón C:N al final de la metamorfosis (Fig. 2 b, d).

Las pérdidas netas de proteína y energía durante la metamorfosis de *C. gigas* observadas en el presente estudio fueron entre cuatro y nueve veces mayores a las reportadas por otros estudios para la misma especie (Haws et al., 1993; García-Esquivel et al., 2001), aún cuando la contribución relativa de las proteínas a la energía perdida reportada por dichos autores (40 al 60%) fueron similares a las del presente estudio. Lo anterior indica por una parte que, la contribución relativa de las proteínas, a las pérdidas netas de energía es consistente entre distintas camadas de organismos de la misma especie, y por otra parte evidencia diferencias metodológicas para evaluar las pérdidas de energía y la cantidad de proteínas. También es importante señalar, que la cantidad absoluta de proteínas reportada previamente para distintas cohortes de larvas pre-metamórficas de *C. gigas* es muy variable, y va desde 0.18 µg/ind (Haws et al., 1993) hasta 0.65 - 1.03 µg/ind (García-Esquivel et al., 2001), mientras que en el presente estudio fue de 2.46 µg/ind (0.42 µg N x 5.8). Aunque en el trabajo de García-Esquivel et al. (2001) las proteínas larvales/poslarvales representaron el 40% del peso libre de cenizas, en el presente estudio representó el 81% (Tabla 1). Estas diferencias se reflejan en el cálculo de la contribución proteica a la energía total presente en larvas y poslarvas de *C. gigas*. No obstante, la magnitud relativa de las pérdidas y ganancias son similares

entre los estudios que utilizan métodos indirectos (Ej. Whyte et al., 1987; Haws et al., 1993; Rodríguez et al., 1990; Labarta et al., 1999; García-Esquivel et al., 2001) o directos (este estudio) para el cálculo de energía bruta. El cálculo del contenido de proteínas totales a partir del nitrógeno orgánico realizado en el presente estudio, es una aproximación metodológica usada con anterioridad (Gnaiger y Bitterlich, 1984) y probablemente refleje de manera más confiable el balance neto de compuestos nitrogenados (proteínas + polipéptidos + aminoácidos) en el tejido y la concha en comparación con los métodos calorimétricos. Por otra parte, la determinación del contenido calórico por combustión directa es más confiable que las determinaciones indirectas, aún cuando requiere de cantidades sustanciales de muestra. Por lo tanto, es de esperarse que las pérdidas de energía y nitrógeno determinadas en el presente estudio, reflejen de manera más realista las pérdidas netas de energía y compuestos nitrogenados en relación con estudios previos. La alta variabilidad en la energía y compuestos nitrogenados presentes en distintas cohortes de larvas/poslarvas de *C. gigas*, sugiere que tanto la energía como los compuestos nitrogenados, podrían tener menos implicaciones en la mortalidad poslarval, que los valores relativos, los cuales son altamente consistentes entre cohortes de distinto origen y peso inicial (Haws et al., 1993; García-Esquivel et al., 2001). Anteriormente García-Esquivel et al. (2001) demostraron que existe una correlación significativa entre las pérdidas totales de proteína soluble durante la metamorfosis de *C. gigas* y la mortalidad de poslarvas de una semana de edad. Sin embargo, dichos autores no dilucidaron la contribución específica del tejido a las pérdidas de proteína durante la metamorfosis, lo cual podría ser un factor crítico a

observar en futuros estudios mediante la utilización de las herramientas descritas en la presente investigación. Finalmente, es importante comentar que las pérdidas netas de C y N orgánico en el tejido durante la metamorfosis contrastan con el aumento significativo de estas variables cuando se expresan en términos relativos (Tabla 1). El ligero aumento de los valores porcentuales de carbono y nitrógeno, sugiere por una parte que la pérdida general de peso fue mayor que la de carbono o nitrógeno, y por otra parte, que los organismos tienden a mantener en balance su contenido de lípidos-carbohidratos y proteínas en el tejido, aún en un estado catabólico como la metamorfosis.

6.2. Post-metamorfosis

El efecto de distintas dietas sobre el crecimiento y composición bioquímica de las poslarvas de *C. gigas* fue evidente en el presente estudio, de tal forma que, las variables de respuesta medidas, pueden utilizarse como indicadores de “buena” (*Thalassiosira pseudonana*) “mediana” (*Isochrysis aff. galbana* (Clone T-Iso)) y “mala” calidad (Algamac 2000) del alimento utilizado en el presente experimento. Es probable que los cambios observados durante los primeros diez días post-fijación reflejen principalmente los efectos remanentes de la metamorfosis, ya que los valores de mortalidad acumulativa observada durante esa etapa (40 a 65%) coinciden con lo reportado por otros autores (Haws et al., 1993; García-Esquivel et al., 2000; García-Esquivel et al., 2001). Además, se sabe que durante ese período las poslarvas de *C. gigas*, se caracterizan por mantener una alta tasa metabólica, lo que contribuye a la mortalidad característica de esa etapa de desarrollo (García-Esquivel et al., 2001). A pesar de lo anterior, los efectos de la dieta

comenzaron a reflejarse en las variables de medición desde los 10 días post-fijación, y se acentuaron en los restantes 15 días del experimento. Así, las tasas de crecimiento de *C. gigas* sometidas a la dieta THA fueron hasta 2 y 132 veces mayores que aquellos organismos sometidos a ISO y ALG-2000. Lo anterior coincide con reportes de la literatura que indican que las diatomeas típicamente producen mayores tasas de crecimiento que la flagelada (T-ISO) (Walne, 1963). No obstante, es difícil comparar el crecimiento de poslarvas alimentadas con ALG-2000, ya que existen pocos trabajos disponibles en la literatura que hayan evaluado la efectividad de este alimento comercial. En el presente estudio fue evidente que ALG-2000 no fue una dieta efectiva para poslarvas tempranas de *C. gigas*, ya que generó tasas de crecimiento cercanas a cero. Brown y McCausland (2000), encontraron que las tasas de crecimiento específica en poslarvas de *C. gigas* alimentadas con *Isochrysis sp.* fueron hasta dos veces mayor que en ALG-2000 (0.054 y 0.024. Por lo anterior, es posible concluir que la dieta comercial ALG-2000 no es efectiva para poslarvas de *C. gigas*, aun cuando se sabe que produce buenos resultados en el enriquecimiento de nauplios de artemia (Blair et al., 2003) y rotíferos (Puvanendran et al., 2005) los cuales son usados para la alimentación de larvas de peces marinos.

Es importante notar que las mayores tasas de crecimiento observadas en el presente estudio con el tratamiento THA representaron entre un 25% y 50% de los valores obtenidos para distintas cohortes de *C. gigas* durante 1993-1996, bajo condiciones similares de cultivo en laboratorio, y en estadios de desarrollo similares (García-Esquivel, 2001). Este mismo fue reportado en evaluaciones de campo realizadas en el

año 2000 (García-Esquivel et al., 2004), ya que las tasas de crecimiento de juveniles-adultos de *C. gigas* cultivados en sitios comparables de Bahía San Quintín alcanzaron solo un 50% de las tasas registradas durante 1995-96 (García-Esquivel et al., 2000). Las variables bioquímicas evaluadas en el presente trabajo no logran explicar la razón por la cual las tasas de crecimiento de *C. gigas* disminuyeron tan drásticamente. Sin embargo, los datos combinados de laboratorio y campo sugieren que la reducción drástica de la tasa de crecimiento de *C. gigas* podría tener un origen genético, más que nutricional. En este sentido, Correa-Sandoval et al. (2004) determinaron que la heterocigocidad de adultos cultivados en Bahía San Quintín durante 1999-2001 fueron 0.010, 0.027 y 0.047 se redujo hasta 5.4 veces con respecto a la heterocigocidad presentada por adultos de la misma especie y el mismo sitio en 1987 (De la Rosa-Vélez et al., 1991).

Los valores combinados de porcentaje de carbono (C), nitrógeno (N), y energía bruta del tejido reflejaron la condición nutricional a la que estuvieron sometidas las poslarvas experimentales de *C. gigas*, especialmente en la última semana del experimento. Así, aún cuando el porcentaje de nitrógeno fue similar en las poslarvas de los dos tratamientos con microalgas, el porcentaje de carbono fue mayor en aquellas alimentadas con T-ISO, lo que sugiere que estas contenían más lípidos y por lo tanto mayor energía por unidad de peso que las poslarvas de THA. De ser este el caso, entonces eso explicaría los valores bajos de energía bruta y razón C:N, así como los valores altos de P:E observados en el tratamiento de THA hacia el final del experimento. Las variables medidas y calculadas también reflejaron el escaso valor nutricional de ALG-2000 y su efecto en las poslarvas mayores de 15 días de edad, ya que estas

mostraron significativamente menor %N, energía bruta y razón P:E que los tratamientos de microalgas vivas (Fig. 2 a-b). En conjunto, estos resultados sugieren que las poslarvas alimentadas con ALG-2000 no almacenaron suficiente energía y compuestos nitrogenados en el tejido, lo cual se reflejó en tasas de crecimiento y contenido de proteínas menor que los tratamientos con microalgas. Hasta el momento no se tiene información sobre el uso de C y N orgánico elemental como indicadores de la condición nutricional en estadios tempranos o juveniles-adultos de moluscos bivalvos. La mayor parte de los estudios existentes en este campo se han enfocado a analizar las variaciones en la razón C:N del fitoplancton como indicador de la disponibilidad de nutrientes en zonas costeras y oceánicas (Van-Nieuwerburgh et al., 2004). En menor grado se ha utilizado esta razón en grupos zooplanctónicos para analizar su composición elemental en función del desarrollo ontogenético (Gorokhova y Hansson, 2000) y en presencia de alimento en el ambiente natural (Koski, 1999; Walve y Larsson, 1999). La razón C:N obtenida en organismos juveniles del crustáceo *Mysis mixta* fue 3.8, el cual coincide con los valores obtenidos en el tratamiento de (THA) al inicio de la etapa post-fijación de *C. gigas* (este estudio). Sin embargo los valores obtenidos al final del experimento (Fig. 2d), están por arriba de los obtenidos en *Mysis mixta* (Gorokhova y Hansson, 2000). En general, los valores de C:N obtenidos en el presente trabajo están dentro del intervalo reportado para peces (4.03-4.23 Pfeiler et al., 1998), así como en los copépodos calanoides *Euriterma affinis* y *Acartia bifilosa* 4-4.5 (Koski, 1999) y *Acartia sp.* con una razón C:N de 4.5 (Walve y Larsson, 1999).

Finalmente, es importante enfatizar que en este estudio se intenta usar la razón C:N y P:E como indicadores de la condición nutricional de estadios tempranos de moluscos. Los cambios en la talla y peso evidenciaron con más claridad el efecto prolongado de las dietas experimentales en las poslarvas de *C. gigas*. No obstante, los índices C:N y P:E explican los cambios bioquímicos ocurridos en etapas críticas de desarrollo como la metamorfosis, así como las deficiencias alimenticias a las que estuvieron sometidas las poslarvas alimentadas con ALG-2000. Por lo tanto, estos índices tienen una aplicación más amplia una vez que se establezcan valores generales de referencia para estos y otros grupos.

7. CONCLUSIONES

- La metamorfosis de *C. gigas* produce una reducción del 30% de la energía presente en larvas pre-metamórficas.
- La energía utilizada durante la metamorfosis proviene principalmente de lípidos presentes en el tejido y compuestos nitrogenados de la concha.
- Los cambios metamórficos se reflejan como una disminución de la razón C:N del tejido (4.96 y 4.14), un aumento de la razón P:E (23.3 y 35.5), y un aumento de la razón C:N en la concha (7.87 y 23.17).
- *Thalassiosira pseudonana* produjo el doble de crecimiento (67.43 $\mu\text{m}/\text{d}$) que *Isochrysis aff. galbana* (clone T-ISO).
- La dieta comercial Algamac 2000 no es apta para poslarvas tempranas de *C. gigas*, ya que produce un mínimo de crecimiento (0.51 $\mu\text{m}/\text{d}$).
- La combinación de las razones C:N y P:E del tejido reflejan la calidad de la dieta en poslarvas de *C. gigas* de tres semanas de edad. Dieta de buena calidad (THA) produjo valores altos P:E (72.25 mg proteína/kJ) y bajo C:N (3.5 a 4.7). Dieta de mala calidad (ALG-2000) produjo bajo P:E (48.44 mg proteína/kJ) y alto C:N (>5).

8. BIBLIOGRAFIA

- Baker, S.M. y Mann, R., 1994. Description of metamorphic phases in the oyster *Crassostrea virginica* y effects of hypoxia on metamorphosis. Marine Ecology Progress Series. Vol. 104, 91-99.
- Bartlett, B.R., 1979. Biochemical changes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1975) during larval development y metamorphosis. Proc Natl Shellfish Assoc 69:202.
- Blair, T., Castell, J., Neil, S., D'Abramo, L., Cahu, C., Harmon, P. y Ogunmoye, K., 2003. Evaluation of microdiets versus live feeds on growth, survival y fatty acid composition of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). Aquaculture, 225 (1-4), 451-461.
- Brown, M.R. y McCausland, M.A., 2000. Increasing the growth of juvenile Pacific oyster *Crassostrea gigas* by supplementary feeding with microalgal y dried diets. Aquaculture, 31, 671-682.
- Chu, F.E., Webb, K.L., Hepwoth, D.A. y Casey, B., 1987. Metamorphosis of larvae of *Crassostrea virginica* fed microencapsulated diets. Aquaculture, 64, 185-197.
- Collet, B., Boudry, P., Thebault, A., Heurtebise, S., Morand, B. y Gerard, A., 1999. Relationship between pre-and post-metamorphic growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture, 175, 215-226.
- Coloso, R.M., Benitez, L.V. y Tiro, L.B., 1988. The effect of dietary protein-energy levels on growth y metabolism of milkfish (*Chanos chanos* Forsskal). Comp. Biochem. Physiol, 11-17.

- Correa, F., Collins, E., Ocegüera, A., Cordero, B. y Domínguez, D., 2004. Variación alozimica del ostión japonés *Crassostrea gigas* en Bahía San Quintín, Baja California, México. *Ciencias Marinas*. 30 (1A) 89-97.
- Cruz-Suárez, LE., Antino-Perez, JS., Luna-Mendoza, N. y Ricque-Marie, D., 2001. Effect of two different vegetable/animal protein proportions on the optimum dietary protein/energy ratio for *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris* growth. *Aquaculture* (resumen) p. 148.
- De la Rosa-Vélez, J., Gutiérrez-Wing, M.T. y Radilla-Camacho, R., 1991. El ostricultivo de Bahía San Quintín, BC, México: aspectos genéticos. *Ciencias Marinas*. 17 (3): 133-145.
- Fariás, A., Uriarte, I. y Castilla, J.C., 1998. A biochemical study of the larval y postlarval stage of the chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture* 166, 37-47.
- García, E.Z., Galindo, M.S., González, M.A., Hernández, M., Ley, F. y Vidal, R., 1999. Mortalidad de ostión en Bahía San Quintín durante 1998: Evaluación puntual.
- García, E.Z., González, G.M.A., Galindo, B.S. y Hernández, A.M., 2000. Microgeographic differences in growth, mortality y biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from San Quintín Bay, northwest Mexico. *J. Shellfish Res.*, 19, 789-798.
- García, E.Z., Bricelj, V.M. y González, G.M.A., 2001. Physiological basis for energy demands y early postlarvas mortality in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology y Ecology*, 263, 77-103.

- García, E.Z., González, G.M., Ley, L.F. y Mejía, T.A., 2004. Potencial ostrícola del brazo oeste de Bahía San Quintín: Biomasa actual y estimación preliminar de la capacidad de carga. *Ciencias Marinas*. 30 (1A):61-74.
- Gnaiger, E. y Bitterlich, G., 1984. Proximate biochemical composition y caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. *Oecologia* (Berlin), 62:289-298.
- Gómez-Montes, L., 2002. Efecto de la razón Proteína-Energía sobre el crecimiento y metabolismo de juveniles en el Abulón Azul (*H. fulgens*). Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuatitlán. 45 pp.
- Gómez-Montes, L., García-Esquivel, Z., Abramo, L.R.D., Shimada, A., Vásquez-Peláez, C. y Viana, M.T., 2003. Effect of dietary protein:energy ratio on intake, growth y metabolism of juvenile green abalone *Haliotis fulgens*. *Aquaculture* 220, 769-780.
- Gorokhova, E. y Hansson, S., 2000. Elemental composition of *Mysis mixta* (Crustacea, Mysidacea y energy costs of reproduction y embryogenesis under laboratory conditions. *Journal of Experimental Marine Biology y Ecology*, 246, 103-123.
- Haws, M. y DiMichele, L., 1993. Biochemical changes y mortality during metamorphosis of the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*, y the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Molecular Marine Biology y Biotechnology*. 2 (4): 207-217.
- Hickman, R.W. y Gruffydd, Li.D., 1971 The histology of the larvae of *Ostrea edulis* during metamorphosis. In: Crisp, D.J. (Ed.) 4th Eur. Mar. Biol. Symp., Cambridge University Press, Cambridge. pp. 281-284.

- His, E. y Maurer, D., 1988. Shell Growth y Gross Biochemical Composition of Oyster Larvae (*Crassostrea gigas*) in the Field. *Aquaculture* 69, 185-194.
- Holland, D.L. y Spencer, B.E., 1973. Biochemical changes in fed y starved oyster, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis y early spot growth: a review of basics. *J. World Aquacult. Soc.* 23, 173-179.
- Holland, D.L., 1978. Lipid reserves y energy metabolis in the larvae of benthic marine invertAebrates. In: Malins, D.C., Sargent, J.R. (Eds.). *Biochemical y Biophysical Perspectives in marine biology*. Academic Press, New York. 4, 85-123.
- Koski, M., 1999. Short communication. carbon:nitrogen ratios of Baltic Sea copepods- indication of mineral limitation. *Journal of Plankton Research*. 21, 1565-1573.
- Labarta, F.E., 1997. Desarrollo larvario de *Ostrea edulis* L. Nutrición y reservas energéticas. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Fac. Biol. 258 pp.
- Labarta, U., Fernández, M.J. y Pérez, A., 1999. Energy, biochemical substrates y growth in the larval development, metamorphosis y postlarvae of *Ostrea edulis*. *Journal of Experimental Marine Biology y Ecology*. 238, 225 – 242.
- Li, M. y Lovell, R.T., 1992. Comparison of satiate feeding y restricted feeding of channel catfish with various concentrations of dietary protein in production ponds. *Aquaculture* 103, 165-175.
- Millard, R.H. y Scott, J.M., 1967. The larvae of the oyster *Ostrea edulis* during starvation. *J. Mar. Biol. Ass. UK* 47, 475-484.

- Osman, R.W., Whitlanch, R.B. y Zajzc, R.N., 1989. Effects of resident species on recruitment into a community larval settlement versus post-settlement mortality in the oyster *Crassostrea virginica*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 54, 6173.
- Pfeiler, E., Lindley, A.V. y Elser, J.J., 1998. Elemental (C, N y P) analysis of metamorphosing bonefish (*Albula sp.*) leptocephali: relationship to catabolism of endogenous organic compounds, tissue remodeling and feeding ecology. Marine Biology 132: 21-28.
- Pousao, F. P., Dores, E., Morais, S. y Narciso, L., 2001 Lipid profile improvement of *Brachionus plicatilis* for marine fish larvae. Aquaculture. (resumen) p. 537.
- Puvanendran, V., Boyce, D., Thorne, L., Godden, F., Kellett, A., Monk, J., Brown, J.A. y Driedzic, B., 2005. Effect of differently enriched rotifers during the first 10 days post-hatch on the growth, survival, biochemical composition y hepato-somatic index of Atlantic cod larvae y juveniles. Aquaculture Research. (Resumen).
- Rodríguez, J.L., Sedano, F.J., García-Martín, L.O., Pérez-Camacho, A. y Sánchez, J.L., 1990. Energy metabolism of newly settled *Ostrea edulis* spot during metamorphosis. Mar. Biol. 106, 109-111.
- Sastry, A.N., 1979. Pelecipoda (excluding Ostreidae) In: Reproduction of marine invertebrates. Vol. V. Molluscs: Pelecypods y lesser classes. Ed. A.C.Giese & J.S.Pearse. Academic Press. New York. 113-292 pp.
- Schmidt, O., Scrimgeour, C.M. y Curry, J.P., 1999. Carbon y nitrogen stable isotope ratios in body tissue y mucus of feeding y fasting earthworms (*Lumbricus festivus*). Oecologia. 118, 9-15.

- Shields, R.J., Gordon, B. J., Luizi, F.S., Gara, B., Bromage, N.R. y Sargent, J.R., 1999. Natural Copepods are Superior to Enriched Artemia Nauplii as Feed for Halibut Larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in Terms of Survival, Pigmentation y Retinal Morphology: Relation to Dietary Essential Fatty Acids. *Journal of Nutrition*. 129, 1186-1194.
- Steffens, W., 1989. Principles of fish nutrition. Ellis Horwood Limited, John Wiley & Sons, NY, USA, 384 pp.
- Utting, S.D., 1986. A preliminary study on growth of *Crassostrea gigas* larvae y spat in relation to dietary protein. *Aquaculture* 56, 123-136.
- Van-Nieuwerburgh, L., Wanstrand, I. y Snoeijs, P., 2004. Growth y C:N:P ratios in copepods grazing on N- or Si-limited phytoplankton blooms. *Hydrobiologia* 514, 57-72.
- Videla, J.A., Chaparro, O.R. y Thompson, R.J., 1998. Role of biochemical energy reserves in the metamorphosis y early development of the oyster *Ostrea chilensis*. *Mar. Biol. Ecol.* 58, 1-17.
- Waldock, M.J. y Nascimento, I.A., 1979. The triacylglycerol composition de *Crassostrea gigas* larvae fed on different algal diets. *Mar. Biol. Lett.* 1, 77-86.
- Waller, T.R., 1981. Functional morphology y development of veliger larvae of the European oyster *Ostrea edulis*. *Linne. Smithson. Contrib. Zool.* 123, 63.
- Walne, P.R., 1963. Observations on the food value of seven species of algae to the larvae of *Ostrea edulis*. I. Feeding experiments. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 43, 767-784.

- Walve, J. y Larsson, U., 1999 Carbon, nitrogen y phosphorus stoichiometry of crustacean zooplankton in the Baltic Sea: implications for nutrient recycling. *Journal of Plankton Research*. 21 (12), 2309-2321.
- Williams, C. y McMahon, R., 1989. Annual variation of tissue biomass y carbon y nitrogen content in the freshwater Bivalve *Corbicula-Fluminea*. *Canadian Journal Zoology*. 67 (1), 82-90.
- Whyte, J.N., Bourne y Hodgson, C.A., 1987. Assessment of biochemical composition y energy reserves in larvae of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 113, 113-124.
- Zar J.H., 1984. *Bioestadistical Analysis*. Prentice Hall editorial. Second edition. 718 pp.

Tabla 1.- Contenido porcentual de carbono y nitrógeno orgánico en organismos enteros, tejido (peso libre de ceniza), y concha de larvas pre-metamórficas (día 0) y poslarvas tempranas del ostión *Crassostrea gigas*. Las poslarvas fueron alimentadas con tres tratamientos distintos: *Thalassiosira pseudonana*, *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-Iso) y microalgas comerciales inertes (Algamac 2000).

Días	<i>Thalassiosira pseudonana</i>		<i>Isochrysis aff. galbana</i> (clone T-Iso)		<i>Algamac 2000</i>	
	% C	%N	%C	%N	%C	%N
Organismo Completo						
0	--	--	22.7 ± 0.23	3.8 ± 0.04	--	--
2	--	--	19.2 ± 0.05	2.8 ± 0.02	--	--
9	15.7 ± 0.13	1.7 ± 0.03	17.5 ± 0.25	1.8 ± 0.03	--	--
15	15.1 ± 0.03	1.5 ± 0.02	15.9 ± 0.08	1.5 ± 0.00	--	--
19	14.3 ± 0.09	1.3 ± 0.03	15.5 ± 0.18	1.3 ± 0.04	15.7 ± 0.75	1.7 ± 0.0
22	15.2 ± 0.19	1.5 ± 0.06	15.8 ± 0.31	1.4 ± 0.07	17.4 ± 0.36	1.9 ± 0.0
Tejido						
0	--	--	45.8 ± 0.82	9.2 ± 0.16	--	--
2	--	--	50.4 ± 0.29	12.2 ± 0.11	--	--
9	40.4 ± 0.94	10.4 ± 0.24	51.3 ± 1.71	10.8 ± 0.19	--	--
15	37.0 ± 0.29	7.9 ± 0.21	43.0 ± 0.59	8.7 ± 0.03	--	--
19	29.4 ± 0.77	8.5 ± 0.30	41.5 ± 1.42	8.4 ± 0.28	33.6 ± 3.72	6.8 ± 0.4
22	39.7 ± 1.63	9.0 ± 0.47	44.2 ± 2.69	9.2 ± 0.57	43.0 ± 1.90	7.9 ± 0.0
Concha						
0	--	--	13.7 ± 0.25	1.8 ± 0.13	--	--
2	--	--	11.9 ± 0.35	0.6 ± 0.18	--	--
9	11.6 ± 0.04	0.3 ± 0.02	11.6 ± 0.02	0.3 ± 0.01	--	--
15	12.1 ± 0.10	0.7 ± 0.04	11.9 ± 0.10	0.4 ± 0.07	--	--
19	12.3 ± 0.33	0.4 ± 0.02	11.7 ± 0.02	0.3 ± 0.02	11.1 ± 0.32	0.4 ± 0.0
22	12.0 ± 0.24	0.5 ± 0.08	11.9 ± 0.05	0.4 ± 0.03	11.4 ± 0.01	0.5 ± 0.0

Tabla 2.- Cambios corporales absolutos en el contenido orgánico (peso libre de cenizas, PLC), cenizas, energía bruta, carbono (C) y nitrógeno (N) de *Crassostrea gigas*, durante el período de metamorfosis. Los promedios con distintos subíndices dentro de una misma variable indican diferencias significativas (Prueba t-Student, $\alpha < 0.05$) entre la etapa de larva pre-metamórfica (día 0) y poslarva recién metamorfozadas (día 2).

Días	Peso del tejido	Peso de la Concha	Energía (mJ/ind)	C _{Ps} (μg/ind)	N _{Ps} (μg/ind)
0	3.00 ^a ± 0.14	7.86 ^a ± 0.82	69 ^a ± 3.2	2.46 ^a ± 0.23	0.42 ^a ± 0.04
2	1.95 ^b ± 0.06	8.42 ^a ± 0.24	39 ^b ± 1.1	1.99 ^b ± 0.06	0.29 ^b ± 0.01
PGN	-1.05 (35%)	0.56 (7%)	-30 (43%)	-0.47 (19%)	-0.13 (31%)

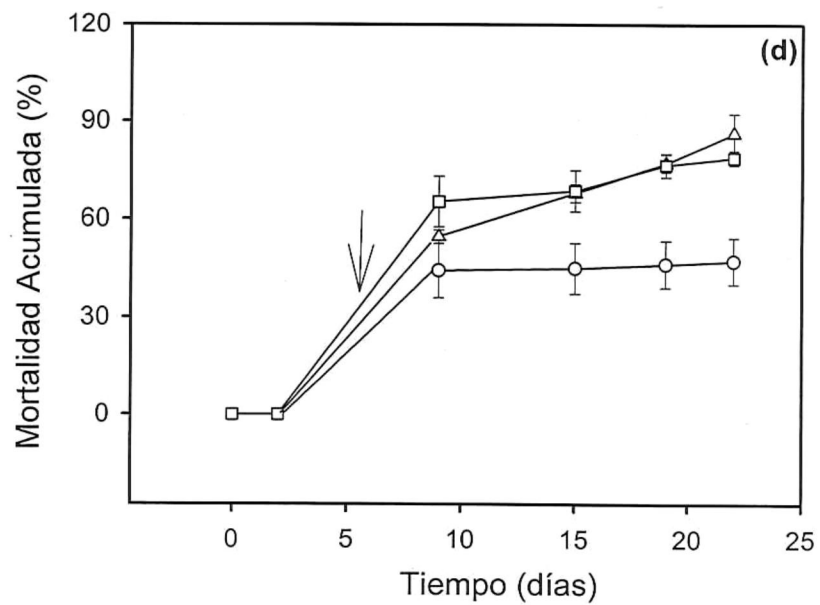
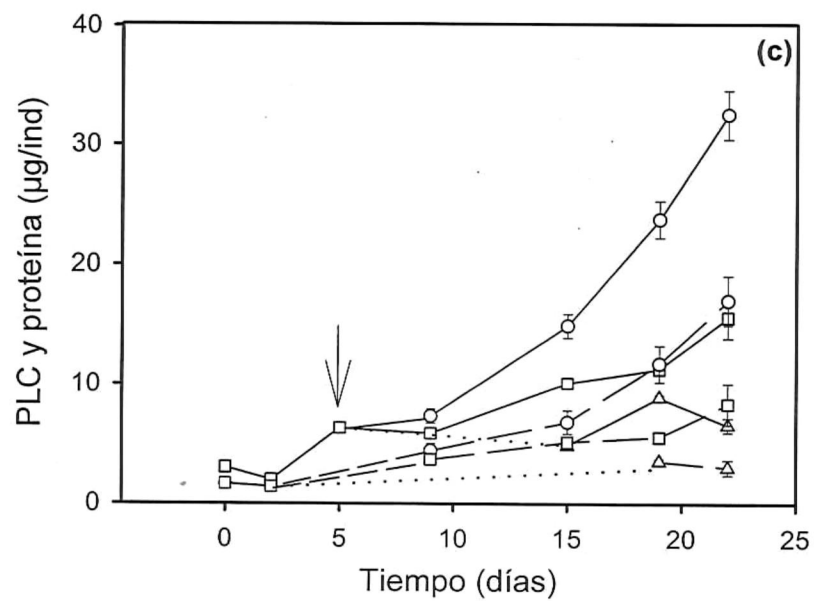
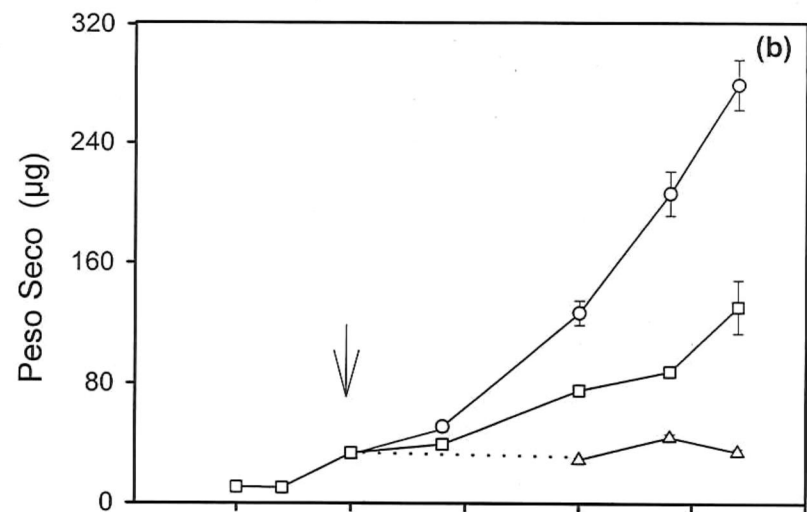
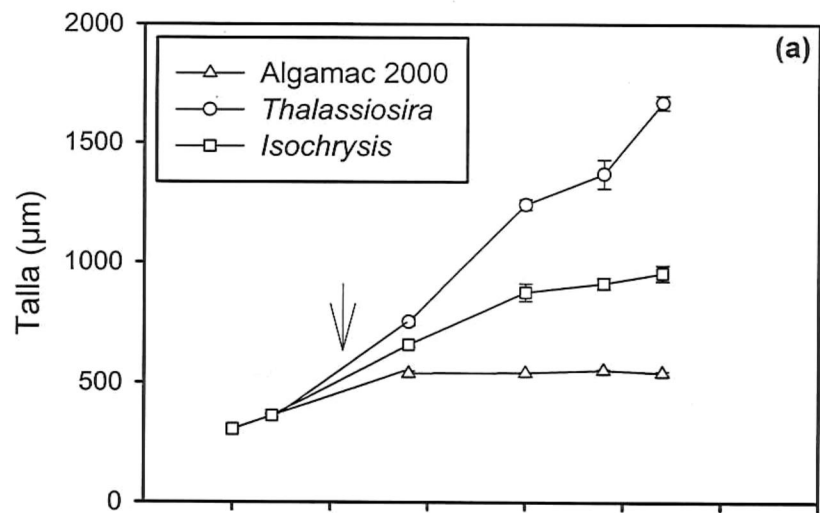
Tabla 3.- Contribución del tejido y la concha de *C. gigas* a las pérdidas relativas (en paréntesis) y absolutas de carbono (C) y nitrógeno (N) durante la metamorfosis. Los promedios con distintos subíndices dentro de una misma variable indican diferencias significativas (Prueba t-Student, $\alpha < 0.05$) entre la etapa de larva pre-metamórfica (día 0) y poslarva recién metamorfozadas (día 2). PGN = Pérdidas o ganancias netas.

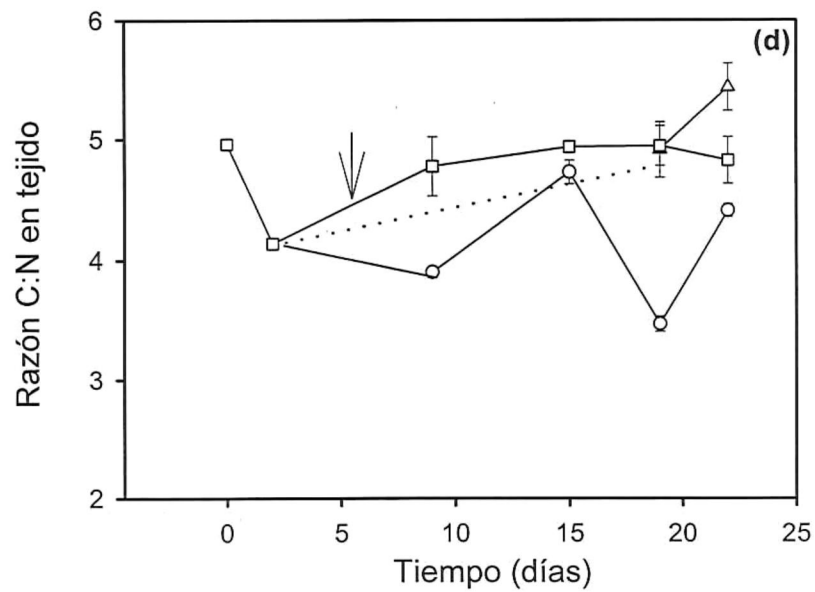
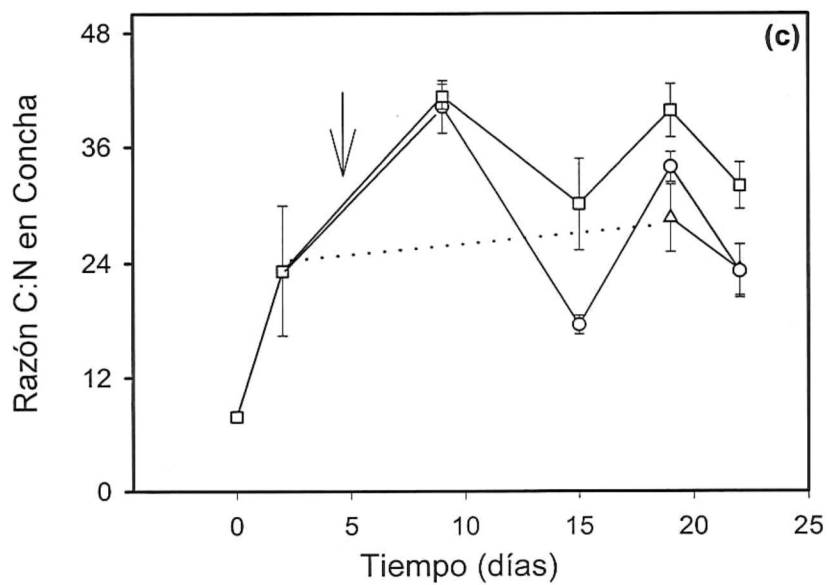
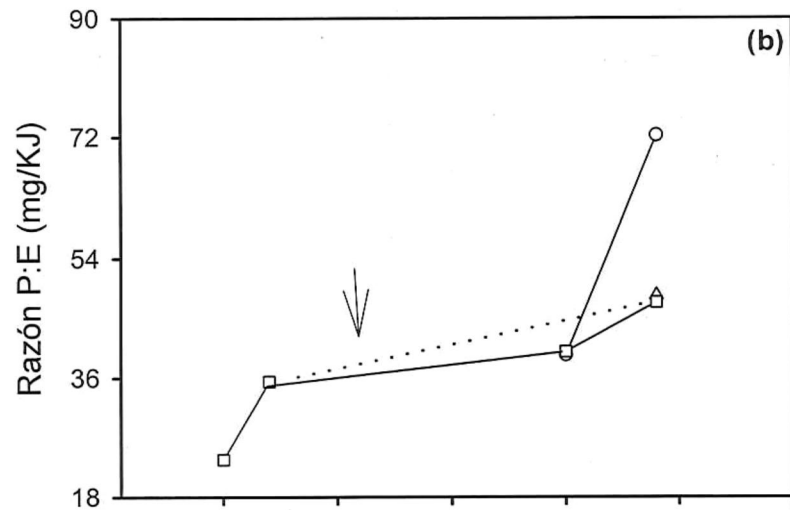
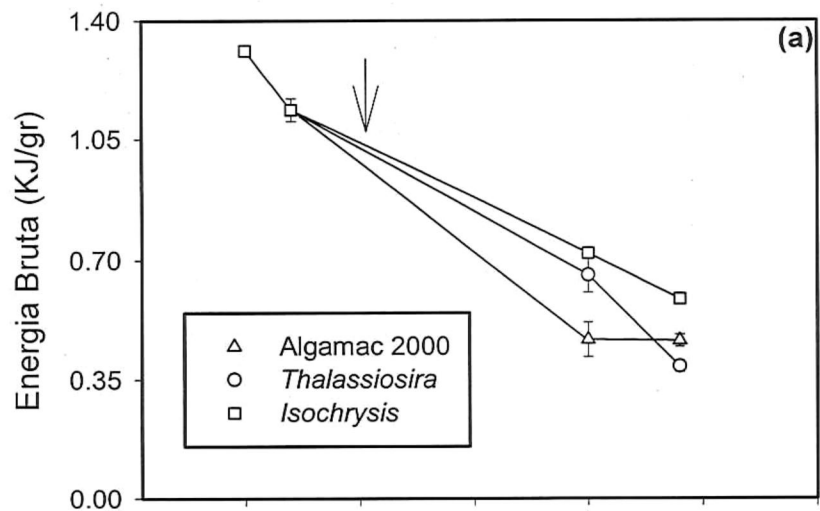
Días	Tejido		Concha	
	C _{tejido} (μg/ind)	N _{tejido} (μg/ind)	C _{concha} (μg/ind)	N _{concha} (μg/ind)
0	1.38 ^a ± 0.10	0.28 ^a ± 0.01	1.11 ^a ± 0.17	0.14 ^a ± 0.03
2	0.99 ^b ± 0.03	0.24 ^a ± 0.02	0.96 ^a ± 0.01	0.05 ^b ± 0.01
PGN	-0.39 (15.8%)	-0.04 (9.5%)	-0.15 (6.0%)	-0.09 (21.4%)

* PGN = Perdidas o ganancias netas.

Tabla 4.- Ecuaciones de ajuste lineal para los cambios en la talla (T_a , $\mu\text{m}/\text{ind}$), peso seco (P_s , $\mu\text{g}/\text{ind}$) y peso libre de ceniza (PLC, $\mu\text{g}/\text{ind}$) de *Crasostrea gigas* en función del tiempo (días, d). Las poslarvas fueron alimentadas con las microalgas *Thalassiosira pseudonana* (THA), *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-Iso) y el alimento comercial Algamac 2000 (ALG-2000).

Tratamientos	Talla	P. Seco	Peso Libre de Ceniza
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$T_a = 67.43 \text{ d} + 154.7$	$P_s = 17.40 \text{ d} - 116.3$	$\text{PLC} = 1.91 \text{ d} - 11.4$
<i>Isochrysis aff. galbana</i> (clone T-Iso)	$T_a = 30.00 \text{ d} + 350.8$	$P_s = 5.40 \text{ d} - 1.6$	$\text{PLC} = 0.60 \text{ d} + 1.5$
Algamac 2000	$T_a = 0.51 \text{ d} + 535.1$	$P_s = 0.90 \text{ d} + 19.2$	$\text{PLC} = 0.30 \text{ d} + 1.4$





ANEXO I.- Pruebas t-Student aplicadas para comparar los promedios de talla, peso seco, proteínas totales, energía bruta, y contenido porcentual de carbono y nitrógeno orgánico en larvas pre-metamórficas (día 0) y poslarvas metamorfozadas (día 2) de *Crassostrea gigas*. Las comparaciones del contenido de carbono y nitrógeno se realizaron en organismos enteros, así como en la concha, y el tejido del organismo. t = estadístico de prueba, gl = grados de libertad, p = probabilidad de rechazo de H₀.

Variables medidas	t	gl	P
Talla (µm)	-4.728	4	0.009
Peso Seco (µg)	0.486	6	0.644
Proteínas totales (µg/ind)	2.937	6	0.026
Energía bruta (Kj/gr)	4.964	4	0.008
% C Org. Completo	14.864	6	<0.001
%C concha	4.343	3	0.023
%C tejido	-5.384	6	0.002
%N Org. Completo	22.472	6	<0.001
%N concha	5.531	3	0.012
%N tejido	-15.337	6	<0.001

ANEXO II.- Análisis de varianza para comparar el efecto de tres tipos de alimento sobre la talla, peso seco, peso libre de ceniza, mortalidad acumulada, y contenido porcentual de carbono y nitrógeno orgánico en poslarvas de *Crassostrea gigas*, de 22 días de edad. Las comparaciones del contenido de carbono y nitrógeno se realizaron en organismos enteros, así como en la concha, y el tejido del organismo. Las poslarvas fueron alimentadas con tres tratamientos distintos: *Thalassiosira pseudonana*, *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-Iso) y microalgas comerciales inertes (Algamac 2000). gl = grados de libertad, SS = suma de cuadrados, MS media cuadrada, F = estadístico de prueba, p = probabilidad de rechazo de H₀.

Fuente de Variación	gl	SS	MS	F	P
Talla (µm)					
Alimento	2	1952922.1	976461.1	478.3	<0.001
Error	6	12249.8	2041.6		
Total	8	1965171.9			
Peso Seco (µg)					
Alimento	2	91582.9	45791.4	76.8	<0.001
Error	6	3578.5	596.4		
Total	8	95161.4			
Peso libre de ceniza (µg/ind)					
Alimento	2	1043.66	521.83	68.445	<0.001
Error	6	45.74	7.62		
Total	8	1089.40			

ANEXO II (continuación)

Fuente de Variación	gl	SS	MS	F	P
Mortalidad acumulativa (%)					
Alimento	2	5301.7	2650.8	11.5	<0.001
Error	16	3691.6	230.7		
Total	18	8993.3			
Proteínas totales (µg/ind)					
Alimento	2	300.0	150.0	71.7	<0.001
Error	6	12.6	2.1		
Total	8	312.6			
Energía bruta (Kj/gr)					
Alimento	2	18.4	9.2	42.9	<0.001
Error	6	1.3	0.2		
Total	8	19.7			
% C Organismo completo					
Alimento	2	7.9	3.9	14.9	0.005
Error	6	1.6	0.3		
Total	8	9.5			
%C concha					
Alimento	2	0.6	0.3	4.9	0.053
Error	6	0.4	0.1		
Total	8	0.9			
%C tejido					
Alimento	2	33.4	16.7	1.2	0.355
Error	6	81.0	13.5		
Total	8	114.4			
%N Organismo completo					
Alimento	2	0.4	0.2	26.1	0.001
Error	6	0.0	0.0		
Total	8	0.4			

ANEXO II (Continuación)

Fuente de Variación	gl	SS	MS	F	P
	%N concha				
Alimento	2	0.04	0.02	1.8	0.239
Error	6	0.07	0.01		
Total	8	0.12			
	%N tejido				
Alimento	2	2.9	1.5	2.6	0.150
Error	6	3.3	0.6		
Total	8	6.3			

ANEXO III.- Datos crudos y promedios de carbono y nitrógeno en organismos completos de *C. gigas*.

Días	% C		% N		
	Total	Promedio	Total	Promedio	
	0	22.96	22.7 ± 0.23	3.89	3.8 ± 0.04
	0	23.13		3.94	
	0	22.26		3.79	
	0	22.27		3.75	
	2	19.33	19.2 ± 0.05	2.82	2.8 ± 0.02
	2	19.15		2.75	
	2	19.14		2.74	
	2	19.08		2.72	
THA	9	15.67	15.7 ± 0.13	1.68	1.7 ± 0.03
	9	15.94		1.79	
	9	15.48		1.70	
ISO	9	17.19	17.5 ± 0.25	1.88	1.8 ± 0.03
	9	17.32		1.85	
	9	18.01		1.79	
THA	15	15.1	15.1 ± 0.03	1.54	1.5 ± 0.02
	15	14.99		1.49	
	15	15.08		1.57	
ISO	15	15.76	15.9 ± 0.08	1.52	1.5 ± 0.00
	15	15.86		1.53	
	15	16.03		1.53	
ALG	19	16.93	15.7 ± 0.75	1.86	1.7 ± 0.09
	19	14.33		1.54	
	19	15.77		1.70	
THA	19	14.29	14.3 ± 0.09	1.28	1.3 ± 0.03
	19	14.38		1.37	
	19	14.08		1.26	
ISO	19	15.86	15.5 ± 0.18	1.36	1.3 ± 0.04
	19	15.26		1.27	
	19	15.39		1.39	
ALG	22	16.98	17.4 ± 0.36	1.91	1.9 ± 0.01
	22	17.18		1.89	
	22	18.15		1.94	
THA	22	14.86	15.2 ± 0.19	1.42	1.5 ± 0.06
	22	15.44		1.59	
	22	15.42		1.58	
ISO	22	15.21	15.8 ± 0.31	1.30	1.4 ± 0.07
	22	16.28		1.46	
	22	15.84		1.53	

ANEXO IV.- Datos crudos y promedios de carbono y nitrógeno en tejido de *C. gigas*.

Días	% C en tejido	Promedio	% N en tejido	Promedio	C/N en tejido	Promedio
0	46.86	45.8 ± 0.82	9.39	9.2 ± 0.16	4.99	4.9 ± 0.02
0	47.47		9.59		4.95	
0	44.35		9.05		4.90	
0	44.39		8.91		4.98	
2	51.25	50.4 ± 0.29	12.52	12.2 ± 0.11	4.09	4.1 ± 0.02
2	50.29		12.14		4.14	
2	50.24		12.12		4.15	
2	49.92		11.98		4.17	
THA	9	40.4 ± 0.94	10.07	10.4 ± 0.24	3.99	3.9 ± 0.05
	9		10.83		3.89	
	9		10.15		3.83	
ISO	9	51.3 ± 1.71	11.05	10.8 ± 0.19	4.45	4.8 ± 0.24
	9		10.83		4.62	
	9		10.41		5.25	
THA	15	37.0 ± 0.29	7.90	7.9 ± 0.21	4.73	4.7 ± 0.10
	15		7.46		4.89	
	15		8.18		4.55	
ISO	15	42.9 ± 0.59	8.65	8.7 ± 0.03	4.86	4.9 ± 0.05
	15		8.74		4.90	
	15		8.75		5.04	
ALG	19	33.6 ± 3.72	7.59	6.8 ± 0.45	5.25	4.9 ± 0.23
	19		6.03		4.47	
	19		6.79		5.02	
THA	19	29.4 ± 0.77	8.31	8.5 ± 0.30	3.59	3.5 ± 0.06
	19		9.09		3.36	
	19		8.09		3.46	
ISO	19	41.6 ± 1.42	8.56	8.4 ± 0.28	5.18	4.9 ± 0.17
	19		7.88		5.03	
	19		8.81		4.62	
ALG	22	42.9 ± 1.90	7.88	7.9 ± 0.07	5.15	5.4 ± 0.20
	22		7.79		5.34	
	22		8.03		5.82	
THA	22	39.7 ± 1.63	8.07	9.0 ± 0.47	4.51	4.4 ± 0.05
	22		9.54		4.34	
	22		9.44		4.36	
ISO	22	44.2 ± 2.69	8.10	9.2 ± 0.57	4.85	4.8 ± 0.19
	22		9.45		5.14	
	22		10.03		4.47	

ANEXO V.- Datos crudos y promedios de carbono y nitrógeno en concha de *C. gigas*.

Dias	% C en concha		% N en concha		C/N en concha		
		Promedio		Promedio		Promedio	
0	13.99	13.7 ± 0.21	1.92	1.8 ± 0.13	7.30	7.9 ± 0.48	
0	13.93		1.86		7.50		
0	13.21		1.50		8.82		
0							
2		11.9 ± 0.35		0.6 ± 0.18		23.2 ± 6.73	
2	11.57		0.39		29.90		
2	12.26		0.75		16.43		
2							
THA	9	11.68	11.6 ± 0.04	0.34	0.3 ± 0.02	34.87	40.2 ± 2.78
	9	11.55		0.26		44.25	
	9	11.56		0.28		41.43	
ISO	9	11.57	11.6 ± 0.02	0.29	0.3 ± 0.01	39.35	41.3 ± 1.34
	9	11.61		0.29		40.59	
	9	11.62		0.27		43.85	
THA	15	12	12.1 ± 0.10	0.69	0.7 ± 0.04	17.34	17.6 ± 0.98
	15	12.09		0.63		19.34	
	15	12.33		0.77		15.95	
ISO	15	11.8	11.9 ± 0.10	0.41	0.4 ± 0.07	28.85	30.1 ± 4.70
	15	11.74		0.30		38.75	
	15	12.06		0.53		22.58	
ALG	19	11.43	11.1 ± 0.32	0.51	0.4 ± 0.05	22.63	28.6 ± 3.49
	19	11.46		0.33		34.73	
	19	10.48		0.37		28.48	
THA	19	11.76	12.3 ± 0.33	0.32	0.4 ± 0.02	36.41	33.9 ± 1.55
	19	12.89		0.38		34.19	
	19	12.15		0.39		31.07	
ISO	19	11.72	11.7 ± 0.02	0.34	0.3 ± 0.02	34.57	39.8 ± 2.82
	19	11.68		0.29		40.56	
	19	11.64		0.26		44.26	
ALG	22	11.44	11.4 ± 0.01	0.63	0.5 ± 0.06	18.10	23.3 ± 2.66
	22	11.41		0.42		26.91	
	22	11.45		0.46		24.84	
THA	22	12.5	12.0 ± 0.24	0.70	0.5 ± 0.08	17.78	23.2 ± 2.76
	22	11.84		0.48		24.72	
	22	11.73		0.44		26.97	
ISO	22	11.9	11.9 ± 0.05	0.38	0.4 ± 0.03	31.65	31.9 ± 2.41
	22	12.02		0.43		27.95	
	22	11.86		0.33		36.27	