



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE  
BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**

**CULTIVO DE LARVAS DE *Ostrea edulis* L.  
(OSTION EUROPEO) ALIMENTADAS CON MICROALGAS  
PRODUCIDAS EN BIODIGERIDOS DE ESTIERCOL  
DE VACA Y GALLINA**



**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**OCEANOLOGO**  
**PRESENTA**  
**MARIO CASTILLO ADAME**

Ensenada, B.C., Diciembre de 1990.

CULTIVO DE LARVAS DE Ostrea edulis L. (OSTION EUROPEO)

ALIMENTADAS CON MICROALGAS PRODUCIDAS EN BIODIGERIDOS DE  
ESTIERCOL DE VACA Y GALLINA.

TESIS

QUE PRESENTA

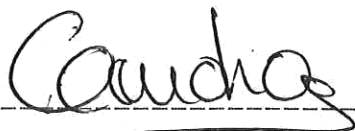
MARIO CASTILLO ADAME

APROBADA POR



PRESIDENTE DEL JURADO

M. C. ISAI PACHECO RUIZ



SINODAL PROPIETARIO

OC. VICTOR GENDROP FUNES



SINODAL PROPIETARIO

OC. CARLOS GRANADOS MACHUCA



SINODAL SUPLENTE

OC. ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA



SINODAL SUPLENTE

DRA. ELIZABETH ORELLANA CEPEDA

## RESUMEN.

Se llevaron acabo dos experimentos para medir el valor alimenticio de una dieta de algas mixta Isochrysis aff. galbana (T-ISO) y Tetraselmis suecica producidas en un medio preparado con biodigeridos de estiércol de vaca y gallina en la crianza de larvas de Ostrea edulis. Los experimentos iniciaron cuando las larvas fueron liberadas y continuaron hasta que se pusieron a fijar. En el primer experimento no hubo diferencias significativas en el crecimiento de las larvas alimentadas con microalgas producidas en el medio químico (Matthiessen y Torner, 1966) y las larvas alimentadas con microalgas crecidas en medio con biodigeridos. El segundo experimento sí hubo diferencias significativas observandose mejor crecimiento en larvas alimentadas con microalgas producidas en medio con biodigeridos.

En sobrevivencia se obtuvieron diferencias significativas en larvas trabajadas en mayo entre la replica Qui2 y Org2 con respecto a Qui1. No hubo significancia entre las larvas alimentadas con microalgas producidas en ambos medios de cultivo en el mes de julio. Se obtuvo un 45.1% de semilla en el primer experimento correspondiente a larvas alimentadas con microalgas del medio químico y un 34.8% de semilla producida de larvas alimentadas con microalgas del medio orgánico en el segundo experimento. Las microalgas producidas en el medio con biodigeridos de estiércol de vaca y gallina, así como los componentes mismos del licor biodigerido, proveen una buena dieta para el desarrollo de larvas de Ostrea edulis hasta la obtencion de semilla.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC por facilitarme el laboratorio de acuicultura para la realización de este trabajo.

Al centro de computo del CICESE por el uso de sus computadoras, donde llevé acabo todo el procesamiento de datos.

Agradezco de antemano a mi director de tesis M. C. Isal Pacheco por sugerirme este trabajo, por compartir parte de sus conocimientos en la elaboración del mismo y por su larga espera .....gracias!.

a mis sinodales, Oc. Victor Gendrop Funes, Oc. Carlos Granados Machuca, Dra. Elizabeth Orellana cepeda, Oc. Enrique Valenzuela Espinoza, quienes gracias a sus sugerencias y buenas observaciones mejoraron el escrito de este trabajo. En especial al Oc. Victor Gendrop jefe del proyecto por sus asesorias en el manejo de larvas y su ayuda en la obtención del material usado.

Mi agradecimiento especial a la Oc. Miriam Poumian Tapia por su ayuda desinteresada en el procesamiento de los datos y siempre disponible cuando la necesité. Gracias Miriam por soportar tantas molestias.

A mi excompañero y amigo Oc. Marcos Gonzalez Gómez por permitir usar tu micro así como la enseñanza básica para que fuera posible elaborar este trabajo.

Al M. C. Carlos Torres Navarrete por darme parte de tu tiempo en la elaboración de las tablas.

A todas aquellas personas que siempre creyeron en mi y de una u otra manera me alentaron ..... gracias!!!

## DEDICATORIA

A mis padres Mario y Roberta:

Por mantener su confianza, apoyo y cariño. Y su larga espera por ver terminado este trabajo.

A mi esposa lolita y mis hijos Mario Alberto y Emily Leonela:

Por soportar estos ratos de poca atención de mi parte, pero con el fin de lograr algo mejor en mi y sirva a ustedes como estímulo para su superación.

A mis tíos Jorge, Carlos, Pedro, Samuel y Ventura:

En lo poco ó mucho que me ayudaron para llegar hasta aquí.....muchas gracias!!

A la familia García Solís:

Por dejarme compartir sus momentos y ser parte de ustedes por todo este tiempo.

Al P. O. MaCA:

Quien después de superar tantos problemas te decidiste a terminar algo que tenías inconcluso.....FELICIDADES!!!.

## INDICE

1.0.- Introducci3n -----	1
2.0.- Objetivo -----	8
3.0.- Materiales y Metodos -----	8
3.1.- Sistema de mantenimiento en el laboratorio y aprovisionamiento de agua. Parámetros Físico- químicos -----	8
3.2.- Obtención del material orgánico -----	11
3.3.- Carga orgánica de biodigestores y colecta de los licores biodigeridos -----	11
3.4.- Preparación del medio de cultivo y producción de microalgas -----	13
3.5.- Liberación y colecta de larvas -----	15
3.6.- Desinfección, conteo y medición de larvas -	15
3.7.- Cultivo y alimentación -----	17
3.8.- Tratamiento estadístico -----	20
4.0.- Resultados -----	21
5.0.- Discusión -----	30
6.0.- Conclusiones -----	35
7.0.- Literatura citada -----	36

## LISTA DE FIGURAS.

Figura 1.- Vista frontal de las cubetas de cultivo -	10
Figura 2.- Composición del sistema digestor -----	12
Figura 3.- Vista parcial del sistema de acondiciona- miento y disposición del tamiz colector -----	16
Figura 4.- Curva de crecimiento larval de <u>Ostrea edulis</u> -----	23
Figura 5.- Curva de sobrevivencia larval de <u>Ostrea edulis</u> -----	28

## LISTA DE TABLAS.

TABLA I.- Tasa de crecimiento instantaneo promedio (K) para larvas alimentadas con microalgas producidas en medio quimico (Qui) y medio organico (Org) --	24
TABLA II.- Analisis de varianza no parametrico de dos vias para los experimentos I Y II -----	26
TABLA III.- Numero inicial de larvas que se trabajó en cada réplica así como su sobrevivencia media a fijación y obtención final de semilla en los experimentos de mayo (a) y julio (b) -----	27
TABLA IV.- Prueba t student con varianzas iguales para los datos de sobrevivencia de los experimentos realizados en mayo y julio -----	29

## 1.0 INTRODUCCION.

En la actualidad el cultivo controlado de especies marinas de valor comercial es una actividad que se expande rápidamente debido a la necesidad de satisfacer la alimentación humana. Difícilmente, la capacidad de producción natural, logra satisfacer esta demanda siendo ésta la razón principal que motiva la utilización de cultivos extensivos en especies autóctonas e introducidas que presenten los requerimientos necesarios para su cultivo, con un crecimiento rápido (Fernandez-García, 1984).

Muchos tipos de organismos marinos han sido estudiados para estos propósitos, principalmente los moluscos bivalvos (Creekman, 1977). En este momento, los ostiones producidos en criaderos son una realidad. Este hecho ha permitido que el alimento de origen marino se haya ido incrementando, fomentando a la vez el establecimiento de nuevos laboratorios o granjas-criaderos para la producción de semillas de ostión principalmente.

Pocos años después de la introducción en aguas mexicanas de las especies de ostión japonés Crassostrea gigas y el ostión europeo Ostrea edulis, se inició el desarrollo de técnicas de cultivo que permitieron la obtención de semillas bajo condiciones controladas, al menos para el ostión japonés (Islas et al. , 1978b). A la fecha se cuenta con tres laboratorios de producción de semilla de

osti6n jap6nes en los estados de Nayarit, Sonora y Baja <sup>2</sup> California (Baqueiro-Cardenas, 1984).

Las t6cnicas empleadas en estos laboratorios, son las mismas que se utilizan en Estados Unidos y Jap6n principalmente, no obstante, se continuan realizando estudios para mejorar la calidad y sobrevivencia de las larvas obtenidas en el laboratorio ( Fernandez-Garcia, 1984 ).

El Instituto de Investigaciones Oceanol6gicas de la Universidad Aut6noma de Baja California dentro de su programa "Investigaciones acuiculturales para el desarrollo de biot6cnicas a nivel piloto y semicomercial", trabaj6 en el desarrollo de t6cnicas de cultivo para varias especies de bivalvos de importancia comercial como lo son la pequena almeja Tapes japonica y el osti6n europeo O. edulis. De este 6ltimo, se cont6 con poblaciones reproductoras establecidas desde hace algunos a6os en Bahía San Quintín, B. C. (Islas et al ., 1978a). Por lo que el programa antes mencionado, constituy6 un esfuerzo en la b6squeda de alternativas y diversificaci6n de las actividades pesqueras ribere6as de tipo acuicultural.

Para la obtenci6n de un medio eficiente en la producci6n de microalgas, se han hecho estudios a trav6s del tiempo, desde Farmitzin (1871 cit. en Paniagua-Michel 1984) que probablemente fue el primero que empez6 con cultivos algales, determinando las necesidades nutritivas del agua con el auxilio de soluciones inorg6nicas, hasta

llegar a la obtención de medios más sofisticados como los de McLachlan (1973), que contienen en adición mezclas de metales traza y vitaminas.

Existen una gran variedad de medios para la producción de fitoplancton, éstos son el Erd-schreiber, Provasoli, el f/2 de Guillard, SWM de McLachlan, (cit. en McLachlan, 1973) Matthiessen y Torner, N 10 de Chu, Miquel, Ket chun, Redfield, Kain y Fogg, y el de Foyn (citado en Granados-Machuca y Paniagua-Michel, 1981). A pesar de la gran eficiencia de los medios anteriores, una de las desventajas es el alto costo de adquisición de los reactivos especiales para su enriquecimiento que se obtienen en casas comerciales a costos elevados. Esto influye en un aumento considerable de los costos de producción del bivalvo en sus primeros estadios larvales con este alimento. Bolton (1982 cit. por Urban y Langdon, 1984) menciona que la producción de algas es costosa y puede considerarse de un 15 a 85% de los costos de producción de un criadero.

Producir alimento a bajo costo es una necesidad en cualquier país en vía de desarrollo. Por esta razón, las investigaciones que se realicen con el fin de mejorar la producción de un recurso, deben considerar básicamente fuentes naturales de alimento.

En una investigación realizada por Granados-Machuca y Paniagua-Michel (1981), se desarrollaron dos medios de cultivo para las microalgas Skeletonema costatum y

4

Monochrysis lutheri, que consistió el primero de una mezcla de biodigeridos de estiércol de vaca y gallina y el otro en una mezcla del alga parda Macrocystis pyrifera y el pasto marino Zostera marina. Los autores no encontraron diferencias significativas en el crecimiento de las microalgas cultivadas en comparación con el medio químico de Matthiessen y Torner (1966). Posteriormente Paniagua-Michel (1984), elaboró otro medio con extractos de estiércol de vaca, gallina y Macrocystis pyrifera encontrando que el uso de extractos biodigeridos, en la preparación de medios de cultivo para microalgas, reduce el costo de producción en un 70% .

Aún cuando se han producido eficientemente microalgas con los medios preparados con biodigeridos, es interesante probar el valor nutritivo de las microalgas cultivadas en estos medios evaluando su efecto en el crecimiento y la sobrevivencia de las larvas de O. edulis ó algún otro molusco bivalvo. De ser un alimento satisfactorio, el costo de producción de semilla se reduciría.

La alimentación de larvas de moluscos, particularmente de O. edulis se inició en 1923 con el enriquecimiento orgánico de tanques experimentales, dando resultados favorables. En 1924 exámenes histológicos de larvas alimentadas con granos de almidón mostraron dificultad para digerir partículas mayores de 10  $\mu$ m en diámetro. Estos dos factores iniciaron la búsqueda del alimento apropiado con partículas

del agua de mar. Por algunos años se dió la atención a Fucus sp., desarrollándose el primer cultivo próspero de larvas hasta metamorfosis en 1930. Una gran variedad de alimento, incluyendo levaduras, algas picadas y cloroplastos de Ulva sp. también fueron probadas. Al mismo tiempo, técnicas para la separación y cultivos unialgales de pequeñas células de forma simple fueron desarrolladas (Walne, 1974).

Al alimentar larvas de bivalvos con microalgas, se encontró que éstas proveían los requerimientos necesarios para su buen desarrollo. Por lo que, cultivos unicelulares de algas han sido utilizados por décadas, como una fuente de alimento en el cultivo comercial de especies importantes de bivalvos (ostiones, almejas, mejillones, escalopas) en criaderos (Chu et al., 1987).

Varios autores han mostrado que alimentar larvas de bivalvos con una dieta de algas mixtas tiene un mejor efecto en el crecimiento que, usándolas en forma individual (Davis y Guillard, 1958; Walne y Spencer, 1968; Calabrese y Davis, 1970 cit. en Helm, 1977). El efecto del valor de la dieta ha sido estimado casi invariablemente sobre el crecimiento larval y sobrevivencia hasta metamorfosis.

Actualmente, el alimento más utilizado para larvas de D. edulis, es la microalga Tetraselmis suecica así como Isochrysis galbana ya sea individual o en dieta mixta. Otro aspecto importante en el uso de algas mixtas, es que la

semilla obtenida presenta menor mortalidad que las larvas<sup>6</sup> alimentadas con una sola alga (Walne, 1974).

Se han hecho varias investigaciones para reducir el alto costo que representa el cultivo constante de microalgas, ya sea mediante el empleo de técnicas diferentes a las tradicionales o sustituirlas por el uso de dietas artificiales. Una opción es la utilización de poblaciones naturales de algas como alimento, inducidas al crecimiento por incremento de nutrimentos y niveles de luz incidente (Wilson, 1978). Esto ha sido significativo en algunos criaderos donde las algas nativas satisfacen los requerimientos nutricionales de los bivalvos juveniles (Hidu y Richmond, 1972 cit. en Wilson 1978).

Epifanio, (1979) usó una dieta de levadura y alga en una composición variada de 100% del alga cultivada Thalassiosira pseudonana a 100% de la levadura Candida utilis, en juveniles de cuatro moluscos bivalvos observando un crecimiento satisfactorio en tres de las cuatro especies probadas.

Fernandez-García (1984), realizó un trabajo de sobrevivencia y crecimiento de larvas de C. gigas alimentadas con Pseudoisochrysis paradoxa y suplementos de almidón de maiz, observó que es satisfactorio a ciertas concentraciones. En cambio con miel de abeja como suplemento no fue favorable.

Se han desarrollado varias dietas artificiales confia-

bles y económicas para la alimentación de bivalvos fil-<sup>7</sup>  
troalimentadores, (Langdon, 1983; Langdon y Siegfried, 1984;  
Urban y Langdon, 1984 y Chu et al., 1987 ). Estas dietas  
fueron utilizadas como suplemento o como fuente principal  
de alimento de larvas, juveniles y adultos. Actualmente no  
es comparable una dieta artificial con una algal en el  
soporte de crecimiento y desarrollo de larvas y juveniles  
de bivalvos siendo mejor la dieta algal (Chu et al., 1987).

Un problema persistente en el cultivo de larvas fil-  
troalimentadoras, es la contaminación del alimento no  
consumido por éstas con bacterias. Existen varios reportes  
sobre el efecto nocivo de esta contaminación, tanto para  
las mismas microalgas como para los organismos alimentados  
con éstas (Aguirre-Muñoz, 1981).

Prieur y Carbal (1979), en un estudio bacteriológico  
de un criadero de bivalvos encontraron que el alimento  
utilizado afecta a las larvas debido a las sales nutritivas  
y a las bacterias presentes junto con microalgas.

Millar y Scott (1967), mencionan que la cantidad de  
bacterias en los cultivos varía grandemente y a veces son  
altas aun cuando se usan antibióticos, aunque estos reducen  
el porcentaje de fracaso.

Las larvas de ostión para la obtención de semilla son  
usualmente criadas en agua estática en número denso,  
temperaturas altas y alimentadas con una gran cantidad de  
algas unicelulares. Estas condiciones favorecen la

proliferación de bacterias heterotróficas, tales como:<sup>8</sup>  
Achromobacter, Acinetobacter, Aeromonas, Pseudomonas,  
Cytophaga, Corynebacterium, y Vibrio (Lodeiros et al.,  
1987).

Le Pennec y Prieur (1977), realizaron un análisis bibliográfico sobre el uso de antibióticos en el cultivo controlado de larvas de bivalvos marinos. Reportan un total de seis antibióticos para el cultivo de larvas del ostión europeo O. edulis. De ellos solo la penicilina, estreptomina y sulfametacina muestran resultados favorables, en cuanto a sobrevivencia y crecimiento.

## 2.0 OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo es probar una dieta algal mixta de Isochrysis aff. galbana ( T-ISO ) y Tetraselmis suecica, producidas en medio de cultivo orgánico preparado con biodigeridos de estiércol de vaca y gallina, en el crecimiento y sobrevivencia de las larvas de Ostrea edulis.

## 3.0 MATERIALES Y METODOS.

3.1.- Sistema de mantenimiento en el laboratorio y aprovisionamiento de agua. Parametros Físico-químicos.

El laboratorio de acuicultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas cuenta con un sistema de

9  
circulación de agua abierto, el cual es apoyado por un depósito de agua de mar de 305 metros cúbicos de capacidad.

La red de distribución dentro del laboratorio, proporciona en zonas accesibles tomas de agua de mar cruda, filtrada y desinfectada mediante un sistema de luz ultravioleta (UV) modelo H-50, el cual consta de ocho lámparas con capacidad de ochenta galones por minuto, la filtración del agua de mar es efectuada a través de un filtro de arena TRITON modelo TR60, con una capacidad de cuarenta galones por minuto, el cual elimina partículas de material orgánico relativamente grandes. Posteriormente se utiliza filtros CUNO para la eliminación de todas aquellas partículas mayores de cinco micras.

El sistema de aire, el cual proviene de un compresor CONDE 12 de tres H. P., cuenta con una red de distribución que va hasta los tanques de cultivo. El aire antes de llegar al tanque de cultivo pasa por filtro tipo GELMAN ACRO 50, el cual retiene partículas de carbón, polvo y algunas bacterias, esporas y hongos.

Se utilizaron cuatro cubetas de plástico de 30 litros de capacidad, que se encontraban dispuestos sobre una mesa de madera para facilitar su manejo ( fig. 1 ).

No se controló la temperatura del cultivo, esta fluctuó de acuerdo a la temperatura ambiental del laboratorio. Sin embargo, la temperatura del cultivo larval se registró con un termómetro ERTCO intervalo -35 a 50°C. La

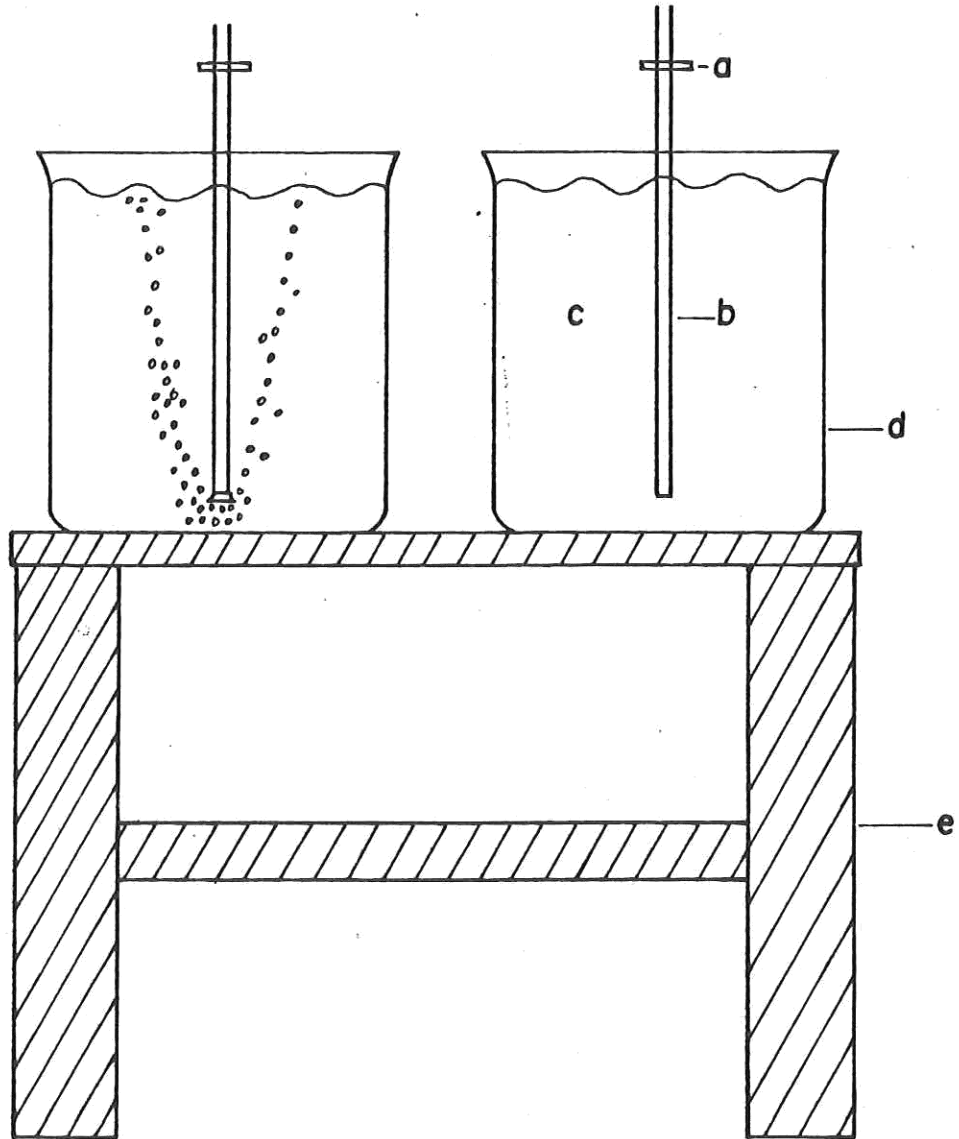


Fig. 1.- Vista frontal de las cubetas de cultivo:  
a).- Filtro de aire, b).- tubo de vidrio, c).- agua de mar, d).- cubeta de plástico. e).- mesa de madera.

salinidad se registró con un refractómetro A.O. GOLDBERG de 0 a 160‰ .

### 3.2.- Obtención del material orgánico.

Los productos orgánicos utilizados para la elaboración de los medios se colectaron en lugares aledaños a la ciudad de Ensenada, B.C. El estiércol de gallina se obtuvo de la granja avícola "Azucena" localizada al parte Sur-Este de la ciudad, y el de vaca se tomó de un rancho lechero localizado sobre la carretera Ensenada-Maneadero. Tanto las excretas de vaca como de gallina fueron de reciente deposición.

### 3.3.- Carga orgánica de biodigestores y colecta de los licores biodigeridos.

Los biodigestores utilizados para el tratamiento de los productos (estiércoles de vaca y gallina), fueron iguales a los diseñados y usados por Paniagua-Michel (1984; figura 2). Cada biodigestor se cargó con un kilogramo de su respectivo producto y 15 litros de agua dulce, cantidades agregadas de acuerdo a la capacidad de cada biodigestor para una adecuada recirculación. La colecta de los licores biodigeridos se tomaron para los extractos de gallina el día 25 y el de vaca a los 10 días de procesado (Paniagua-Michel, 1984).

Al colectar los biodigeridos se utilizó un filtro sencillo, consistente de un tubo acrílico relleno de esponja para retener los fragmentos grandes que pudieran pasar a

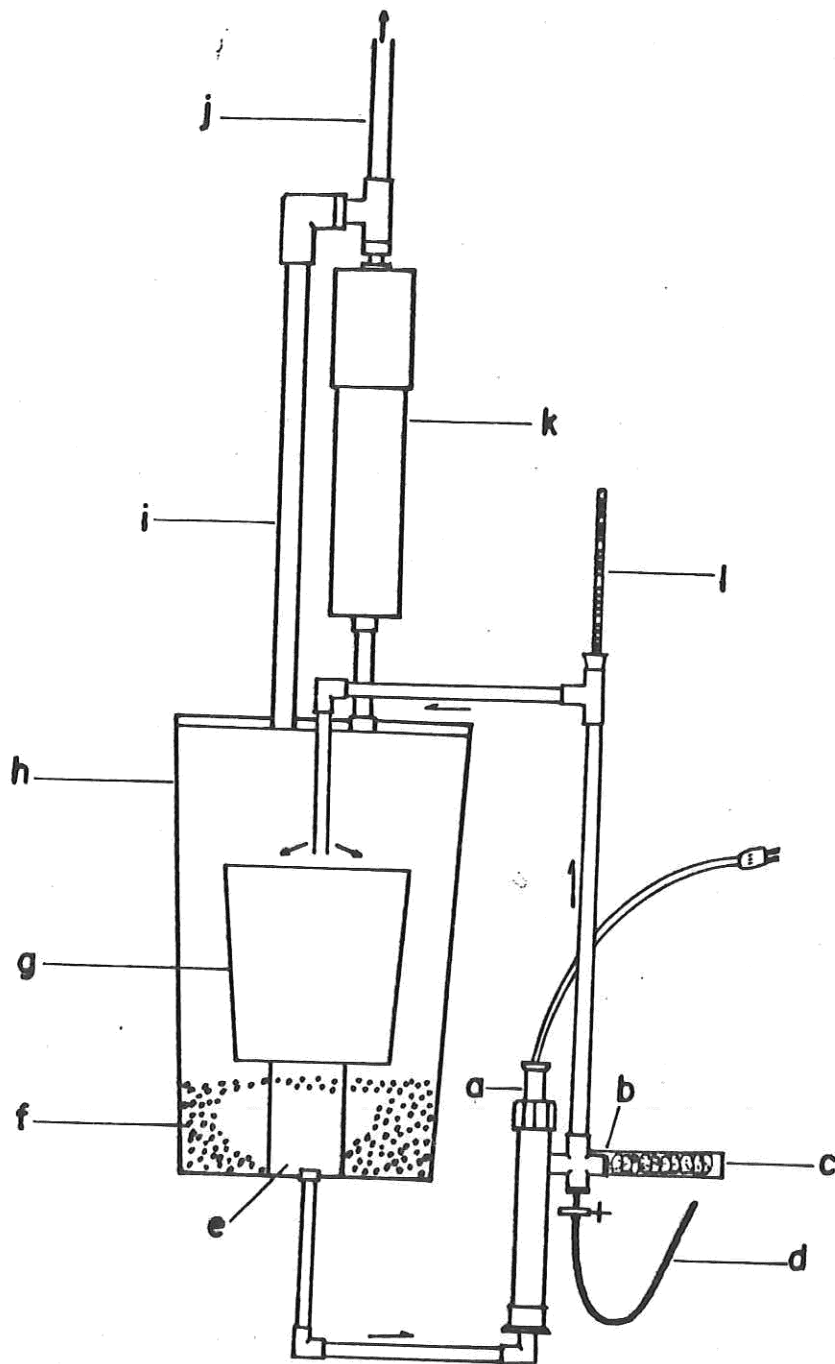


Fig. 2).- Sistema digestor:

- a).- calentador, b).- lugar de colecta, c).- filtro, d).- inyección de aire, e).- soporte del recipiente, f).- capa de roca, g).- recipiente, h).- descarga del licor, i).- retorno, j).- desfogue de gases, k).- eliminador de espuma, l).- termómetro.

través del filtro de grava (Fig. 2c). Una vez colectados los biodigeridos se ajustó el pH en un intervalo de 4.5-5 para conservar las vitaminas. Posteriormente se colocaron en Carboys para su esterilización en una autoclave a 15 lb/plg<sup>2</sup> y 115°C por un tiempo de 15 minutos con el fin de eliminar bacterias.

Una vez esterilizado y enfriado a temperatura ambiente el licor biodigerido, se procedía a filtrar en una bomba de vacío de 1/3 H.P. de 1725 R.P.M. con el uso de papel filtro WHATMAN #42 con el fin de retener partículas finas. Posteriormente se esterilizaba bajo las condiciones anteriores para su uso en la preparación de medios de cultivo.

3.4.- Preparación del medio de cultivo y producción de microalgas.

Las microalgas utilizadas en el medio preparado con la mezcla de estiércol así como en el medio químico de Matthiessen y Torner (1966) y a la vez para su uso como alimento a las larvas del ostión europeo fueron I. suecica e I. aff. galbana ( T-ISO ).

Para la preparación de los medios de cultivo se usó una mezcla de los dos extractos en la proporción de cinco partes de licor de gallina y tres partes de licor de vaca completando 40 ml de medio aforado a un litro de agua de mar a 28‰ .

Todos los medios de cultivo ( Erlenmeyers 50 ml, Fernbach 1500 ml, y Carboys 15000 ml.) fueron preparados

con una mezcla de agua de mar y dulce, filtradas y pasadas<sup>14</sup> por UV hasta tener una salinidad de 28‰.

El primer nivel de cultivo se inició con 10 Erlenmeyers de 250 ml que contenían 50 ml de agua de mar más dulce los cuales se esterilizaron en una autoclave de 15 lb/plg<sup>2</sup> y 115°C durante 15 minutos. Una vez que alcanzaban la temperatura ambiente, en condiciones asépticas con la ayuda de dos mecheros BUNSEN, se les agregaba la mezcla de 1.25 ml de licor de gallina y 0.75 ml de licor de vaca y se inoculaban con 10 ml de cepa de las algas mencionadas anteriormente. Al séptimo día se inoculaban a los Fernbach con las microalgas crecidas en los Erlenmeyers, con los Fernbach se inocularon los Carboys, de donde se obtuvieron las microalgas para alimentar las larvas. En los Fernbach y Carboys se aplicó la misma metodología que en los Erlenmeyers, variando sólo la cantidad de mezcla de extractos añadido el cual fue proporcional al volumen de agua de mar.

Los Erlenmeyers y Fernbach se agitaban diario manualmente para la completa difusión de nutrimentos y evitar el asentamiento de células. El nivel Carboys en la boca tenían tapón de neopreno con tres orificios, uno para la entrada de la varilla de vidrio que introduce el aire, otro para respiración y el último para la colecta del alimento.

Se utilizaron seis Carboys tres para I. aff. galbana (T-ISO) y tres para I. suecica inoculados alternativamente para que se tuviera alimento diario en la fase exponencial

de crecimiento y parte de la fase estacionaria en ambos medios.

Las cepas que se utilizaron en los experimentos fueron proporcionadas del cultivo de microalgas del laboratorio de acuicultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Los cultivos fueron mantenidos en el cuarto frío a 19±1°C.

### 3.5.- Liberación y colecta de larvas.

Las larvas utilizadas en este experimento se obtuvieron a partir de liberaciones naturales de organismos sexualmente maduros, los cuales se encontraban en un sistema abierto de acondicionamiento donde eran alimentados con una dieta a base de I. suecica complementada con carbohidratos en forma de almidón disuelto.

Las liberaciones se presentaron con regularidad a partir del mes de marzo, hasta el mes de septiembre de 1985, siendo en ese período donde se llevó a cabo el experimento.

Las larvas se colectaron con un tamiz de luz de malla de 102 µm, el cual se encontraba colocado a la salida del sistema de acondicionamiento (Fig. 3).

### 3.6.- Desinfección, conteo y medición de larvas.

Las larvas recién liberadas se sometieron a un tratamiento de desinfección, para lo cual primeramente fue necesario pasarlas en un juego de tres tamices, los dos primeros de 300 µm y 220 µm respectivamente, permitían

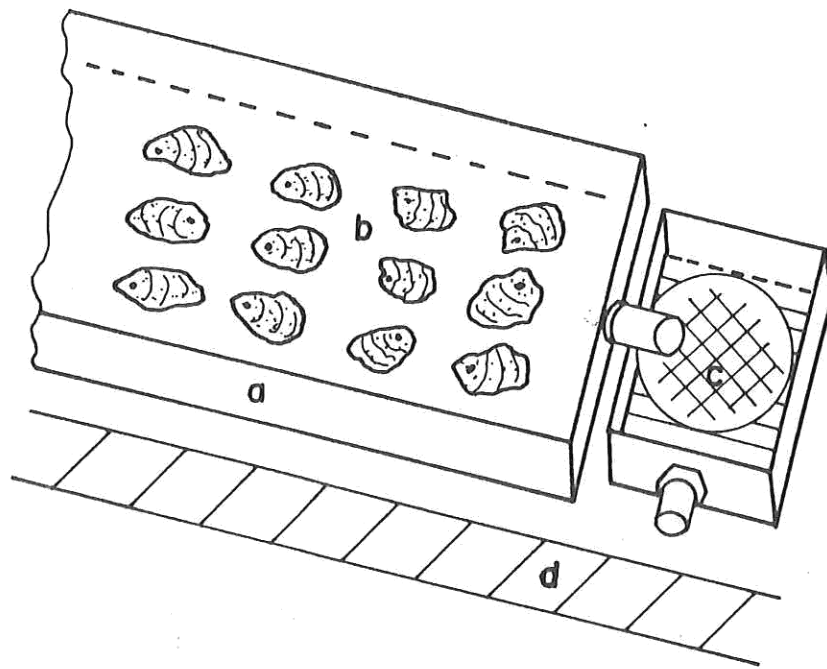


Fig. 3).- Vista parcial del sistema de acondicionamiento y disposición del tamiz colector:  
a).- charola de acondicionamiento, b).- organismos progenitores, c).- tamiz colector, d) descarga de agua.

17

eliminar las partículas grandes de material orgánico. Las larvas quedaban retenidas en el tamiz inferior con una malla de 102  $\mu\text{m}$ . En éste, eran lavadas con un flujo suave de agua pasada por UV para eliminar las partículas más pequeñas. Posteriormente, se secaba un poco externamente en su base con papel secante, para que las larvas se cerraran. En seguida se les daba un baño en agua de mar (UV) al cual se le añadía una solución comercial de hipoclorito (6%) para obtener una concentración de tres ppm. de cloro por un período de cinco minutos, tiempo suficiente para matar a la mayoría de las bacterias adheridas a la concha (Walne, 1974).

Después de este tratamiento, las larvas eran nuevamente enjuagadas y entonces colocadas para su conteo y medición en un recipiente con un volumen de 4 litros. Se uniformizó la muestra con un agitador formado por un mango de tubo de vidrio y un disco de acrílico perforado. Cuando se obtenía la homogenización, se tomaba un alicuota de 1 ml con una pipeta automática. Esta muestra era colocada en una cámara de conteo tipo SEDWICK-RAFTER de un mililitro y el número de larvas presente era determinado con un microscopio estereoscópico y un contador manual. La toma de muestra y conteo era repetida por cinco ocasiones. Uno de los cinco conteos era tomado para la medición de longitud de 50 larvas bajo un microscopio compuesto, provisto de una rejilla milimétrica en uno de sus oculares.

### 3.7.- Cultivo y alimentación.

Una vez realizado el conteo de la población de larvas y conociendo su número total, se homogenizó lo mejor posible para separar cuatro submuestras, que tuvieran un número similar de larvas. Estas muestras se pusieron en cubetas de plástico de 25 litros en agua de mar filtrada y pasada por UV. Dos de los cuales eran alimentadas diariamente con una dieta mixta de  $50 \times 10^3$  células de *I. aff. galbana* (T-ISO) y  $5 \times 10^3$  cel. de *I. suecica* por ml, (Walne, 1974; Helm, 1977), producidas en el medio químico de Matthiessen y Torner [(1966) (control Qui1, Qui2)]. Las otras dos con la misma mezcla de microalgas pero producidas en el medio preparado con los licores biodigeridos de estiércol de gallina y vaca (Org1, Org2).

Se les suministró 50 mg/l de sulfametacina para el control de bacterias tanto a las larvas alimentadas con microalgas producidas en el medio orgánico como a larvas que se alimentaron con microalgas del medio químico.

Una aireación suave fue aplicada a cada una de las cubetas de cultivo mediante un tubo de vidrio que llegaba hasta el fondo (Fig. 1). Esta aireación tenía como fin proveer una ligera agitación para asegurar un contacto más frecuente entre las larvas y el alimento, así como proporcionar buena oxigenación.

Se consideró como el día cero, al primer día en que las larvas eran colocadas en las cubetas de cultivo. A

partir de entonces, se cambi6 el agua cada tercer d1a, para esto las larvas eran drenadas de las cubetas colocandolas en un tamiz de malla de 120  $\mu$ m. Posteriormente las cubetas eran lavadas con una soluci6n de jab6n y cloro ( 50/50% ) para su desinfecci6n, llenando nuevamente cada una de ellas con agua de mar filtrada y pasada por UV. Las larvas una vez lavadas se colocaron en un recipiente de Nalgene de 2000 ml de capacidad en 1000 ml de agua de mar UV de donde se tomaron muestras para su medici6n y conteo con el fin de determinar el crecimiento y la sobrevivencia. Posteriormente se agregaron a las cubetas de cultivo conteniendo agua fresca y filtrada, antibi6tico y comida.

El cambio de agua cada tercer d1a tuvo la finalidad de eliminar los metabolitos excretados y acumulados por las larvas asi como la disminuci6n de los niveles de bacterias proliferados en el cultivo.

Se realizaron dos experimentos, en ambos se parti6 de una poblaci6n de larvas correspondientes a un mismo desove. El experimento I, se realiz6 con larvas desovadas a mediados del mes de mayo.

El experimento II, se efectu6 con larvas que fueron liberadas en el mes de julio.

Los experimentos contemplaron alimentaci6n de las larvas desde su liberaci6n hasta el momento de su puesta a fijaci6n. En este lapso, se pudo apreciar cambios morfol6gicos, especialmente la mancha ocular y el pie, en

ese momento se les introdujo una concha de ostión para ver su comportamiento, cuando ésta comenzaba a poblarse de larvas se suministró un sustrato, este consistió en fragmentos de conchas particuladas en tamaños de 370 a 500  $\mu\text{m}$  con el fin de cuantificar la fijación. Una vez que la fijación era completa, se engordaba la semilla con la misma dieta empleada en su estadio larval, por un tiempo aproximado de tres semanas, después de las cuales se eliminó tanto el sustrato no utilizado como las larvas que no se fijaron. Durante este periodo la semilla alcanzó una talla entre 500 y 2000  $\mu\text{m}$ , después se procedió a determinar la sobrevivencia total.

### 3.8.- Tratamiento estadístico.

A todos los datos de crecimiento y sobrevivencia se les aplicó estadística descriptiva obteniéndose promedios, intervalos de confianza ( 95% ), desviación estandar y error estandar para cada una de las cubetas de cultivo utilizadas en los experimentos. Además se obtuvo la tasa de crecimiento instantaneo K ( Walne, 1963 ):

$$K = \frac{(\log L_2 - \log L_1)}{t} \times 100$$

donde:

K= Tasa de crecimiento instantaneo

L1= Longitud media larval al inicio

L2= Longitud media larval al final

t= Días transcurridos de un cambio de agua a otro.

Para probar si existían diferencias significativas en crecimiento entre las larvas alimentadas con microalgas producidas en medio con biodigeridos y medio control y entre sus respectivas réplicas, se hizo un análisis de varianza de dos vías no-paramétrico (Wilson, 1956).

Para calcular la sobrevivencia, se trataron los datos del experimento II y sólo las réplicas Qui1, Qui2 y Org2 del experimento I, debido a errores técnicos en el manejo de las larvas, ya que la réplica Org1, se perdió parte de la población por un tamiz que se encontraba roto. A los datos se le aplicó una prueba t de Student con varianzas iguales (Ryan et al., 1976), para probar diferencias entre larvas alimentadas con las dos dietas de algas mixtas y sus respectivas réplicas.

Todos los análisis estadísticos se hicieron con un nivel de significancia de 0.05% . Para esto se usaron los paquetes estadísticos de MINITAB y ESIMSL disponibles en la computadora PRIME 450 del CICESE.

#### 4.0 RESULTADOS.

En el primer experimento de crecimiento que se realizó en mayo, se inició con una talla promedio larval de  $169 \pm 2$   $\mu\text{m}$  tanto para larvas del medio químico como el orgánico, alcanzando una talla promedio final de  $286 \pm 10$   $\mu\text{m}$  en 14 días

de experimentación para las larvas alimentadas con microal-<sup>22</sup>  
gas producidas en el medio químico (Qui) y  $261 \pm 8$   $\mu\text{m}$  para  
las larvas alimentadas con microalgas producidas en el  
medio orgánico (Org) (Fig. 4a).

El experimento II realizado en julio, inició con una  
talla promedio larval de  $149 \pm 2$   $\mu\text{m}$ . En 15 días de  
experimentación se alcanzó una talla promedio final de  
 $243 \pm 5$   $\mu\text{m}$  para las larvas del medio químico y  $291 \pm 4$   $\mu\text{m}$  para  
el medio orgánico (Fig. 4b).

La tasa de crecimiento instantáneo promedio en el  
primer experimento fue mayor para larvas del medio químico  
(Qui) presentando un valor promedio de 3.6 (Tabla Ia). En  
tanto que, la mejor tasa de crecimiento instantáneo prome-  
dio en el segundo experimento correspondió a larvas del  
medio orgánico (Org) con un valor de 4.5 (Tabla Ib). La  
tasa de crecimiento en el transcurso de los experimentos  
fue variable. La mejor tasa de crecimiento instantáneo en  
el primer experimento se obtuvo entre los días 11 y 14  
siendo 5.3 para el medio químico y 4.7 para el medio  
orgánico (Tabla Ia). Sin embargo, para el segundo experi-  
mento la mayor tasa de crecimiento instantáneo fue para las  
larvas del medio orgánico con 6.0 entre el tercer y sexto  
día de cultivo y 5.4 para el otro medio en los mismos días  
(Tabla Ib).

Los resultados obtenidos en el crecimiento larval no  
presentaron diferencias significativas al 95% de confianza

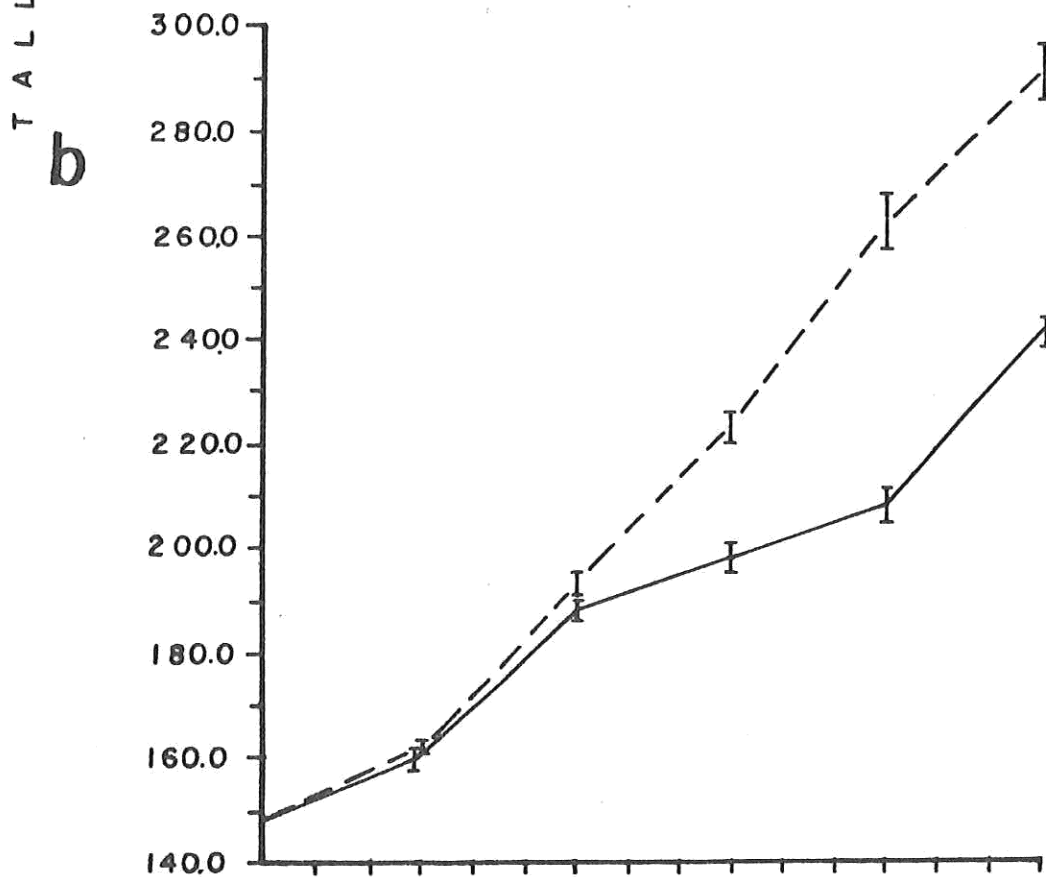
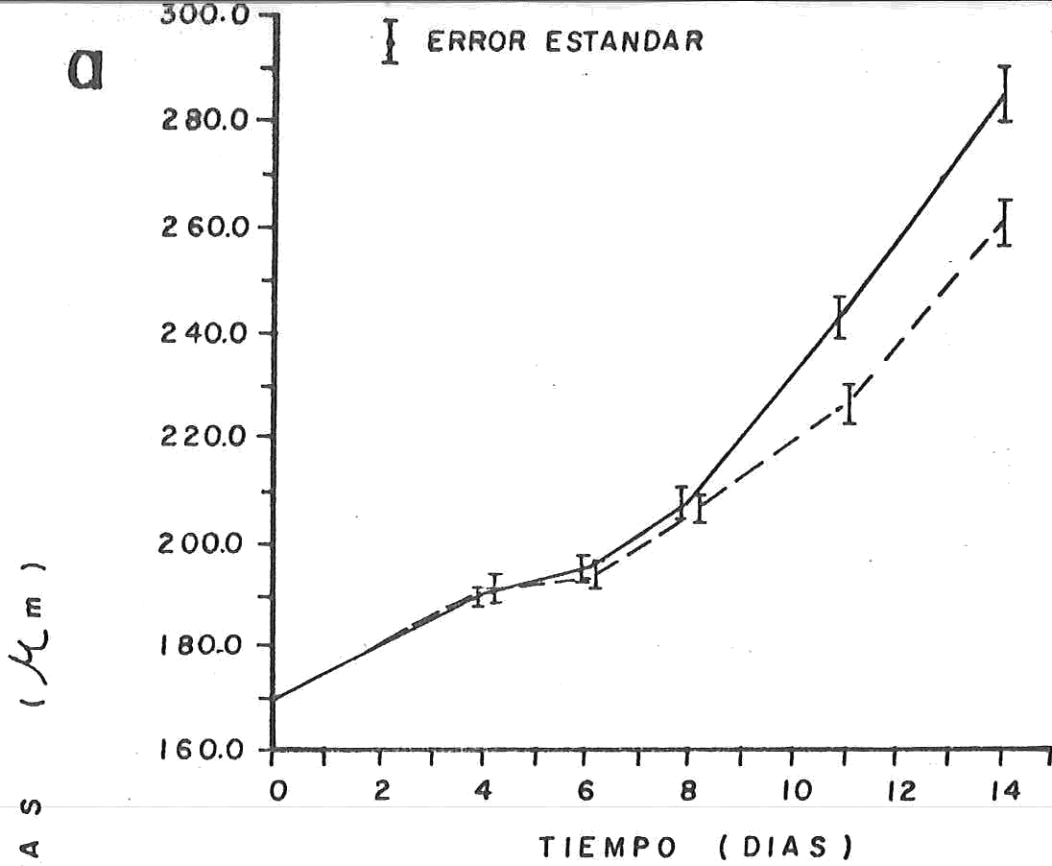


Fig. 4).- Crecimiento larval de Ostrea edulis:

a).- Experimento realizado en mayo de 1985.

b).- Experimento realizado en julio de 1985.

Qui= Medio químico(—); Org= Medio orgánico(---).

TABLA I. Tasas de crecimiento instantáneo promedio (K) para larvas alimentadas con microalgas producidas en medio químico (Qui) y medio orgánico (Org).

a) Experimento de mayo de 1985.

b) Experimento de julio de 1985.

a

DIAS	QUI.	ORG.
0-4	3.1	3.2
4-6	1.4	0.5
6-8	3.0	3.2
8-11	5.2	3.2
11-14	5.3	4.7
$\bar{X}$	3.6	3.0

b

0-3	2.5	2.9
3-6	5.4	6.0
6-9	1.7	4.7
9-12	1.7	5.2
12-15	5.1	3.6
$\bar{X}$	3.3	4.5

entre las réplicas del medio orgánico y el medio químicamente definido (Matthiessen y Torner, 1966). así mismo la interacción entre las larvas alimentadas con microalgas crecidas en el medio orgánico y las del medio químico para el mes de mayo no fueron significativamente diferentes (Tabla IIa); sin embargo, la interacción entre las larvas alimentadas con microalgas crecidas en el medio orgánico y las del medio químico, fue significativa para el mes de julio (tabla IIb), presentando mejor crecimiento las larvas que se alimentaron con microalgas producidas en el medio de cultivo con biodigeridos.

La cantidad de larvas con las que se dio inicio la sobrevivencia se tomó como el 100%. La sobrevivencia en las larvas del medio orgánico (Org2) para mayo, fue de 72% al momento de ponerse a fijar, mientras que los medios químicos (Qui1 y Qui2) tuvieron un 37 y 68% respectivamente (tabla IIIa, Fig. 5a). No existiendo diferencias significativas entre Org2 y Qui2. Sin embargo, si se observó significancia entre Org2 y Qui2 con respecto a Qui1 (tabla IVa).

Para el mes de julio la sobrevivencia de las larvas cultivadas no fueron significativas entre si, obteniendo un 38% de sobrevivencia tanto para el medio químico como el medio orgánico (tabla IIIb, Fig. 5b).

La menor temperatura correspondió al experimento realizado en mayo donde se registró una mínima de 18.7°C y

TABLA II. Análisis de varianza no paramétrico de dos vías para los experimentos I y II.

a) Experimento de mayo de 1985.

b) Experimento de julio de 1985.

a

Fuente de Variación	g.l.	$\chi^2$ calculado	$\chi^2$ crítica	significancia
Larvas alimentadas con microalgas producidas en medio químico y con biodigeridos	1	0.12449	3.84	n.s
Entre réplicas	1	0.34584	3.84	n.s
Interacción	1	0.01383	3.84	n.s

b

Fuente de Variación	g.l.	$\chi^2$ calculado	$\chi^2$ crítica	significancia
Larvas alimentadas con microalgas producidas en medio químico y con biodigeridos	1	8.46205	3.84	**
Entre réplicas	1	0.01354	3.84	n.s
Interacción	1	4.88768	3.84	*

(g.l.) grados de libertad

(n.s) no significativa ( $P > 0.05$ )

(\*) significativa ( $P < 0.05$ )

(\*\*) muy significativa ( $P < 0.01$ )

TABLA III. Número inicial de larvas que se utilizó en cada réplica así como su sobrevivencia media a fijación y obtención final de semilla en los experimentos de mayo (a) y julio (b).

a

MEDIO ORGANICO (Org2)			MEDIO QUIMICO (Qui1)		MEDIO QUIMICO (Qui2)	
DIAS	# DE ORGS.	% DE SOB.	# DE ORGS.	% DE SOB.	# DE ORGS.	% DE SOB.
0	102,480	100.0	119,040	100.0	120,708	100.0
14	73,601	71.8	43,854	36.8	81,960	67.9
45	15,088	14.7	20,114	16.9	54,488	45.1

b

MEDIO ORGANICO (Org)			MEDIO QUIMICO (Qui)	
DIAS	# DE ORGS.	% DE SOB.	# DE ORGS.	% DE SOB.
0	82,800	100.0	85,440	100.0
15	31,754	38.4	32,168	37.7
45	28,814	34.8	se contaminaron	

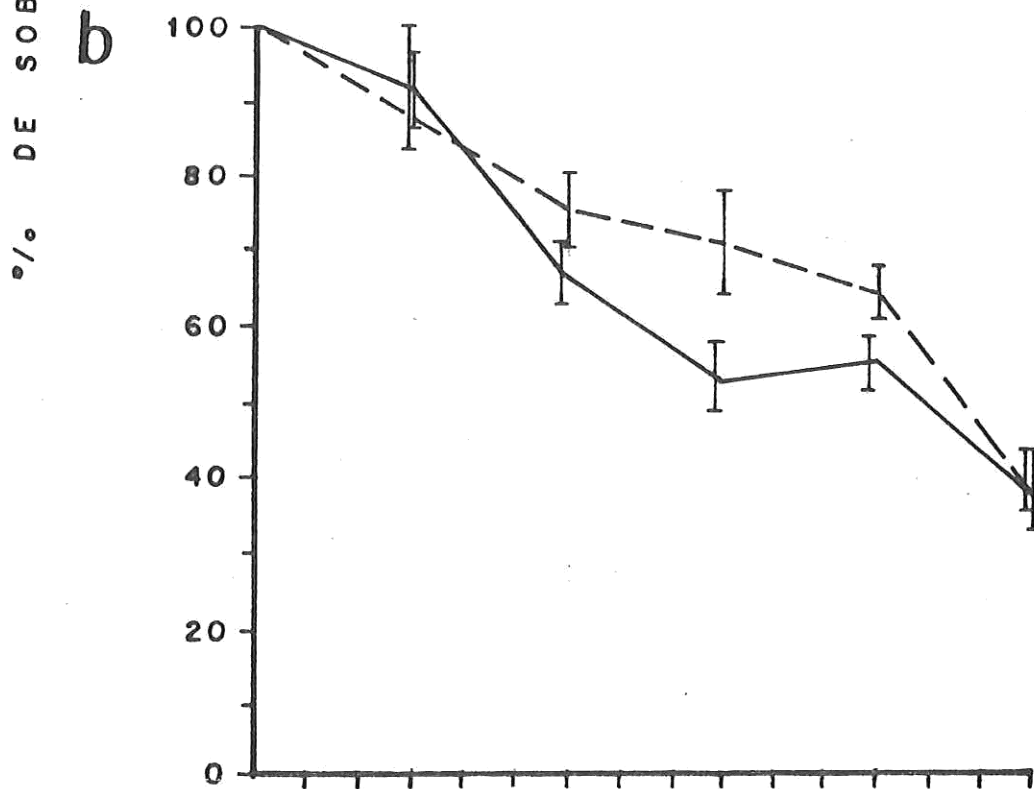
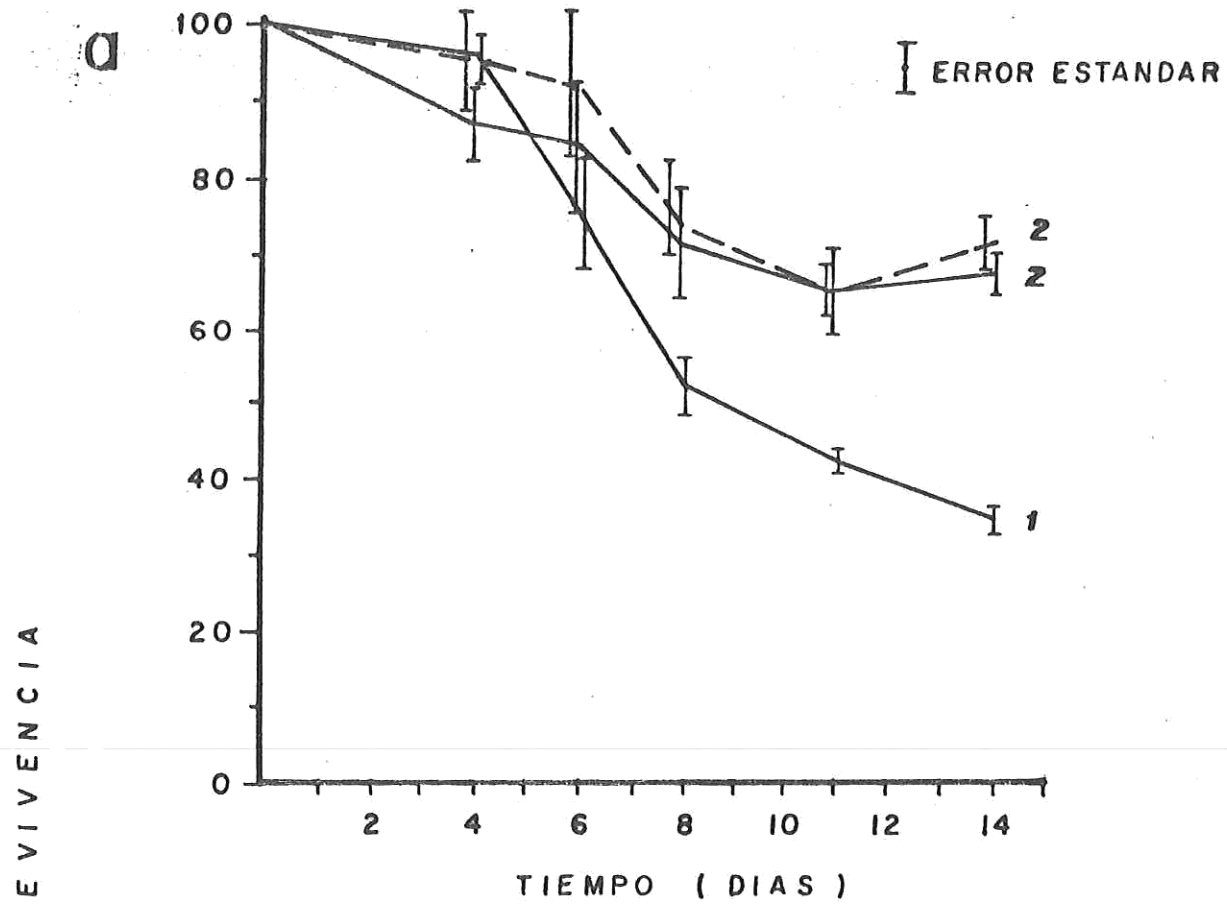


Fig. 5).- Sobrevivencia larval de *Ostrea edulis*:

a).- Experimento realizado en mayo de 1985.

b).- Experimento realizado en julio de 1985.

Qui= Medio químico(—); Org= Medio orgánico(---).

TABLA IV. Prueba t student para los datos de sobrevivencia de los experimentos realizados en el mes de mayo y julio con varianzas iguales.

a) Exp. I. b) Exp.II.

a

Réplicas	g.l.	$T_{calculada}$	$T_{critica}$	significancia
Qui1-Qui2	48	2.365	2.008	*
Qui1-Org2	48	3.014	2.008	*
Qui2-Org2	48	0.986	2.008	n.s

b

Réplicas	g.l.	$T_{calculada}$	$T_{critica}$	significancia
Org1-Org2	48	1.042	2.008	n.s
Qui1-Qui2	48	0.936	2.008	n.s
Org-Qui	48	1.253	2.008	n.s

(g.l.) grados de libertad

(n.s) no significativa ( $P > 0.05$ )

(\*) significativa ( $P < 0.05$ )

una máxima de 20.3°C con un promedio de 19.5°C. En el <sup>30</sup> experimento de julio, se registró una mínima de 22.2°C y una máxima de 24.0°C con un promedio de 23.1°C.

La salinidad promedio registrada en mayo fue de 33.5‰ y de 33.9‰ para el mes de julio

#### 5.0 DISCUSION.

No se encontraron diferencias significativas estadísticamente entre las larvas del medio químico y medio orgánico en el experimento de mayo (Tabla IIa, Fig. 4a). Mientras que, en el experimento de julio, sí se obtuvieron diferencias significativas. Siendo mejor el crecimiento en las larvas alimentadas con microalgas que crecieron en el medio orgánico (Tabla IIb, Fig. 4b ).

Esto se podría atribuir a que las microalgas producidas en el medio con biodigeridos sean de mayor calidad, debido a los nutrimentos y compuestos orgánicos disueltos en el medio, que al ser asimiladas por las microalgas pueden ser un alimento más completo nutricionalmente que las microalgas producidas en el medio químico, donde se les proporciona únicamente los nutrimentos necesarios para su crecimiento. Por otro lado, a las larvas que se les dio microalgas crecidas el medio preparado con biodigeridos no sólo se alimentaron de microalgas, sino también tomaban los compuestos orgánicos contenidos en él, como lo son aminoácidos, carbohidratos, lípidos y proteínas (Granados-

Machuca y Paniagua-Michel, 1981; Granados-Machuca y Buckle-Ramírez, 1984). Esto concuerda con lo reportado por Davis y Chanley (1955) cit. por Langdon (1983); Estephens y Manahan, (1984) y Chu et al., (1987) donde encuentran que larvas de ostión, utilizan compuestos orgánicos del agua de mar para su alimentación.

El experimento de mayo, se inició con una talla promedio larval mayor que las larvas del mes de julio, esto concuerda con lo reportado por Duarte-Moreno y Andrade-Jiménez, (1987) quienes observaron que la talla larval va disminuyendo conforme va pasando la época de desoves. Además de ser menos viables, debido a su bajo contenido de lípidos, que es su fuente principal de reserva (Helm et al., 1973).

Lo anterior se vio reflejado en las larvas del medio químico de julio donde su talla promedio máxima al momento de la fijación disminuyó con respecto a mayo (Fig. 5a,b). En las larvas del medio orgánico no se observó este comportamiento, creciendo mejor en el mes de julio aún cuando las larvas eran de menor tamaño al inicio. Esto se podría atribuir a la eficiencia del alimento producido por biodigeridos (Granados-Machuca y Paniagua-Michel, 1981; Granados-Machuca y Buckle-Ramírez, 1984).

La máxima tasa de crecimiento instantáneo obtenida en este trabajo, fue de 4.5 el cual correspondió a larvas alimentadas con microalgas producidas en el medio orgánico,

aunque fue menor a la reportada por Helm, (1977) en un cultivo de larvas de D. edulis (5.8), la tasa de crecimiento instantaneo promedio reportada en este trabajo es mayor que la reportada por Walne, (1963) en un mismo cultivo de larvas alimentadas sólo con I. galbana (3.1). Esto se debió a que las larvas fueron alimentadas con una mezcla de microalgas y éstas tienen mejor crecimiento que las larvas alimentadas con una sola (Helm, 1977).

En los datos de sobrevivencia de larvas trabajadas en mayo, no hubo diferencias significativas entre las larvas del medio quílmico (Qui2) y las larvas del medio orgánico (Org2) (Tabla IVa, Fig. 5a). En cambio sí se obtuvieron diferencias significativas entre las larvas de las cubetas de cultivo Qui2 y Org2 con respecto a las larvas de Qui1, esto fue debido, a que aún cuando en todas las cubetas al inicio del experimento se observaron pequeñas conglomeraciones de larvas vivas y muertas, causado por problema bacterial, sólo se mantuvo en la réplica Qui1 la presencia de bacterias hasta la puesta a fijación. Aunque no afectó su crecimiento, sí se observó una mayor mortalidad (Fig. 5a), esto concuerda con Chanley (1975) quien menciona que cuando los problemas son causados por organismos patógenos, se incrementa la mortalidad de larvas sin un decremento acompañado en la tasa de crecimiento de los sobrevivientes.

Las larvas de la cubeta Org1, no se tomó en cuenta

para la discusión de sobrevivencia por que en uno de los <sup>33</sup> cambios de agua se perdió parte de la población por un tamiz que se encontraba roto y la sobrevivencia final fue baja debido a problemas en el manejo que a la mortalidad natural.

No se encontró diferencia significativa entre las larvas del medio químico (Qui) y orgánico (Org) en el experimento de julio, siendo similar la sobrevivencia (Tabla IVb, Fig. 5b).

Tanto para las larvas alimentadas con microalgas producidas con medio orgánico (Org2) como el medio químico (Qui2) del experimento de mayo, se obtuvo un alto porcentaje de sobrevivencia a fijación (72% y 68% respectivamente). Sin embargo, el porcentaje de semilla obtenida en larvas del medio orgánico (Org2) fue menor en relación a larvas del medio químico (Qui2), tabla IIIa. Esto se puede atribuir a que las larvas del medio orgánico, presentaron tallas más pequeñas al momento de someterse al proceso de fijación. Aunque ya presentaban la mancha ocular, fueron menos capaces de soportar lo riguroso de la metamorfosis y establecimiento (Helm, 1977; Gutierrez-Wing, 1988).

En las larvas de julio, se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia a fijación menor tanto para las del medio orgánico como químico que en el experimento de mayo (38% para ambas), esto puede relacionarse con lo encontrado por Helm et al., (1973) quien menciona que las larvas van

siendo menos viables conforme transcurre la época de desove (Tabla IIIa, b). No obstante, en larvas del medio orgánico de julio (Org), se incrementó la cantidad de semilla obtenida (34.8%). En donde se estableció el 90.6% del total de larvas que se puso a fijar, esto se relaciona al buen crecimiento observado en el transcurso del experimento (Fig. 4b). El cual se reflejó en la producción de gran cantidad de semilla (Helm et al., 1973). Este valor es similar a la producción de semilla obtenida por Helm, (1977) al alimentar larvas de Q. edulis con una dieta de algas mixta.

En las larvas alimentadas con microalgas producidas en el medio control para el mes de julio, se observó una mortalidad total en el transcurso de la fijación debido al suministro de alimento contaminado. Prieur y Carval, (1977) señalan al alimento como el principal factor que influye en el cultivo de larvas por su contribución de sales nutritivas y bacterias. Por otra parte Chanley (1975) y Tubiah (1975) mencionan que larvas de forma anormal con la distención del velo o desprendimiento de este, pérdida de la movilidad de larvas y aparición de protozoarios son síntomas característicos de un cultivo de larvas contaminado por bacterias. Esto se observó en larvas del medio control puestas a fijar.

Tanto la temperatura como la salinidad, no se pueden considerar como un factor influyente en el crecimiento y

35

sobrevivencia de larvas. La temperatura de los dos experimentos, se mantuvo dentro de las reportadas por Davis y Calabrese, (1969) para un buen crecimiento y sobrevivencia. La salinidad también se mantuvo dentro del intervalo 25-35%. reportado por Korringa, (1945); Davis y Ansell, (1962) cit. por Helm y Millican, (1977).

Estos resultados sugieren que las microalgas producidas en el medio preparado con biodigeridos de estiércol de vaca y gallina, así como los componentes mismos del licor son una buena fuente de alimento para larvas de O. edulis, observando desarrollo de larvas vigorosas.

#### 6.0 CONCLUSIONES

--- Se observó un mejor crecimiento en larvas alimentadas con microalgas producidas en el medio con biodigeridos que en larvas alimentadas con microalgas producidas en el medio químico.

--- La sobrevivencia obtenida fue similar en las larvas alimentadas con microalgas producidas en ambos medios.

--- Las microalgas crecidas en el medio preparado con biodigeridos de estiércol de vaca y gallina pueden ser usados como alimento para la producción de semilla de Ostrea edulis.

## 7.0 LITERATURA CITADA.

- Aguirre-Muñoz, A., 1981. Estudios con un cultivo semicontinuo de Tetraselmis suecica Kylin (1935): Nutrientes, vitaminas, desinfección del medio con UV y producción del sistema a largo plazo. Tesis licenciatura. Escuela Superior de Ciencias Marinas. Ensenada, B. C. México. 62 pp.
- Baqueiro-Cardenas, E., 1984. Status of molluscan aquaculture on the Pacific coast of México. *Aquaculture*, 39: 83-93.
- Chanley, P., 1975. Laboratory cultivation of assorted bivalve mollusks. W. L. Smith and M. H. Chanley (Ed). *Culture of Marine Invertebrates Animals*. Plenum Press Greenport, N. Y. London, 297-317.
- Chu, F-L. E., K. L. Webb, D. A. Hepworth and B. B. Casey., 1987. Metamorphosis of Larvae of Crassostrea virginica Fed Microencapsuled Diets. *Aquaculture*, 64: 185-197.
- Creekman, L. L., 1977. The effects of conditioning the American oyster ( Crassostrea virginica ) with Tetraselmis suecica and Cornstarch on the grown, vigour and survival of its larvae. M. S. Thesis Virginia Institute of Marine Science. Gloucester Point, Virginia. 57 pp.

- Davis, H. C. and A. Calabrese., 1969. Survival and growth<sup>37</sup> of larvae of the European oyster (Ostrea edulis) at different temperatures. Biol. Bull., 136 (2): 193-199.
- Duarte-Moreno, J. H. y R. Jiménez-Andrade, 1987. Determinación del ciclo reproductivo del ostión Europeo (Ostrea edulisL.) en bahía San Quintín, B. C. y bajo condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Ensenada, B. C., México. 94 pp.
- Epifanio, C. E., 1979. Comparison of yeast and algal diets for bivalves molluscs. Aquaculture, 16: 187-192.
- Estephens, G. C. and T. D. Manahan, 1984. Technical advances in the study of nutrition of marine molluscs. Aquaculture, 39: 155-164.
- Fernández-García, M. P., 1984. Crecimiento y sobrevivencia de las larvas de Crassostrea gigas alimentadas con la microalga Pseudoisochrysis paradoxa y suplementos de almidón de maíz y miel de abeja. Tesis maestría en ciencias. CICESE. Ensenada, B. C. México. 91 pp.
- Granados-Machuca, C. y J. J. Paniagua-Michel, 1981. Obtención de dos medios económicos para el cultivo de fitoplancton bajo condiciones controladas. Tesis de licenciatura. Escuela Superior de Ciencias Marinas. Ensenada, B. C., México. 81 pp.
- Granados-Machuca, C. y F. L. Buckle-Ramírez, 1984. Cultivo de las microalgas Monochrysis lutheri y Skeletonema costatum con nutrientes producidos por

- estiercoles digeridos. An. Inst. Cien. del Mar 38  
Limnol. Univ. Nal. Aut6n. M6xico, 11 ( 1 ): 241-256.
- Gutierrez-Wing, M. T., 1988. Utilizaci6n de productos naturales en la alimentaci6n de las larvas del osti6n japon6s Crassostrea gigas( THUNBERG ) en condiciones de laboratorio. Tesis maestria en ciencias. CICESE. Ensenada, B. C. M6xico. 134 pp.
- Helm, M. M., 1977. Mixed algal feeding of Ostrea edulis larvae with Isochrysis galbana and Tetraselmis suecica. J. Mar. Biol. Assoc. U. K., 57: 1019-1029.
- Helm, M. M., D. L. Holland and R. R. Stephenson, 1973. The effect of the supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of Ostrea edulis L. on larval vigour. J. Mar. Biol. Assoc. U. K., 53: 673-684.
- Helm, M. M. and Millican, P. F., 1977. experiments in the hatchery rearing of pacific oyster larvae Crassostrea gigas (Thunberg). Aquaculture, 11: 1-12.
- Islas-Olivares, R., M. Miranda-Aguilar y V. Gendrop-Funes, 1978a. Crecimiento y sobrevivencia del osti6n europeo (Ostrea edulis) en aguas de Baja California. Ciencias Marinas 5 (1): 137-148.
- Islas-Olivares, R., V. Gendrop-Funes y M. Miranda-Aguilar, 1978b. Infraestructura b6sica para la obtenci6n de larvas (semilla) del osti6n japon6s (Crassostrea gigas) y el osti6n europeo

(Ostrea edulis) en Baja California. Ciencias Marinas <sup>5</sup><sub>39</sub>  
(2): 73-86.

- Langdon, C. J., 1983. Grown studies with bacteri-free oysters Crassostrea gigas larvae fed on semi-defined artificial diets. Biol. Bull. 164: 227-235.
- Langdon, C. J. and C. A. Siegfried, 1984. Progress in the development of artificial diets for bivalve filters-feeders. Aquaculture, 39: 135-153.
- Le Pennec, M. and D. Prieur, 1977. Les antibiotiques dans les elevages de larves de bivalves marins. Aquaculture, 12: 15-30.
- Lodeiros, C., J. Bolinches, P. C. Dopazo and E. A. Toranzo, 1987. Bacillary Necrosis in Hatcheries of Ostrea edulis in Spain. Aquaculture, 65: 15-29.
- Mathiessen, C. C. and R. C. Torner, 1966. Possible methods of improving the shellfish industry of Martha's Vineyard. Duke's County, Massachusetts. Mar. Res. Fund. Edgartown, Mass., 138pp.
- McLachlan, J., 1973. Growth Media-Marine. in Stein, J. R. (Ed). Handbook of Phycological Methods. University Press. Cambridge. XII 448 pp.
- Millar, R. H. and J. M. Scott, 1967. Bacteria-free culture of oyster larvae. Nature ( London ), 216: 1139-1140.
- Paniagua-Michel, J. J., 1984. Cultivo de fitoplancton marino bajo condiciones controladas en un medio elaborado con productos naturales biodigeridos. Tesis maes-

tria en ciencias. CICESE. Ensenada, B. C. México. 40  
118pp.

- Prieur, D. and J. P. Carval, 1979. Bacteriological and physico-chemical analysis in a bivalve hatchery: Techniques and preliminary results. *Aquaculture*, 17: 359-374.
- Ryan, T. A., B. L. Joiner and B. F. Ryan, 1976. *Minitab Student Handbook*. Dextery Press. Mass. 341 pp.
- Tubiash, H. C., 1975. Bacteriological pathogens associated with cultured bivalve mollusk larvae. Dans: W. L. Smith and M. H. Chanley (Ed.). *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, London, 61-71
- Urban, E. R., and C. J. Langdon, 1984. Reduction in costs of diets for the american oyster, Crassostrea virginica (Gmelin), by the use of non-algal supplements. *Aquaculture*, 38: 277-291.
- Walne, P. R., 1963. Observations on the food value of seven species of algae to the larvae of Ostrea edulis. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 43: 767-784.
- Walne, P. R., 1974. *Culture of Bivalve Mollusc: 50 years experience at Conwy*. Writefriars Press Ltd. London and Cambridge. 199 pp.
- Wilson, J. H., 1978. The food value of Phaeodactylum tricornutum Bohlin to the larvae of Ostrea edulis L. and Crassostrea gigas Thunberg. *Aquaculture*, 13: 313-323.

Wilson, K. V., 1956. A Distribution-Free Analysis of Variance Hypotheses, Psychological Bulletin, 53: 96-101.