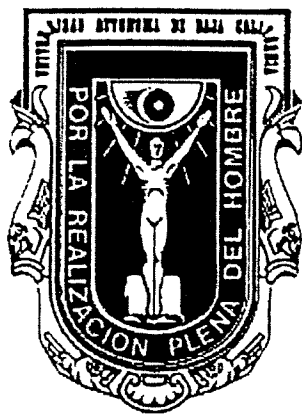




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

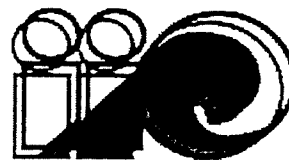
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

EFECTO DE SEIS DIETAS MICROALGALES EN EL DESARROLLO
LARVARIO, METAMORFOSIS Y OBTENCIÓN DE JUVENILES DEL
ERIZO MORADO *Strongylocentrotus purpuratus* (STIMPSON)

TESIS

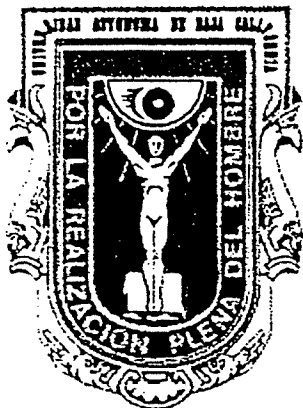


que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias
en Oceanografía Costera presenta:



BIÓL. JORGE FONSECA MADRIGAL

Ensenada, Baja California. junio del 2001



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Marinas
Instituto de Investigaciones Oceanológicas

EFFECTO DE SEIS DIETAS MICROALGALES EN EL DESARROLLO
LARVARIO, METAMORFOSIS Y OBTENCIÓN DE JUVENILES DEL ERIZO
MORADO *Strongylocentrotus purpuratus* (STIMPSON)

TESIS

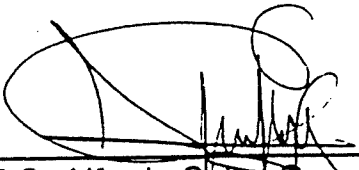
Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias
en Oceanografía Costera
presenta:

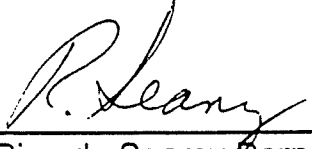


JORGE FONSECA MADRIGAL



Aprobada por:


M.C. Alfredo Salas Garza,
Director de tesis


Dr. Ricardo Searcy Bernal
Sinodal propietario


M.C. Enrique Valenzuela Espinoza
Sinodal propietario

Ensenada, BC., junio del 2001

A MIS PADRES Y HERMANOS

AGRADECIMIENTOS

Primeramente deseo agradecerle a la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), a la Facultad de Ciencias Marinas y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) el haberme brindado la oportunidad de realizar los estudios de posgrado en el programa de maestría en Oceanografía Costera. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la ayuda recibida mediante la beca-crédito para estudios de maestría.

Al director de este trabajo, M.C. Alfredo Salas Garza, le agradezco sus consejos y el apoyo total brindado durante mi estancia como estudiante en su laboratorio. Gracias también a Dr. Ricardo Searcy Bernal y M.C. Enrique Valenzuela Espinoza, por su interés en mejorar el trabajo de tesis.

Gracias a M.C. Griselda Parés Sierra, Dra. Beatriz Cordero Esquivel y Dr. Eugenio Carpizo Ituarte; aunque no fueron parte del comité oficial, siempre prestaron su ayuda desinteresadamente, con el único afán de mejorar el trabajo.

Gracias a M.C. Enrique Valenzuela Espinoza y Oc. Filiberto Nuñez Cebrero del Laboratorio de Microalgas del IIO por haber facilitado el alimento utilizado para el experimento. Gracias a las personas que brindaron su ayuda en el Laboratorio de Microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE durante los análisis bioquímicos de las muestras. Gracias a Dr. Jorge de la Rosa, Biol. Clara E. Galindo y sus colaboradores, por el préstamo de un espacio para las muestras en el congelador y equipo del Laboratorio de Biología Molecular y Genética de la Facultad de Ciencias (UABC).

Gracias a Perrones Inc.: Sinhué Torres, Carlos Peynador, Pedro Medina y Fabián Rodríguez, por la ayuda brindada durante los cursos de la maestría y en la elaboración de la tesis. A Lorax Consultores, por la ayuda logística en la escritura del trabajo.

A las personas que prestaron ayuda en el laboratorio a lo largo del experimento, Verónica, Kim, Kena, Felipe y especialmente Agustín, muchas gracias.

EFFECTO DE SEIS DIETAS MICROALGALES EN EL DESARROLLO LARVARIO, METAMORFOSIS Y OBTENCIÓN DE JUVENILES DEL ERIZO MORADO *Strongylocentrotus purpuratus* (STIMPSON)

RESUMEN

En el desarrollo tecnológico de la producción de semilla del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*, es importante obtener altos porcentajes de sobrevivencia y larvas capaces de llevar a cabo con éxito la metamorfosis mediante una alimentación adecuada. En el presente trabajo se evaluó el efecto nutricional de seis dietas en la sobrevivencia y crecimiento, tanto en el desarrollo larvario como a través de la metamorfosis hasta la obtención de juveniles. Las dietas usadas fueron: (1) Dieta R: únicamente *Rhodomonas* sp; (2) Dieta C: únicamente *Chaetoceros muelleri*. (3) Dieta RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso) con una proporción de 70 y 30% respectivamente; (4) Dieta CI: mezcla de *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso) con 70 y 30% respectivamente; (5) Dieta RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *Chaetoceros muelleri* con 70 y 30% respectivamente; y (6) Dieta CR: mezcla de *Chaetoceros muelleri* y *Rhodomonas* sp con 70 y 30% respectivamente. Se analizó el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas, tanto del alimento proporcionado, como de las larvas a lo largo del experimento. La dieta RI satisfizo mayormente los requerimientos nutricionales de las larvas, ya que proporcionó los mejores resultados de sobrevivencia larvaria (23.7%) y obtención de juveniles (6.6%). La microalga *C. muelleri* no es un buen alimento para larvas de *S. purpuratus* si se usa como única fuente de alimentación (sobrevivencia nula); sin embargo, como complemento de *Rhodomonas* sp en una proporción de 70-30%, puede ser un alimento que propicie sobrevivencia larvaria alta, porcentaje de sobrevivencia a la metamorfosis alto y un considerable porciento de juveniles obtenidos (14.1, 38.1 y 4.9% respectivamente). La composición bioquímica del alimento (principalmente proteínas) influenció y modificó la composición de las larvas de *S. purpuratus*. Las larvas que registraron mayor cantidad de proteínas, crecieron más, sobrevivieron más y fueron alimentadas con microalgas de alto contenido proteico. A pesar de la deficiente sobrevivencia larvaria que propició la dieta R (9.8%), su uso proporcionó mejores resultados en el proceso de la metamorfosis (43.3%) que las dietas RI (38.8%) y CR (15.4%) (sólo fue superada por RC, 51.2%). Con los resultados se demostró que el alimento que satisface los requerimientos alimenticios en estadios larvarios, puede no ser el más adecuado para sobrellevar el proceso de metamorfosis.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO	12
METODOLOGÍA.....	13
Desove y fertilización de gametos	13
Diseño experimental.....	15
Parámetros físico-químicos	17
Desarrollo y sobrevivencia larvaria.....	17
Crecimiento de larvas.....	18
Determinación de biomasa y composición bioquímica de microalgas.....	20
Determinación de biomasa y composición bioquímica de larvas	21
Composición bioquímica de mezclas bialgales	23
Sobrevivencia después de la inducción a la metamorfosis	23
RESULTADOS	25
Desove y fertilización de gametos.....	25
Parámetros físico-químicos	25
Sobrevivencia larvaria	26
Crecimiento de larvas.....	29
Determinación de crecimiento celular y biomasa de microalgas	30
Composición bioquímica de microalgas:	32
Carbohidratos.....	32
Lípidos.....	35
Proteínas	35
Composición bioquímica de mezclas bialgales:	36
Carbohidratos.....	36
Lípidos.....	38
Proteínas	39
Determinación de biomasa de larvas	39
Composición bioquímica de larvas:.....	41

Carbohidratos.....	41
Lípidos.....	43
Proteínas.....	45
Sobrevivencia después de la metamorfosis.....	51
DISCUSIÓN.....	53
Desove y fertilización de gametos.....	53
Parámetros fisicoquímicos.....	53
Sobrevivencia larvaria.....	54
Crecimiento de larvas.....	58
Crecimiento celular y biomasa de microalgas.....	60
Composición bioquímica de microalgas.....	61
Composición bioquímica de larvas.....	64
Sobrevivencia después de la metamorfosis.....	66
CONCLUSIONES.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	72

LISTA DE TABLAS

Tabla I.- Dietas usadas en el experimento con larvas del erizo morado <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	16
Tabla II.- Biometrías promedio (μm) de larvas alimentadas con seis dietas microalgales a los 9, 18 y 25 días de cultivo. R: <i>Rhodomonas</i> sp. C: <i>Chaetoceros muelleri</i> . RI: mezcla de <i>Rhodomonas</i> sp e <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-Iso). CI: mezcla de <i>C. muelleri</i> e <i>I. aff. galbana</i> (Clone T-Iso). RC: mezcla de <i>Rhodomonas</i> sp y <i>C. muelleri</i> . CR: mezcla de <i>C. muelleri</i> y <i>Rhodomonas</i> sp. La desviación estándar se indica entre paréntesis.	30
Tabla III.- Peso seco total (PST, $\mu\text{g ml}^{-1}$), peso orgánico seco (PO, $\mu\text{g ml}^{-1}$), porcentaje de cenizas (%PC) y concentración de células por mililitro $\times 10^6$ (cél) de las tres microalgas utilizadas. Las muestras se tomaron en cinco días diferentes durante el experimento de alimentación de larvas de erizo <i>S. purpuratus</i>	32
Tabla IV.- Peso seco total (PST) en pg larva^{-1} , peso orgánico seco (PO) en pg larva^{-1} , y porcentaje de cenizas (%PC) de larvas alimentadas con seis dietas microalgales. R: <i>Rhodomonas</i> sp. C: <i>Chaetoceros muelleri</i> . RI: mezcla de <i>Rhodomonas</i> sp. e <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-Iso). CI: mezcla de <i>C. muelleri</i> e <i>I. aff. galbana</i> (Clone T-Iso). RC: mezcla de <i>Rhodomonas</i> sp. y <i>C. muelleri</i> . CR: mezcla de <i>C. muelleri</i> y <i>Rhodomonas</i> sp.	40
Tabla V.- Porcentaje de sobrevivencia a la metamorfosis hipotéticos de larvas de <i>S. purpuratus</i> alimentadas con seis dietas microalgales. R: <i>Rhodomonas</i> sp. C: <i>Chaetoceros muelleri</i> . RI: mezcla de <i>Rhodomonas</i> sp e <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-Iso). CI: mezcla de <i>C. muelleri</i> e <i>I. aff. galbana</i> (Clone T-Iso). RC: mezcla de <i>Rhodomonas</i> sp y <i>C. muelleri</i> . CR: mezcla de <i>C. muelleri</i> y <i>Rhodomonas</i> sp.	52
ANEXO 1.- Composición bioquímica de los géneros <i>Rhodomonas</i> , <i>Isochrysis</i> y <i>Chaetoceros</i> por diversos autores.	84

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.- Mediciones realizadas a larvas del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*19
- Figura 2- Temperatura del agua en el cultivo de larvas del erizo *Strongylocentrotus purpuratus*26
- Figura 3.- Sobrevivencia de larvas alimentadas con seis dietas microalgales. R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. a) sobrevivencia general calculada a lo largo del experimento; las barras representan el error estándar de los tratamientos b) sobrevivencia correspondiente al periodo del día 1 al 10. c) sobrevivencia correspondiente al periodo del día 10 al 19. d) sobrevivencia correspondiente al periodo del día 19 al 26. Los círculos negros representan cada una de las réplicas y los círculos blancos representan el promedio de las mismas.....28
- Figura 4.- Porcentaje promedio de carbohidratos, lípidos y proteínas de las tres microalgas utilizadas como alimento para larvas del erizo *S. purpuratus*. C=*Chaetoceros muelleri*, I=*Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso), R=*Rhodomonas* sp. Las barras indican el error estándar.33
- Figura 5.- Porcentaje de carbohidratos, lípidos y proteínas en cada muestreo (día 1, 6, 11, 16 y 21) de las microalgas usadas como alimento para larvas del erizo *S. purpuratus*. Las barras representan el error estándar.34
- Figura 6.- Porcentaje de contenido bioquímico aproximado de las mezclas bialgales por muestreo (día 1, 6, 11, 16 y 21). RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp.37
- Figura 7.- Porcentaje promedio de carbohidratos, lípidos y proteínas de las seis dietas proporcionadas a larvas de erizo *S. purpuratus*. R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp.....38
- Figura 8.- Tasa de incremento de peso diario de larvas del erizo morado *S. purpuratus* alimentadas con seis dietas microalgales. R: *Rhodomonas* sp.

C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp.....41

Figura 9- Porcentaje de carbohidratos, lípidos y proteínas de larvas de *S. purpuratus* alimentadas con seis dietas microalgales en cuatro muestreos distintos (día1, 10, 19 y 26). R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. Las barras indican el error estándar.....42

Figura 10.- Porcentaje promedio de carbohidratos, lípidos y proteínas de larvas de *S. purpuratus* alimentadas con seis dietas microalgales. R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. Prisma: estadio larvario en el que comienza la alimentación. Las barras indican el error estándar.....44

Figura 11.-Comparación del periodo correspondiente del día 1 al 10 del porcentaje de proteínas de: a) microalgas con el de larvas. b) microalgas con la longitud de larvas. c) larvas con la longitud de las mismas. d) microalgas con ancho de larvas. e) larvas con el ancho de las mismas. Las dietas microalgales para larvas de *S. purpuratus* fueron: R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. La "r" indica el valor de la relación (Pearson).....47

Figura 12.-Comparación del periodo correspondiente del día 10 al 19 del porcentaje de proteínas de: a) microalgas con el de larvas. b) microalgas con la longitud de larvas. c) larvas con la longitud de las mismas. d) microalgas con ancho de larvas. e) larvas con el ancho de las mismas. Las dietas microalgales para larvas de *S. purpuratus* fueron: R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. La "r" indica el valor de la relación (Pearson).....48

Figura 13.-Comparación del periodo correspondiente del día 19 al 26 del porcentaje de proteínas de: a) microalgas con el de larvas. b) microalgas con la longitud de larvas. c) larvas con la longitud de las mismas. Las dietas

microalgales para larvas de *S. purpuratus* fueron: R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. La "r" indica el valor de la relación (Pearson).....49

Figura 14.-Comparación del periodo correspondiente del día 10 al 19 del porcentaje de lípidos de: a) microalgas con el de larvas. b) microalgas con la longitud de larvas. c) larvas con la longitud de las mismas. d) microalgas con ancho de larvas. e) larvas con el ancho de las mismas. Las dietas microalgales para larvas de *S. purpuratus* fueron: R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. La "r" indica el valor de la relación (Pearson).....50

Figura 15.- Porcentaje de sobrevivencia después de 10 y 20 días de la inducción a la metamorfosis de larvas de *S. purpuratus* alimentadas con seis dietas microalgales. R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. Los círculos negros representan cada uno de las réplicas y los círculos blancos representan el promedio de las mismas.52

INTRODUCCIÓN

La pesquería del erizo se ha practicado desde hace 25 años en Baja California, e involucra a más de 2,000 familias, las cuales, han visto disminuir sus ingresos económicos debido a la disminución significativa del recurso. Actualmente existen más de 50 organizaciones, entre cooperativas, permisionarios y concesionarios, que se dedican a la extracción del erizo, recurso que en el año 1997 generó divisas por más de cinco millones de dólares. La captura por unidad de esfuerzo disminuyó en los últimos años de 305 a 120 kg/marea/embarcación, lo que representa una reducción del 61% (Palleyro-Nayar, 1994). Esta situación ha repercutido en la economía de los pescadores, además de poner en peligro la pesquería del recurso.

En 1987 se implementaron las primeras reglas para regular y proteger la pesquería del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* (Agassiz) (Ramírez, 1997). Se estableció una talla mínima de captura de 80 mm de diámetro de testa, una temporada de veda de febrero a julio, y una cuota de extracción. A partir de la implementación de dichas reglas y de la demanda creciente del producto en el mercado japonés, se inició la explotación del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson), el cual, cuenta con las características necesarias para su exportación y consumo. Del año 1994 a 1996, la captura del erizo morado se ha incrementado de 577 a 814 toneladas, lo que representó un incremento del 26% a casi el 40% de las capturas totales de erizo. En el año 1998, más del 90% de la

captura correspondió al erizo morado, debido al bajo rendimiento de las gónadas del erizo rojo, lo que a su vez produjo una disminución del precio de este último en el mercado internacional (SEMARNAP, 1998).

Para lograr un manejo adecuado de este valioso recurso, se ha considerado a la acuicultura como una alternativa potencial para comenzar la recuperación de los bancos naturales mediante actividades de repoblación y la implementación de programas de cultivo en cautiverio. Estas actividades significarán nuevas fuentes de empleo, ingresos adicionales para los pescadores y principalmente, la disminución de la presión sobre el recurso, que permitirá su recuperación y preservación. Para realizar estas actividades, es fundamental contar con una biotecnología para la producción masiva de juveniles de erizo, la cual debe ser planeada y controlada en laboratorio.

El cultivo de erizo, ha tomado interés en diversos países que cuentan con este recurso. Solo en Japón y en Chile se ha desarrollado la biotecnología adecuada para su cultivo. En Japón, se cultivan seis especies de erizo con fines de repoblamiento, *Strongylocentrotus intermedius*, *Strongylocentrotus nudus*, *Pseudocentrotus depressus*, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Tripneustes pileolus*, y *Anthocardaris crassispina* (Saito *et al.*, 1985; Yokota, 2000), mientras que en Chile se cultiva *Loxechinus albus* (González *et al.*, 1987; Bustos *et al.*, 1991; Bustos y Olave, 2001). En México y los Estados Unidos, no se ha logrado la producción masiva de semilla de erizo, motivo por el cual aumenta el interés y la importancia por desarrollar y aplicar técnicas nuevas, enfocadas a la producción en

laboratorio. Para esto, es de suma importancia conocer los cuidados necesarios para el cultivo de larvas, ya que de su optimización dependerá el éxito en la producción de semilla.

Por tal motivo, es importante conocer las propiedades bioquímicas del alimento proporcionado a las larvas, ya que éste proporciona los elementos necesarios para un crecimiento óptimo, medido en términos de longitud de cuerpo, periodos cortos de desarrollo y grandes cantidades de reserva energética (Boidron-Métairon, 1995). El requerimiento alimenticio de la larva planctotrófica del erizo, es utilizado para llevar a cabo satisfactoriamente funciones vitales como, sobrevivir, nadar, comer, crecer, asentarse en un área favorable, metamorfosearse y finalmente, convertirse en juvenil. (Strathmann 1971). El erizo morado *S. purpuratus*, al norte de California, desarrolla su estadio larvario en un periodo de 42 días, pasando por diferentes etapas tales como, blástula ciliada, gástrula ciliada, prisma (inicia su alimentación), equinopluteus 4 brazos, equinopluteus 6 brazos, equinopluteus 8 brazos (Colby, 1979).

Proporcionar una alimentación adecuada a larvas del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*, para obtener altos porcentajes de sobrevivencia y larvas capaces de llevar a cabo con éxito la metamorfosis, representará un avance importante en el desarrollo biotecnológico de la producción de semilla.

En la etapa larvaria, además de una ración adecuada de alimento y de características tales como tamaño, forma y/o sabor de la microalga, este debe cubrir las necesidades alimenticias de las larvas (Strathmann, 1975). Hinegardner

(1969), encontró que de 14 microalgas utilizadas para probar su eficiencia como alimento para larvas del erizo *S. purpuratus*, tan solo *Rhodomonas* sp fue satisfactoria. Con esta microalga, también se desarrollan mejor los erizos *Lictechinus pictus* (Verrill), *L. variagatus* (Lamarck) y *Echinometra mathaei* (Blainville).

Por su parte, Saito *et al.* (1985), alimentaron con *Chaetoceros gracilis*, a larvas de *S. intermedius*. La concentración inicial de microalgas fue de 5,000 cél ml⁻¹ con incrementos de la ración alimenticia de 50% en cada uno de los estadios de desarrollo de la larva, la cual inició la metamorfosis en 16 días. Esta estrategia de alimentación para larvas también es recomendada para otras especies de erizo (Hagen, 1996).

La duración del estadio larvario está influenciada por la calidad del alimento proporcionado (Fenaux, 1982; Boidron-Métairon, 1995) y es un factor que interesa por su asociación directa al costo de producción de semilla. Rogers-Bennett *et al.* (1994), reportaron que el erizo rojo *S. franciscanus* completa su desarrollo larvario en 22 días con una alimentación consistente de la microalga *Rhodomonas lens*. El menor tiempo de desarrollo larvario reportado para el erizo rojo es 19 días y se obtuvo alimentando las larvas con la microalga *Rhodomonas* sp (Martínez-López, 1994); en cambio, el erizo morado *S. purpuratus* requiere un periodo de 38 días usando la microalga *Rhodomonas* sp (Cameron y Schroeter, 1980). Recientemente, Salas-Garza y Parés-Sierra (2000), reportaron que larvas de erizo morado terminaron su desarrollo larvario en un periodo de 28 días.

Algunos estudios mencionan que al evitar la limitación del alimento se asegura una mayor sobrevivencia en estadios larvarios (González *et al.*, 1987; Bustos *et al.*, 1991; Martínez-López, 1994; Metaxas y Young, 1998a). Un déficit en la dieta puede provocar un alargamiento de los brazos de las larvas, como estrategia para agrandar las bandas ciliadas y de esta manera, obtener más alimento (Strathmann, 1987; Hart y Strathmann, 1994; Metaxas y Young, 1998b); además puede ocurrir un retraso en el inicio del estadio de competencia a la metamorfosis.

Aunque algunas larvas de equinodermos se alimentan de un amplio intervalo de tamaños de partículas, estas pastorean el tamaño de las partículas de mayor concentración (Rassoulzaedgan y Fenaux, 1979) y seleccionan más por sabor que por tamaño (Rassoulzaedgan *et al.*, 1984). En un estudio posterior, Pedrotti (1995) probó las preferencias alimenticias de larvas de los equinodermos *Paracentrotus lividus* y *Arbacia lixula*; los resultados indican que las larvas jóvenes seleccionan partículas por la calidad y tamaño, y conforme crece la larva, la selección de las partículas depende mayormente del tamaño.

Las larvas de erizo al final de su desarrollo, como la mayoría de los invertebrados marinos, deben asentarse y metamorfizarse (Pearce y Sheibling, 1994). Para esto, las larvas deben adquirir el estado de competencia, lo que significa que las larvas deben tener la capacidad fisiológica para comenzar los cambios propios de la metamorfosis. Las larvas competentes de los erizos tienen 8 brazos y un rudimento bien desarrollado (Strathmann, 1978) que aparece dentro

de una invaginación epidérmica que se localiza en el lado izquierdo del cuerpo larvario (Gosselin y Jangoux, 1998). Además se pueden observar otros cambios morfológicos y de comportamiento como: deformación del cuerpo larvario, aparición de pies ambulacrales y búsqueda de un sustrato adecuado para asentarse. Las larvas competentes al tener contacto con ciertos factores ambientales, por lo general asociados al sustrato, se inducen a la metamorfosis (Strathmann, 1987).

La metamorfosis es una cadena de eventos irreversibles que producen cambios fisiológicos y morfológicos, que hace que pasen de una vida pelágica nadadora a una bentónica (Kitamura *et al.*, 1994; Pearce y Sheibling, 1994; Yazaki y Harashima, 1994; Yazaki, 1995).

Los criterios para determinar el final del proceso de metamorfosis no han sido establecidos adecuadamente, por lo que aún existe confusión al respecto. Recientemente, Gosselin y Jangoux (1998), establecieron el "periodo perimetamórfico" que comienza con la adquisición de la competencia a la metamorfosis, sigue con el cambio de forma y la vida como poslarva endotrófica (metamorfosis), y termina con la aparición del juvenil exotrófico.

En algunas especies de erizo, la metamorfosis completa, desde el final del estadio larvario hasta la conversión a juvenil, tiene un tiempo aproximado de cinco a seis días (Cameron y Hinegardner, 1974), en *S. purpuratus* de ocho a doce días (Salas-Garza, com. pers.) y en el caso de *S. franciscanus* hasta 80 días (Rogers-Bennett *et al.*, 1994). Estos cambios implican gran riesgo para la sobrevivencia de

los organismos (Sheltema, 1974). La larva interrumpe la ingestión de alimento desde el inicio y durante todo el proceso de la metamorfosis hasta el momento en que su mandíbula es funcional, momento en el cual, inicia su primera alimentación en la vida bentónica. Lo anterior hace evidente que los requerimientos nutricionales utilizados durante la metamorfosis son obtenidos, necesariamente, durante su desarrollo larvario. Sin embargo, son pocos los estudios de alimentación en larvas de erizo que hacen una interrelación con la metamorfosis y los juveniles que fueron producto de la misma.

Son pocos los estudios que se han realizado con fines de evaluar conjuntamente el desarrollo larvario y la metamorfosis del erizo morado *S. purpuratus*. Hinegardner (1969), describió por primera vez una técnica para el cultivo de larvas de erizo; Strathmann (1971) logró llevar a través de la metamorfosis a larvas de *S. purpuratus*, pero no hizo descripciones detalladas del proceso. Colby (1979), realizó algunas comparaciones del desarrollo larvario entre el erizo morado y el rojo, cultivados a 14°C con una dieta consistente del alga *Dunaliella primolecta*. A pesar de que el erizo morado *S. purpuratus* fue observado por un tiempo de 42 días, el trabajo carece de observaciones del proceso de asentamiento y la metamorfosis.

Dietas distintas que aportan resultados similares en cuanto a tiempo de duración del desarrollo larvario, tamaño y sobrevivencia de los organismos, pueden ocasionar diferencias importantes de sobrevivencia al final de la metamorfosis. Bustos *et al.* (1991), mencionaron que las especies de microalgas

satisfacen en distinto grado los requerimientos alimenticios de las larvas. Ellos utilizaron *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis* sp como alimento para larvas del erizo *Loxechinus albus*. No encontraron diferencias significativas en los tamaños ni en el tiempo de desarrollo alcanzado al final del estadio larvario, sin embargo, reportan una notoria diferencia entre la sobrevivencia de larvas alimentadas con *Isochrysis* sp (14%) y aquellas alimentadas con *C. gracilis* (46%).

González *et al.* (1987), evaluaron el efecto de dos dietas microalgales en larvas de *L. albus*. La primera fue una dieta mixta en proporciones iguales de *Dunaliella tertiolecta* e *Isochrysis galbana* y la segunda consistió únicamente de *D. tertiolecta*. A pesar de que el crecimiento y la sobrevivencia en los cultivos larvales con ambas dietas fueron similares, los autores recomiendan el uso de la dieta mixta, basándose en las diferencias observadas en el porcentaje de juveniles obtenidos al término de la metamorfosis. Así, los autores señalan que *D. tertiolecta* no contiene los requerimientos nutricionales óptimos para *L. albus*, por lo que es necesario complementarla con *I. galbana*.

En experimentos preliminares al presente trabajo, se utilizaron dos dietas mixtas como alimento para larvas de erizo rojo y morado. Las dietas fueron: 1) *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso) (50-50%) y 2) *Rhodomonas* sp y *Dunaliella* sp (50-50%). Se observó mejor sobrevivencia a la metamorfosis en las larvas de ambas especies alimentadas con la primera dieta (Salas-Garza, com. pers.). Posteriormente Salas-Garza y Parés-Sierra (2000), alimentaron larvas de *S. purpuratus* con la mezcla microalgal compuesta de

Rhodomonas sp e *Isochrysis galbana* y con *Rhodomonas* sp únicamente; con la dieta mixta obtuvieron porcentajes de sobrevivencia de 47% y con la dieta monoalgal 39%.

Algunos autores han señalado las ventajas del uso de dietas mixtas para el cultivo de larvas de equinodermos, ya que satisfacen mejor sus requerimientos nutricionales (Metaxas y Young, 1998a; Metaxas y Young, 1998b). Si se considera que las larvas asimilan completamente la variedad de especies de microalgas ingeridas, se puede explicar por que las dietas monoalgales no satisfacen de igual forma los requerimientos para el crecimiento y desarrollo larvario (Boidron-Métairon, 1995). La heterogeneidad del alimento proporciona una mejor calidad de éste. Pedrotti y Fenaux (1993), mencionan que al proporcionar dietas mixtas, la calidad del alimento puede ser más significativa para el crecimiento y desarrollo larvario, que suministrar altas concentraciones de una dieta monoalgal.

Para observar el efecto del alimento en el tamaño, morfometría, sobrevivencia y metamorfosis de las larvas del erizo verde *Strongylocentrotus droebachiensis* (Mueller), De Jong-Westman *et al.* (1995), suministraron dietas artificiales que diferían en contenido de proteínas y otros aditivos. Las tasas de desarrollo larvario resultaron ser mejores en la dieta enriquecida con más proteínas; las larvas presentaron brazos más largos, un rudimento de mayor diámetro, bandas ciliadas más grandes y un porcentaje alto de metamorfosis. En este caso el mejor desarrollo larvario coincidió con altas tasas de metamorfosis.

Los autores también mencionan que las dimensiones morfométricas de las larvas pueden ser utilizadas como un indicador de la condición de la larva.

Algunos autores mencionan que la composición bioquímica de la larva indica las condiciones ambientales, ya sea en campo o en laboratorio; cambios en la composición bioquímica larvaria reflejan cambios en la calidad del ambiente (His y Maurer, 1988; Ferreiro *et al.*, 1990). Farías *et al.* (1998), mencionan que evaluar la composición bioquímica de la larva es una herramienta importante para estimar la energía metabólica y la condición nutricional de bivalvos cultivados. Ellos hacen un análisis de la composición bioquímica, tanto del alimento proporcionado, como de huevos, larvas y poslarvas del bivalvo chileno *Argopecten purpuratus* y relacionan dichas composiciones a través del desarrollo larvario hasta el final de la metamorfosis. Las proteínas y lípidos contenidos en el alimento proporcionado, influenció la composición bioquímica, la sobrevivencia y el desarrollo de las larvas.

Existe información disponible concerniente a la composición bioquímica de varias especies de microalgas, algunas de las cuales, han sido utilizadas exitosamente en cultivos larvarios de erizo, tales como *Rhodomonas* sp, *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso) y *Chaetoceros muelleri* (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Nuñez-Cebrero, 1994; Brown *et al.*, 1997; Lafarga, 1997),

Como parte fundamental del desarrollo de la tecnología en la producción de semilla de erizo morado *S. purpuratus*, el presente trabajo tiene la finalidad de conocer el efecto de dietas microalgales en la sobrevivencia y crecimiento, tanto

en el desarrollo larvario como a través de la metamorfosis, hasta la obtención de juveniles. Conjuntamente se espera conocer acerca de los requerimientos nutricionales para el óptimo desarrollo en las larvas con el objetivo de lograr altos porcentajes de obtención de juveniles.

OBJETIVO

Conocer el efecto de seis dietas microalgales en el desarrollo larvario, metamorfosis y sobrevivencia de juveniles del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*.

METODOLOGÍA

Se colectaron organismos adultos del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*, del medio natural, por medio de buceo libre. Se colocaron dentro de hieleras de plástico con hielo "blue ice" y se cubrieron con macroalgas para evitar la deshidratación. Así, se trasladaron en seco al Laboratorio de Moluscos y Equinodermos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la UABC. Ahí fueron colocaron en recipientes de 360 litros de capacidad, con flujo continuo de agua de mar y con macroalgas como alimento.

Desove y fertilización de gametos

Para la inducción al desove se siguió el método descrito por Strathmann (1987), en el que se utiliza cloruro de potasio (hasta 3 ml 0.5M), inyectado a través de la membrana bucal hacia la cavidad celómica. Los gametos de los organismos de ambos sexos fueron colectados por separado en frascos de vidrio que contenían 500 ml de agua de mar previamente filtrada y esterilizada con rayos ultravioleta (U.V.).

Se diluyó un mililitro de óvulos en 100 ml de agua de mar filtrada y esterilizada. A su vez, se diluyó una gota de espermatozoides en 50 ml de agua de mar filtrada y esterilizada. Para la fecundación de los gametos se diluyó un mililitro de la solución de espermatozoides en la solución de óvulos. La mezcla fue agitada constantemente para asegurar un mayor porcentaje de óvulos

fecundados. Después de 15 minutos se colectó en un filtro de 48 μm a los óvulos asentados, se lavaron con agua de mar filtrada (1 μm) e irradiada con luz ultravioleta para eliminar el exceso de esperma. Concluido el lavado, se concentraron los óvulos en 50 ml de agua de mar y se tomaron tres muestras al azar de 1ml para observarlas al microscopio. Por medio de un conteo de óvulos con presencia de la membrana de fecundación, se determinó el porcentaje de fecundación. Por último, los óvulos fecundados se colocaron en recipientes de 18 litros sin aireación durante 60 horas, tiempo en el cual, se desarrolla el estadio larvario prisma, en el cual se inicia la alimentación. Al concluir 48 horas se realizó un lavado de los recipientes y se efectuó un cambio total de agua. El agua utilizada fue filtrada a 1 μm e irradiada con luz ultravioleta.

Las larvas se concentraron en un recipiente de 5 litros para ser cuantificadas. Se homogenizó el contenido del recipiente con un agitador manual y se tomaron diez muestras de 1 ml cada una. Se calculó el número promedio y se extrapoló al volumen de 5000 ml. Posteriormente, se distribuyó la larva en recipientes cónicos con 45 litros de agua de mar a una densidad de 2 larvas ml^{-1} . Cada recipiente tuvo un suministro de aireación permanente e independiente para evitar que las larvas permanecieran en el fondo. Cada dos días se realizaron cambios de agua de 50% y cada semana un cambio total; el agua utilizada para el cultivo fue filtrada e irradiada con luz U.V.

Para los cambios de agua así como para las evaluaciones de sobrevivencia fue necesario tamizar el contenido de los recipientes para concentrar la larva.

Para esto fue necesario pasar el contenido de cada recipiente por dos tamices. El primero fue un tamiz con una luz de malla mayor que la larva y el segundo con una luz de malla menor que ella. Por esto, durante el experimento se usaron tamices de 45, 50, 70, 90, 108, 160, 180, 215, 430 y 800 μm .

Diseño experimental

Para la realización del experimento se siguió un diseño aleatorio simple con tres réplicas por tratamiento. Se evaluó el efecto de seis dietas, con temperatura ambiental, en larvas provenientes de un desove simultáneo de cuatro machos y ocho hembras. Las dietas fueron seleccionadas tomando como base trabajos anteriores (González *et al.*, 1987; Bustos *et al.*, 1991; Rogers-Bennett *et al.*, 1994; Colby, 1979) que señalan la efectividad de dietas mixtas compuestas de microalgas como *Rhodomonas* sp, *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso), en larvas de erizo, además de los experimentos preliminares realizados con *S. purpuratus* en el Laboratorio de Moluscos y Equinodermos del IIO (Salas-Garza y Parés-Sierra, 2000).

Las dietas usadas se presentan en la tabla I. Las dietas se diseñaron tomando como base el peso orgánico seco de cada especie de microalga, determinado en los primeros días del experimento. Se usó una ración de alimento basada en 10,000 cél ml^{-1} , cantidad determinada por Martínez-López (1994) para larvas del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*. Cada dieta bialgal se ofreció con una proporción de peso orgánico seco de 70% de la microalga base con 30%

de la microalga complementaria. Esta proporción fue decidida arbitrariamente buscando encontrar un contraste en el efecto de cada microalga en las larvas. El alimento fue proporcionado diariamente y cada dos días se proporcionó solo el 50% de la ración inicial.

Tabla I.- Dietas usadas en el experimento con larvas del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*.

Dieta	Microalgas que la componen	Proporción respectiva
R	<i>Rhodomonas</i> sp	100%
C	<i>Chaetoceros muelleri</i>	100%
RI	<i>Rhodomonas</i> sp e <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-Iso)	70-30%
CI	<i>Chaetoceros muelleri</i> e <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-Iso)	70-30%
RC	<i>Rhodomonas</i> sp y <i>Chaetoceros muelleri</i>	70-30%
CR	<i>Chaetoceros muelleri</i> y <i>Rhodomonas</i> sp	70-30%

Las microalgas utilizadas en el experimento fueron cosechadas durante su fase exponencial para que el contenido nutricional del alimento fuera aproximadamente el mismo. Se realizaron conteos diarios para conocer el crecimiento del cultivo y su recuperación a las diluciones realizadas diariamente lasd cuales, en la primera semana fueron de 27% y de la segunda semana en adelante fueron de 17%. Las microalgas fueron proporcionadas por el Laboratorio

de Microalgas del IIO. El medio de cultivo utilizado fue el "f/2" de Guillard (1975), con silicatos para el caso de la microalga *Chaetoceros muelleri*.

Parámetros físico-químicos

Se llevó un registro de las características fisicoquímicas del agua en la que se cultivaron las larvas. Se midió la temperatura diariamente (termómetro de mercurio Spartan con escala de -20 a 110°C con $\pm 1^{\circ}\text{C}$ de precisión). En los días en que se realizaron cambios de agua, las mediciones se realizaron antes y después de estos. Se midió el oxígeno disuelto (oxímetro YSI modelo 51B) y el amonio (Ammonia electrode. Orion Research Inc. Modelo 95-12) antes y después de los cambios de agua.

Desarrollo y sobrevivencia larvaria

A partir de la obtención de los gametos se realizaron observaciones cada dos días, por medio de un microscopio compuesto, con el fin de conocer los cambios morfológicos en los embriones, durante el desarrollo larvario, el periodo de asentamiento y la metamorfosis.

Para el conteo de las larvas contenidas en cada recipiente, éstas se concentraron en una cubeta de cinco litros. Después de haber homogenizado el contenido, se tomaron seis muestras de 1 ml de la solución y se colocaron en una cámara de conteo para ser observadas en un microscopio compuesto; se contaron las larvas en cada muestra y el promedio de ellas se extrapoló al volumen total contenido en cada cubeta.

Se consideró la duración del desarrollo larvario para cada dieta, desde la fecundación de los gametos hasta el inicio de la metamorfosis. La sobrevivencia larvaria se estimó por periodos; el primer periodo corresponde del día 1 al 10, el segundo del día 10 al 19 y el tercero del día 19 al 26. Esto se realizó debido a que un número importante de larvas durante el experimento, fue extraída de los tanques como muestras para realizar análisis bioquímicos. Por lo anterior no fue posible conocer la sobrevivencia final de los cultivos, sin embargo, ésta fue calculada aplicando el porcentaje de sobrevivencia encontrado en los periodos del día 10 al 19 y del día 19 al 26, al porcentaje de sobrevivencia encontrado a los 10 días de cultivo.

Esto es, $S = a * b * c$

Donde:

S = sobrevivencia final estimada

a = porcentaje de sobrevivencia encontrado el día 10 de cultivo

b = porcentaje de sobrevivencia correspondiente al periodo del día 10 al 19

c = porcentaje de sobrevivencia correspondiente al periodo del día 19 al 26

Crecimiento de larvas

Para evaluar el desarrollo de las larvas, éstas fueron medidas un día antes de cada evaluación de sobrevivencia. El primer muestreo se realizó a los nueve días de haber comenzado con la alimentación; el segundo muestreo se llevó

acabo el día 18 y el último el día 25, un día antes de la inducción a la metamorfosis. Las biometrías se realizaron en diez larvas tomadas al azar de cada tanque (30 para cada tratamiento); se colocaron en una cámara de conteo y fueron medidas con un micrómetro en el microscopio compuesto. Se midió la longitud y ancho del cuerpo en vista ventral (Figura 1). En el muestreo del día 25 no fue posible realizar las biometrías de ancho del cuerpo debido a que las larvas comenzaban la transformación morfológica que ocurre cuando se encuentran competentes a la metamorfosis.

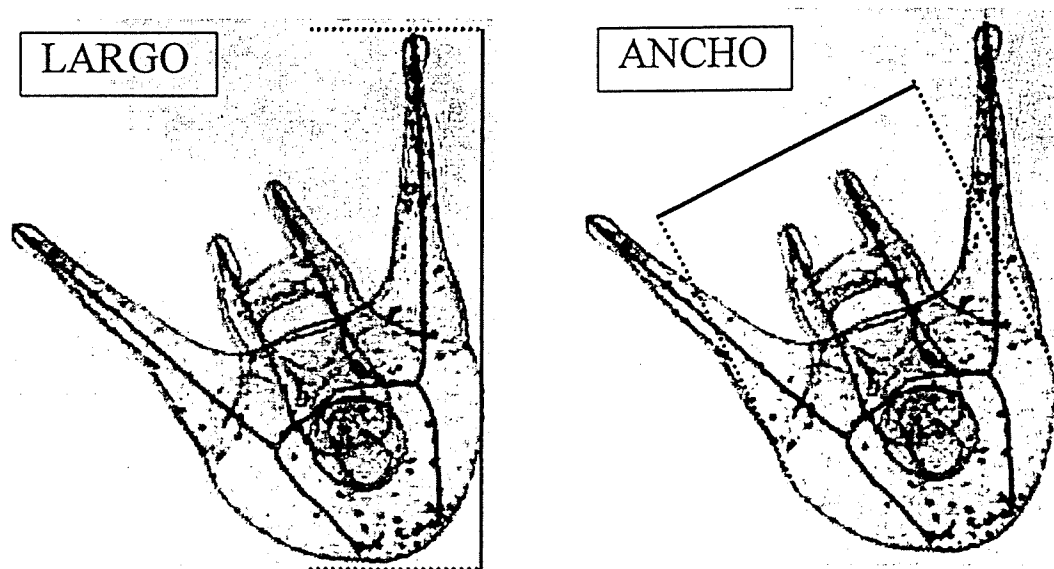


Figura 1.- Mediciones realizadas a larvas del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*

Determinación de biomasa y composición bioquímica de microalgas

Para llevar a cabo los análisis bioquímicos del alimento se realizaron cinco muestreos de las tres especies de microalgas usadas durante el experimento. El primer muestreo se efectuó el día en que se inició la alimentación de las larvas y los cuatro muestreos restantes cada cinco días. Por otro lado, para conocer el contenido bioquímico de las larvas, se llevaron a cabo cuatro muestreos. El primero se efectuó antes de la primera alimentación, durante el estadio prisma; los dos muestreos siguientes se realizaron cada nueve días y el último seis días después, cuando las larvas mostraron los cambios que indican la competencia a la metamorfosis.

Para la determinar el peso orgánico seco de la biomasa algal, se filtraron volúmenes conocidos de los cultivos de microalgas que variaron entre 35 y 90 ml de cultivo. Las muestras se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio GF/C de 1.2 μm (marca "Whatman"), de 47 mm de diámetro, previamente lavados, incinerados en una mufla a 490 °C y pesados. Para cada microalga se realizaron muestreos por cuatriplicado. Las muestras filtradas fueron lavadas con formato de amonio al 3% para eliminar sales. Los filtros con las muestras se colocaron en una estufa a 60°C por 12 h para obtener el peso seco constante, posteriormente se calcinaron en una mufla durante 12 h para determinar la cantidad de cenizas y por diferencia, se obtuvo el peso orgánico seco (Sorokin, 1973).

Para determinar los componentes bioquímicos principales, carbohidratos, lípidos y proteínas de las microalgas, se filtraron volúmenes conocidos (entre 10 y 30 ml) por cuadruplicado, en filtros de fibra de vidrio GF/C de 1.2 μm y 25 mm de diámetro (marca "Whatman").

Determinación de biomasa y composición bioquímica de larvas

Para conocer el contenido bioquímico de las larvas, se llevaron a cabo cuatro muestreos. El primero se efectuó antes de la primera alimentación, durante el estadio prisma; los dos muestreos siguientes se realizaron cada nueve días y el último seis días después, cuando las larvas mostraron los cambios que indican la competencia a la metamorfosis.

Para la determinar el peso orgánico seco de las larvas, se tomó una cantidad conocida de éstas que varió entre 200 y 1000 larvas, dependiendo del volumen que ocupaban según su estadio larvario y su crecimiento adquirido con los diferentes tratamientos. Las muestras fueron tomadas por triplicado y se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio GF/C de 1.2 μm (marca "Whatman") y de 25 mm de diámetro, previamente lavados, incinerados en una mufla a 490 °C y pesados. Las muestras filtradas fueron lavadas con formato de amonio al 3% para eliminar sales. Los filtros con las muestras se colocaron en una estufa a 60°C por 12 h para obtener el peso seco constante, posteriormente se calcinaron en una mufla durante 12 h para determinar la cantidad de cenizas y por diferencia, se obtuvo el peso orgánico seco (Sorokin, 1973).

Para determinar los componentes bioquímicos principales, carbohidratos, lípidos y proteínas de larvas se colocó un número conocido de organismos de cada recipiente de cultivo en tubos para centrifuga de 1.5 ml (marca "Eppendorf") por triplicado. La cantidad de larvas por muestra varió según el tamaño de éstas; algunos tratamientos presentaron larvas pequeñas por lo que su contenido orgánico también es menor. Por esta razón, fue necesario tomar más organismos de aquellos tratamientos con larvas pequeñas. En el primer muestreo, debido a la abundancia y homogeneidad de tamaño de la larva prisma, se dispuso de 12,480 organismos; en el segundo muestreo se usaron 500, 760 y 1,000 larvas, dependiendo del tamaño de éstas en cada unidad experimental; para efectuar el tercer tratamiento se necesitaron 300 larvas de cada réplica en todos los tratamientos y 200 para el último.

Tanto para microalgas como para larvas, las técnicas utilizadas fueron: proteínas por el método de Lowry *et al.* (1951) (modificado por López *et al.*, 1995); el análisis de carbohidratos según el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico de Dubois *et al.* (1956) (modificado por López *et al.*, 1995); y los lípidos por el método de Pande *et al.* (1963) (modificado por López *et al.*, 1995), previa extracción con el método de Bligh y Dyer (1959). Para las curvas de calibración se utilizaron como estándares, albúmina de bovino en el caso de las proteínas, glucosa anhidra para los carbohidratos y tripalmitina para lípidos.

En el presente trabajo los porcentajes de contenido bioquímico en microalgas y en larvas están basados en el peso orgánico seco (PO).

Composición bioquímica de mezclas bialgales

Con la finalidad de representar de una manera más clara la composición bioquímica del alimento proporcionado a las larvas, se calculó el contenido bioquímico teórico de las mezclas bialgales. Esto se realizó sumando el porcentaje de contenido de los componentes bioquímicos de la microalga base y de la complementaria, tomando como base la proporción de peso orgánico seco de cada una de éstas.

Con la finalidad de tener una visión general de lo sucedido durante el experimento, se realizaron gráficas que describen el comportamiento de las proteínas en el alimento y su relación con los organismos que las aprovecharon. También se relacionaron los porcentajes de proteínas del alimento y de las larvas con la longitud de las mismas para observar la existencia, o la ausencia, de efectos nutricionales de las dietas en el tamaño de las larvas.

Sobrevivencia después de la inducción a la metamorfosis

Cuando se observó que el 80% de las larvas del cultivo presentaron los cambios morfológicos y de comportamiento que caracterizan a la competencia a la metamorfosis, se seleccionaron 200 larvas de cada recipiente. Estos organismos fueron seleccionados al azar y colocados en cubetas de plástico de cuatro litros para ser inducidos a la metamorfosis. Las cubetas fueron inoculadas con microalgas bentónicas silvestres dos semanas antes y contaban con un sistema abierto de agua de mar y con aireación. En la primera semana el sistema

de agua y de aire no fue conectado para evitar que las larvas que aún nadaban se salieran. La limpieza de las cubetas se realizó cada cinco días.

A los 10 y 20 días de la inducción a la metamorfosis se realizaron observaciones para conocer si las poslarvas habían alcanzado su estadio juvenil. Para evaluar el número de organismos por cubeta, éstas fueron colocadas sobre una lámpara de neón blanca. Ahí se contó a los organismos sin desprenderlos del sustrato para evitar su muerte o estrés. Sólo fueron removidos cinco poslarvas de cada cubeta para revisar su parte oral. Al término de la metamorfosis se contó a los organismos, considerándolos como juveniles al tener la mandíbula funcional e iniciar la alimentación como organismo bentónico (Rogers-Bennett *et al.*, 1994). Esa observación se realizó con un microscopio estereoscópico, colocando las poslarvas sobre la base de una caja de petri con suficiente agua para evitar que murieran. También se buscaron rastros de ramoneo en la película de diatomeas sobre el fondo y paredes de la cubeta con la finalidad de detectar el comienzo de la alimentación.

Debido a que en la mayoría de los casos los datos no cumplieron con el requisito de normalidad y homogeneidad de varianzas, además de la presencia de algunos datos extremos, se utilizó la prueba estadística no-paramétrica de Kruskal-Wallis a un nivel de significancia del 5%. Cuando se detectaron diferencias estadísticas, se procedió a la realización de pruebas a posteriori de contraste múltiple de Tukey (Zar, 1984; Steel y Torrie, 1986).

RESULTADOS

Desove y fertilización de gametos

Se llevó a cabo el desove de organismos adultos, extraídos del medio natural, con buenos resultados. Se observó un porcentaje de fertilización de 99%.

Parámetros físico-químicos

La temperatura promedio del agua de cultivo durante el experimento fue de 16.5°C. Ocho días después del inicio del experimento, la temperatura del agua bajó a 14.2°C y ocho días antes de su finalización se incrementó hasta 18.1°C. Esta variación representó el intervalo mayor de temperatura a lo largo del experimento. En algunos casos durante las mediciones diarias se detectaron variaciones de 0.5°C entre los recipientes. Esas diferencias no significativas ($H=0.002$ $P=1.000$) fueron ocasionales ya que por lo general se encontró la misma temperatura en cada recipiente (Figura 2).

El oxígeno disuelto en el agua de los recipientes de cultivo no cambió significativamente a lo largo del experimento ($H=0.528$, $P=1.000$). Siempre se mantuvo en el intervalo comprendido entre 7.4 y 8.0 mg L⁻¹. Por su parte, el amonio disuelto en el agua de los tanques de cultivo fue bajo y no representó un factor variable ($H=18.395$, $P=0.364$) ya que se mantuvo entre 0.02 y 0.05 mg L⁻¹.

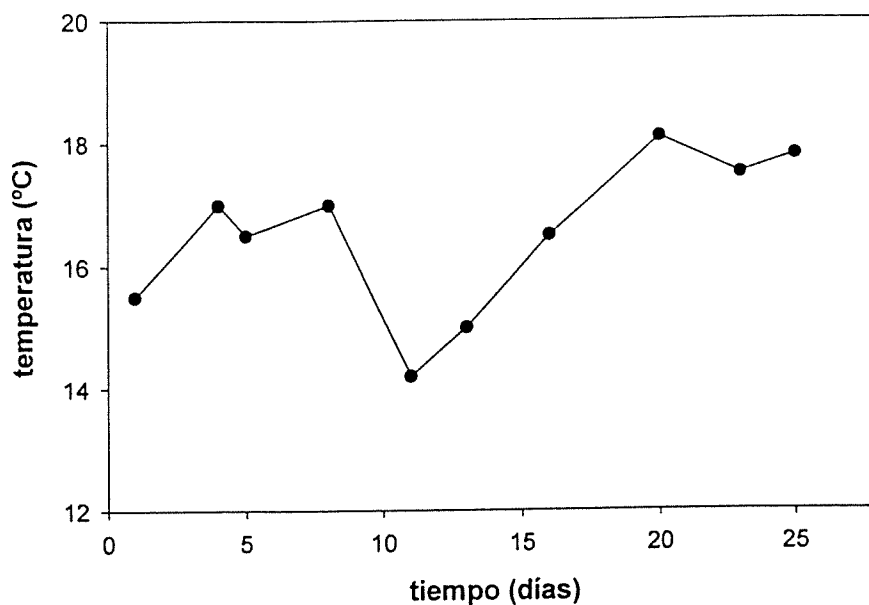


Figura 2- Temperatura del agua en el cultivo de larvas del erizo *Strongylocentrotus purpuratus*

Sobrevivencia larvaria

Las dietas C y CI produjeron sobrevivencias nulas en los tres recipientes de cada tratamiento (Figura 3a). A pesar de que no se encontraron diferencias entre las cuatro dietas que proporcionaron los requerimientos necesarios para el desarrollo de las larvas ($H=6.015$, $P=0.1109$), se observaron mejores resultados con la dieta RI (23.7%). Uno de los porcentajes de sobrevivencia más bajos los proporcionó la dieta R (9.8%); sin embargo, cabe hacer notar que la dieta CR (8.4% de sobrevivencia) registró una sobrevivencia nula en una réplica (Figura 3d).

La sobrevivencia larvaria correspondiente a los primeros diez días de alimentación, no registró diferencias entre las dietas ($H=3.812$, $P=0.5767$). A

pesar de esto, se observaron tendencias que pueden diferenciar los efectos de la alimentación. La dieta que propició la mejor sobrevivencia a los diez días de alimentación fue RI (90.4%) y la que proporcionó la sobrevivencia menor fue la dieta C (45.3%). Con excepción de la sobrevivencia larvaria propiciada por C, ésta nunca fue menor de 87% en los primeros diez días en todos los tratamientos (Figura 3b).

Para el periodo del día 10 al 19 de cultivo la sobrevivencia de larvas alimentadas con C fue nula; la de larvas alimentadas con CI fue cercana a cero, ya que solo se encontraron cerca de 100 larvas vivas, por lo que también se consideró nula. Entre las cuatro dietas restantes que si proporcionaron los requerimientos nutricionales para la sobrevivencia de las larvas no se encontraron diferencias significativas ($H=6.59$, $P=0.0862$), sin embargo, la sobrevivencia obtenida con la dieta R (32.1%) fue menor que las demás (RI, 76.6%; RC, 73.3%; y CR, 74.6%; Figura 3c).

No se encontraron diferencias en la estimación de la sobrevivencia larvaria en el periodo que comprendió del día 20 al 26 de alimentación ($H=4.560$, $P=0.2070$), sin embargo, es importante mencionar algunas tendencias observadas en los últimos siete días. De nuevo la dieta RI aportó la mejor sobrevivencia (36.7%). La dieta CR propició la sobrevivencia más baja (16.8%); además se encontró una sobrevivencia nula en una de las réplicas de este tratamiento (Figura 3d).

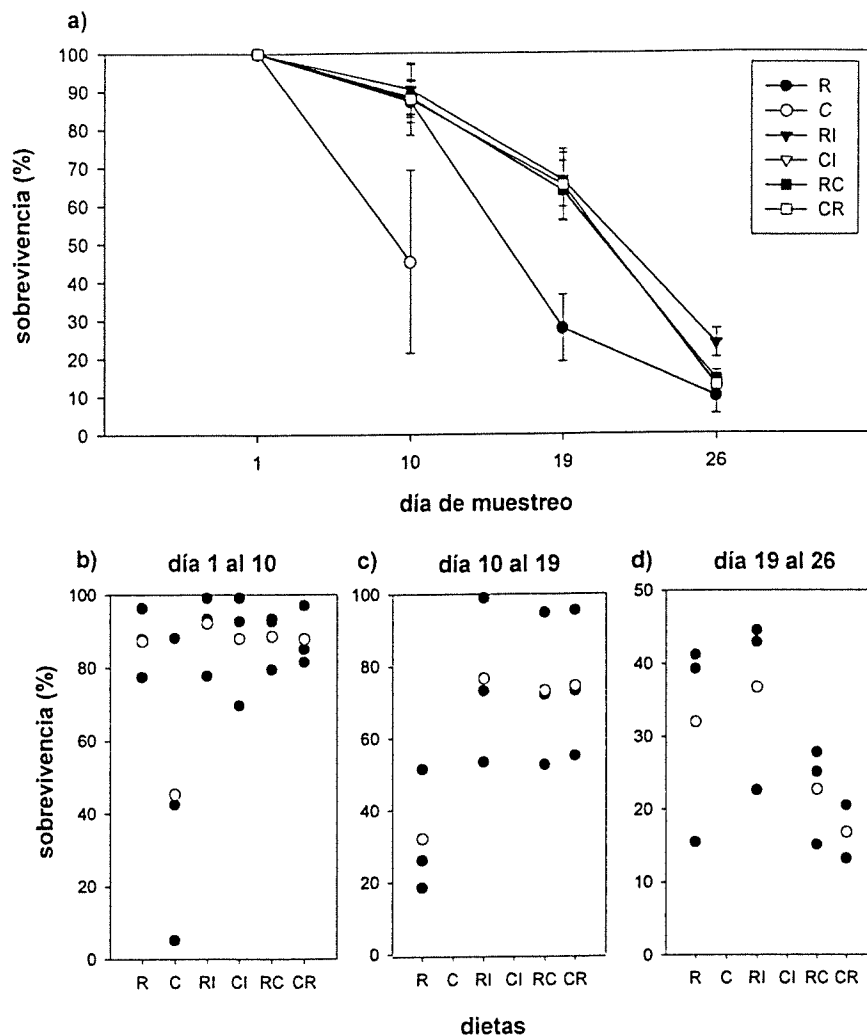


Figura 3.- Sobrevivencia de larvas alimentadas con seis dietas microalgales. R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. a) sobrevivencia general calculada a lo largo del experimento; las barras representan el error estándar de los tratamientos b) sobrevivencia correspondiente al periodo del día 1 al 10. c) sobrevivencia correspondiente al periodo del día 10 al 19. d) sobrevivencia correspondiente al periodo del día 19 al 26. Los círculos negros representan cada una de las réplicas y los círculos blancos representan el promedio de las mismas.

Crecimiento de larvas

La longitud y ancho inicial de las larvas fue de 179 (± 4.2) y 84 (± 3.1) μm respectivamente. A los nueve días de cultivo las larvas alimentadas con C y CI fueron las que presentaron los valores de longitud y ancho más bajos (334.4 (± 24.5) μm y 196.8 (± 23.3) μm ; 355.5 (± 34.7) μm y 239.8 (± 32.3) μm respectivamente), mientras que las alimentadas con R presentaron los valores más altos (455.5 (± 30.3) μm de largo y 351.9 (± 43.1) μm de ancho; Tabla II). En este periodo de nueve días, las larvas alimentadas con C y CI fueron diferentes a las alimentadas con las otras cuatro dietas ($H=56.384$, $P=0.000$).

A los 18 días de cultivo el efecto de las dietas en la longitud de las larvas fue diferente en todos los tratamientos ($H=24.553$, $P=0.0001$). Solo hubo dos excepciones que sugirieron igualdad entre tratamientos; la primera entre larvas alimentadas con R y las alimentadas con RI y la segunda entre las alimentadas con RC y las alimentadas con CI.

No se encontraron diferencias entre las mediciones de larvas alimentadas con las distintas dietas para el día 25 de cultivo ($H=6.480$ $P=0.0905$), sin embargo, se observó una tendencia de crecimiento mayor en larvas alimentadas con las dietas compuestas por *Rhodomonas* sp y menor en las alimentadas con las dietas compuestas por la microalga *C. muelleri* (Tabla II). Cabe mencionar que para el muestreo del día 18, la sobrevivencia de larvas alimentadas con C y con CI se consideró nula, sin embargo, fue posible medir larvas del tratamiento CI debido a la existencia de unas cuantas de ellas en el cultivo.

Tabla II.- Biometrías promedio (μm) de larvas alimentadas con seis dietas microalgales a los 9, 18 y 25 días de cultivo. R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. La desviación estándar se indica entre paréntesis.

	día 9		día 18		día 25
	largo	ancho	largo	ancho	largo
R	455.5 (30.3)	351.9 (43.1)	571.8 (45.5)	556.1 (46.1)	623.8 (84.3)
C	334.4 (24.5)	196.8 (23.3)			
RI	418.9 (32.6)	328.3 (41.3)	587.4 (57.7)	569.4 (63.4)	600.8 (104.5)
CI	355.5 (34.7)	239.8 (32.3)	487.9 (59.7)	472.9 (67.4)	
RC	438.9 (31.7)	322.2 (30.7)	487.2 (38.7)	485.8 (46.2)	559.7 (22.35)
CR	431.5 (28.2)	325.6 (37.7)	561.7 (85.4)	526.4 (94.4)	553.8 (100)

n=30. Largo y ancho inicial (larvas prisma)=179 (4.2) y 85.2 (3.1) respectivamente.

Determinación de crecimiento celular y biomasa de microalgas

Los cultivos de las microalgas, *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso) y *Rhodomonas* sp, registraron un promedio aproximado de 2.6×10^6 , 5.4×10^6 y 0.9×10^6 cél ml^{-1} respectivamente.

La biomasa de las microalgas utilizadas se expresa como peso seco total (PST) en $\mu\text{g ml}^{-1}$, peso orgánico seco (PO) en $\mu\text{g ml}^{-1}$ y porcentaje de cenizas (PC). Entre *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso) no se registraron diferencias en la biomasa producida en el cultivo ($H=1.306$ $P=0.9713$). Por su parte, *Rhodomonas* sp fue diferente a las otras dos microalgas en el día 6, 11 y 16 (día

6 H=8.000, P=0.0395; día 11 H=6.000, P=0.0298; día 16 H=8.000 P=0.040). Tanto en el muestreo del día 1 como en el 21 no hubo diferencias entre las tres microalgas (día 1 H=0.178 P=0.8793; día 21 H=5.115 P=.8768). En el caso particular de cada microalga, se encontraron diferencias entre el muestreo del día 6 y el 21 en cada especie (*C. muelleri*, H=14.979 P=0.0048; *I. aff.galbana* (Clone T-Iso), H=10.506 P=0.0327; *Rhodomonas* sp, H=9.488 P=0.0046; Tabla III).

La microalga *Rhodomonas* sp presentó los valores más bajos de PO y PST del promedio de los muestreos (112.14 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y 164.43 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente) mientras que *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso) presentaron valores similares (124.84 y 124.95 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (PO) y 189.35 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y 181.99 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (PST) respectivamente). En las tres especies de microalgas el porcentaje de cenizas se mantuvo alrededor del 30% (Tabla III).

Tabla III.- Peso seco total (PST, $\mu\text{g ml}^{-1}$), peso orgánico seco (PO, $\mu\text{g ml}^{-1}$), porcentaje de cenizas (%PC) y concentración de células por mililitro $\times 10^6$ (cél) de las tres microalgas utilizadas. Las muestras se tomaron en cinco días diferentes durante el experimento de alimentación de larvas de erizo *S. purpuratus*.

	<i>C. muelleri</i>				<i>I. aff.galbana</i> (T-Iso)				<i>Rhodomonas</i> sp			
	cél	PST	PO	%PC	cél	PST	PO	%PC	cél	PST	PO	%PC
día 01	2.6	244.67	152.00	37.9	6.9	197.67	151.67	23.3	1.0	198.57	141.43	28.8
día 06	2.1	137.14	99.56	27.4	4.7	128.44	91.59	28.7	0.6	76.73	65.30	14.9
día 11	2.4	167.76	118.96	29.1	4.4	167.69	110.40	34.2	1.0	145.34	106.99	26.4
día 16	2.2	195.56	105.31	46.1	8.0	149.32	109.44	26.7	0.8	161.53	91.48	43.4
día 21	3.9	201.63	148.35	26.4	6.2	266.81	161.65	39.4	1.5	240.00	155.50	35.2
Prom		189.35	124.84	33.4		181.99	124.95	30.5		164.43	112.14	29.7

Composición bioquímica de microalgas:

Carbohidratos

El mayor porcentaje de carbohidratos registrado fue de *Rhodomonas* sp (13.1%) y el menor fue de *C. muelleri* (7.5%; Figura 4). El intervalo en el que se mantuvieron los porcentajes de carbohidratos de las microalgas son: *C. muelleri* entre 5.5 y 10.7%, *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso) entre 8.1 y 13.3% y *Rhodomonas* sp entre 9.8 y 15.8%. El porcentaje promedio de carbohidratos durante el experimento varió entre las especies de microalgas; el de *C. muelleri* fue menor al de *I. aff. galbana* (Clone T-Iso) y al de *Rhodomonas* sp ($H=22.845$ $P=0.000$). En los muestreos realizados a lo largo del experimento, se encontró una tendencia de incremento en el porcentaje de carbohidratos de las tres especies de microalgas (Figura 5). Hubo diferencias entre los muestreos del día 6 y 21 de *C. muelleri* ($H=12.193$ $P=0.0068$) y entre los muestreos del día 16 y 21 de

I. aff. galbana (Clone T-Iso) ($H=12.691$ $P=0.0054$). En el caso de la microalga *Rhodomonas* sp el muestreo del día 6 fue diferente al del 16 y al del 21 ($H=12.397$ $P=0.0061$; Figura 5).

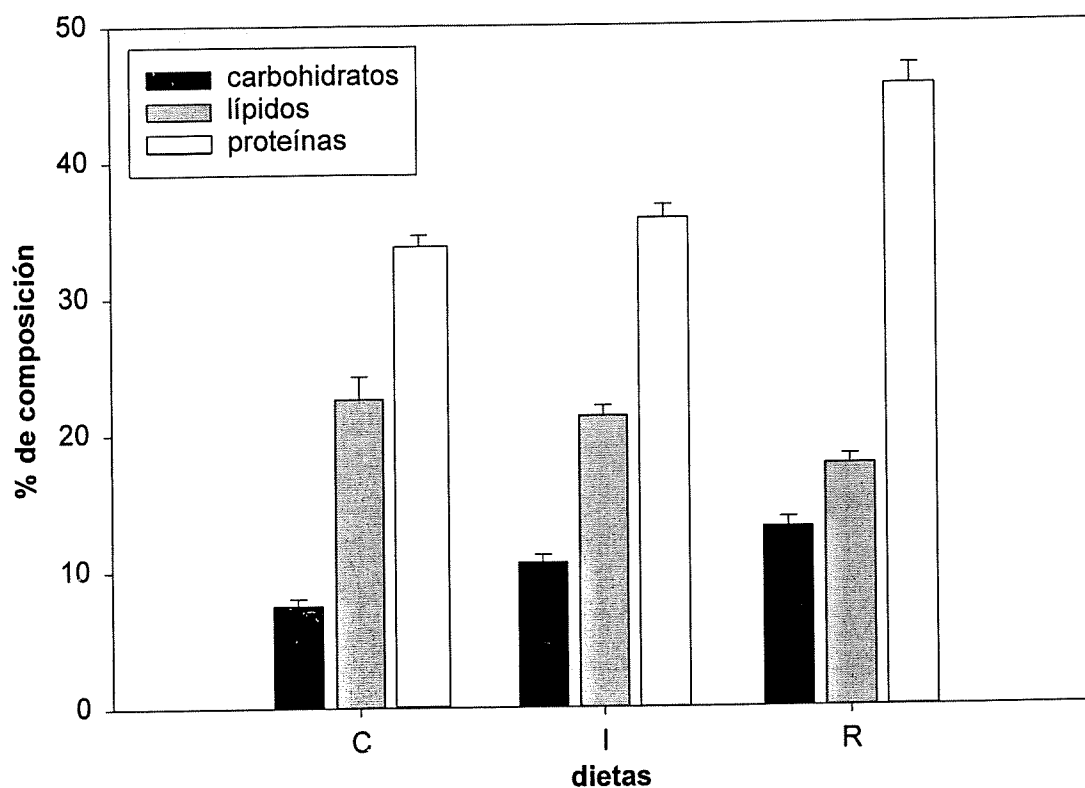


Figura 4.- Porcentaje promedio de carbohidratos, lípidos y proteínas de las tres microalgas utilizadas como alimento para larvas del erizo *S. purpuratus*. C=*Chaetoceros muelleri*, I=*Isochrysis aff. galbana* (Clone T-Iso), R=*Rhodomonas* sp. Las barras indican el error estándar.

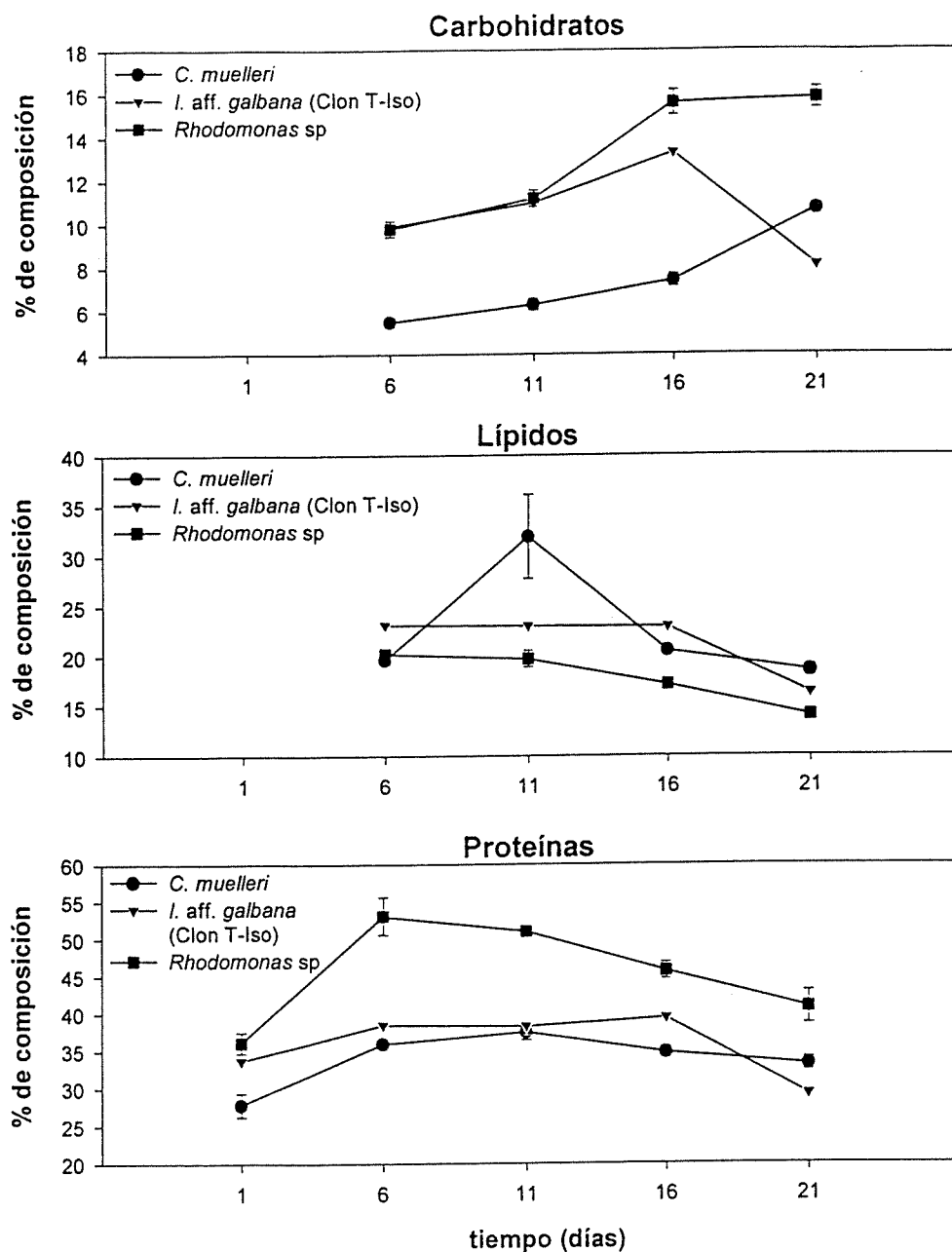


Figura 5.- Porcentaje de carbohidratos, lípidos y proteínas en cada muestreo (día 1, 6, 11, 16 y 21) de las microalgas usadas como alimento para larvas del erizo *S. purpuratus*. Las barras representan el error estándar.

Lípidos

Rhodomonas sp fue la microalga con menos contenido lipídico (17.7%), mientras que *C. muelleri* presentó los valores más altos (22.6%; Figura 4). No se encontraron diferencias entre el contenido de lípidos de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso) y ambas fueron diferentes a *Rhodomonas* sp ($H=12.265$ $P=0.0022$).

El porcentaje de contenido lipídico de las tres especies varió con el transcurso del tiempo durante el experimento (Figura 5). Estas variaciones difirieron según la especie y no siguieron ningún patrón. Los intervalos en los que se mantuvieron los porcentajes de lípidos en las microalgas son: *C. muelleri* entre 18.5 y 31.9%, *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso) entre 16.3 y 23.1% y *Rhodomonas* sp entre 14.0 y 20.2%. El muestreo del día 11 de *C. muelleri* resultó ser mayor a los otros muestreos ($H=12.490$ $P=0.0059$). La microalga *I. aff. galbana* (Clone T-Iso) presentó variaciones significativas entre el día 6 y el 21 de cultivo ($H=8.684$ $P=0.0338$), mientras que *Rhodomonas* sp presentó menor cantidad de lípidos en el muestreo del día 21 ($H=12.281$ $P=0.0065$).

Proteínas

De las tres microalgas, *Rhodomonas* sp fue la que presentó porcentaje de contenido proteico más elevado (45.4%; Figura 4) y fue diferente a *Chaetoceros muelleri* (33.8%) e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso) (35.8%; $H=24.329$ $P=0.000$).

Los intervalos en los que se mantuvieron los porcentajes de proteínas en las microalgas son: *C. muelleri* entre 27.8 y 37.5%, *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso) entre 29.2 y 39.4% y *Rhodomonas* sp entre 36.1 y 53.1%. Hubo diferencias entre los muestreos del día 1 y el día 11 de la microalga *C. muelleri* ($H=13.758$ $P=0.008$). Por su parte la microalga *Rhodomonas* sp mostró diferencias entre el muestreo del día 1 y los muestreos de los días 6 y 11 ($H=16.171$ $P=0.0028$). Para la microalga *I. aff. galbana* (Clone T-Iso) el muestreo del día 21 fue el que se diferenció de los demás ($H=14.929$ $P=0.0049$; Figura 5).

Composición bioquímica de mezclas bialgales:

Carbohidratos

Debido a que no se realizaron análisis bioquímicos de las mezclas bialgales, no fue posible analizar estadísticamente los datos, los cuales fueron calculados a partir de la composición bioquímica de cada especie de microalga. El valor más alto en las dietas de mezcla lo presentó la dieta compuesta de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso) (RI), 12.4%. Este valor fue superado solamente por la dieta monoalgal de *Rhodomonas* sp (R), 13.1%. En la dieta compuesta por *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso) (CI) el promedio de los porcentajes de carbohidratos fue 8.4%. Este valor representa el porcentaje más bajo de todas las dietas de mezcla y solo la dieta monoalgal compuesta por *C. muelleri* (C) registró un porcentaje menor, 7.5% (Figura 6 y 7).

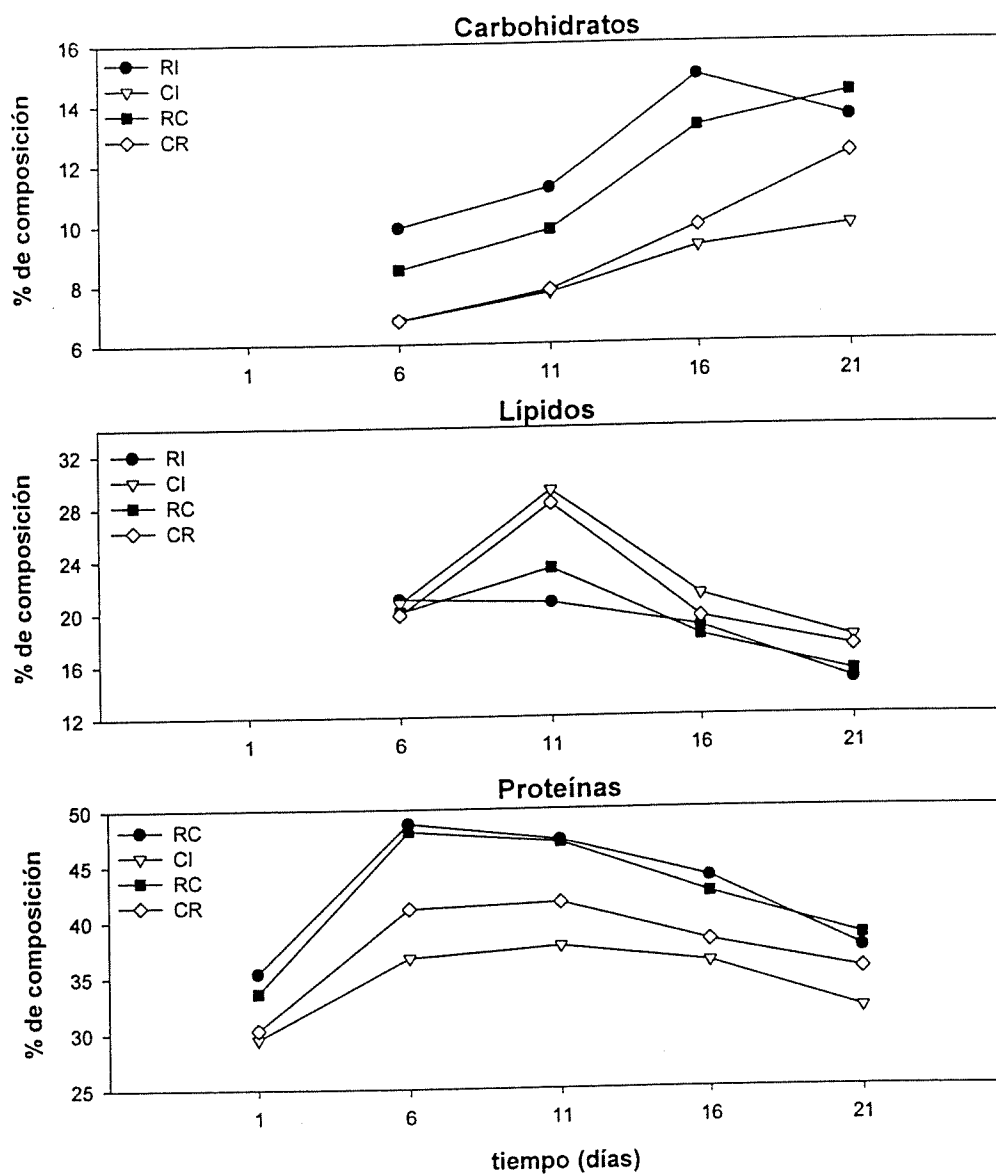


Figura 6.- Porcentaje de contenido bioquímico aproximado de las mezclas bialgales por muestreo (día 1, 6, 11, 16 y 21). RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp.

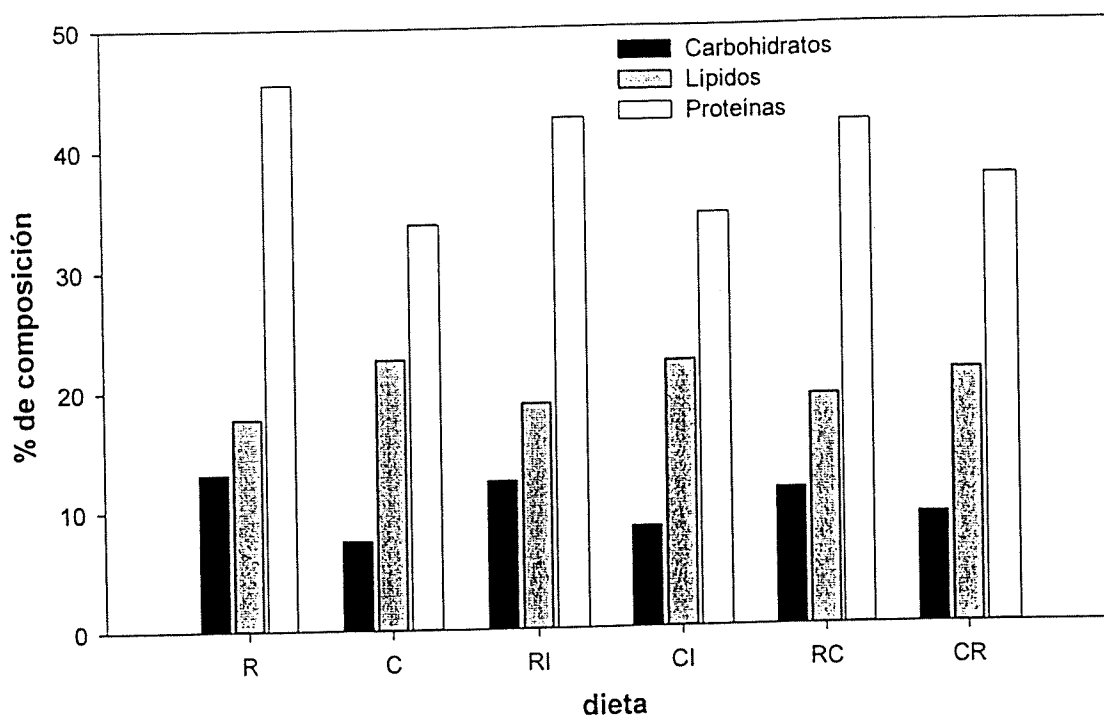


Figura 7.- Porcentaje promedio de carbohidratos, lípidos y proteínas de las seis dietas proporcionadas a larvas de erizo *S. purpuratus*. R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp.

Lípidos

El valor promedio más alto de lípidos en dietas de mezcla correspondió a la dieta CI, 22.2%, solo superado por la dieta monoalgal C, 22.6%. La dieta RI proporcionó el valor promedio de porcentaje más bajo, 18.8%; solo la dieta monoalgal R registró un valor menor, 17.7% (Figura 6 y 7).

Proteínas

El porcentaje promedio de contenido proteico más bajo en las dietas bialgales fue el de CI, 34.4% y el más alto fue el de RI, 42.5%. Ambos valores son superados por valores provenientes de dietas monoalgales (Figura 6 y 7).

Determinación de biomasa de larvas

La biomasa de las larvas alimentadas con las diferentes dietas se expresa en peso orgánico seco (PO) en pg larva^{-1} , peso seco total (PST) en pg larva^{-1} y porcentaje de cenizas (PC). Las diferencias entre el peso de la biomasa se encontraron generalmente entre larvas alimentadas con las dietas que contenían la microalga *C. muelleri*, ya sea como único componente o como parte principal de la dieta, y las alimentadas con dietas que incluyeron principalmente o únicamente a *Rhodomonas* sp ($H=39.645$ $P=0.000$). Se observó que en larvas alimentadas con *C. muelleri* la producción de biomasa fue escasa (316.03 pg larva^{-1} (PO); 534.33 pg larva^{-1} (PST)), y el PC que las compone es alto, ya que corresponde al 40.6% del PST (Tabla IV). Contrariamente a lo que sucedió con las larvas alimentadas con *C. muelleri*, la mayor cantidad de biomasa fue producida por larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp (3716.41 pg larva^{-1} (PO); 4473.72 pg larva^{-1} (PST)) las cuales presentaron valores de PC que corresponden al 21.72% del PST (Tabla IV).

En todas las dietas se observó que el incremento diario de peso fue mayor en los últimos siete días. Las larvas que se alimentaron con la dieta R mostraron

el mayor incremento en peso por día (Figura 8), siendo éste dos veces mayor que los valores de las cinco dietas restantes.

Tabla IV.- Peso seco total (PST) en pg larva⁻¹, peso orgánico seco (PO) en pg larva⁻¹, y porcentaje de cenizas (%PC) de larvas alimentadas con seis dietas microalgales. R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp. y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp.

	R	C	RI	CI	RC	CR
PST	día 10	1423.08	534.33	1209.01	714.83	1326.04
	día 19	4386.11		2585.19		3138.89
	día 26	10079.17		5293.06		5791.67
	PROM	4473.72	534.33	3029.08	714.83	3418.86
						2447.68
	R	C	RI	CI	RC	CR
PO	día 10	967.95	316.03	762.43	420.09	822.74
	día 19	3719.44		2396.30		2746.30
	día 26	8554.17		4087.50		4536.11
	PROM	3716.41	316.03	2415.41	420.09	2701.72
						1858.06
	R	C	RI	CI	RC	CR
%PC	día 10	32.1	40.6	35.6	42.7	35.6
	día 19	15.3		7.3		12.7
	día 26	15.1		23.4		21.1
	PROM	21.7	40.6	22.1	42.7	23.1
						24.6

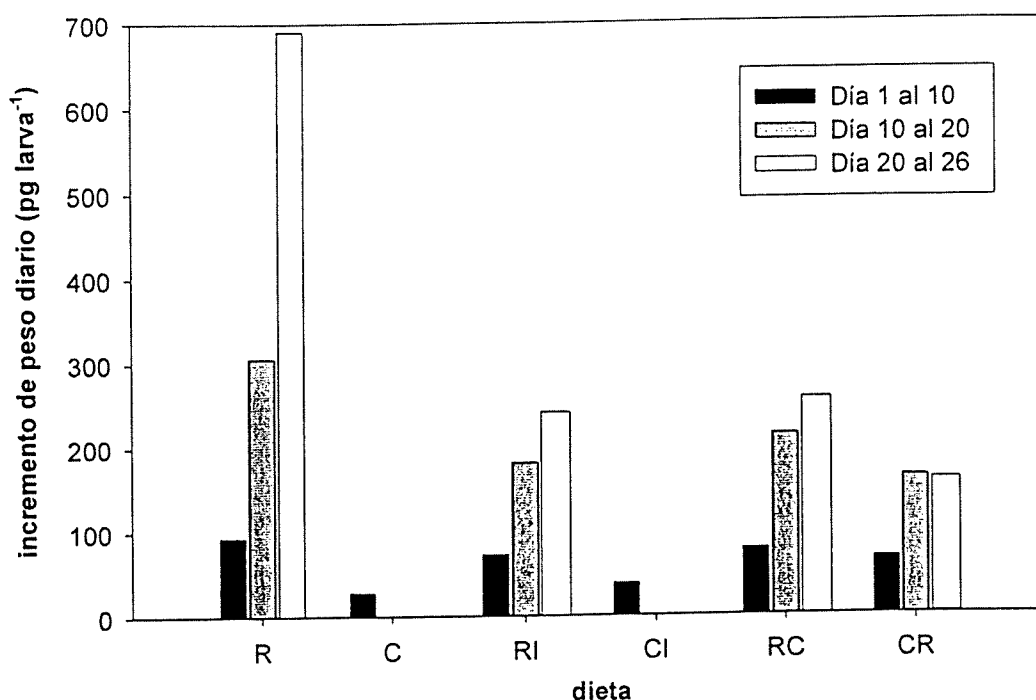


Figura 8.- Tasa de incremento de peso diario de larvas del erizo morado *S. purpuratus* alimentadas con seis dietas microalgales. R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp.

Composición bioquímica de larvas:

Carbohidratos

El análisis realizado a larvas prisma que aún no eran alimentadas, registró una composición de carbohidratos de 5% (Figura 9). El contenido de carbohidratos varió entre larvas alimentadas con dietas monoalgales y las alimentadas con dietas bialgales ($H=33.458$ $P=0.000$). Las larvas alimentadas con las dietas RI y CI presentaron los mayores porcentajes de contenido de carbohidratos (4.4 y 5.1% respectivamente), mientras que el valor más bajo (3.2%), se registró para aquellas larvas que se alimentaron con la dieta C (Figura 9).

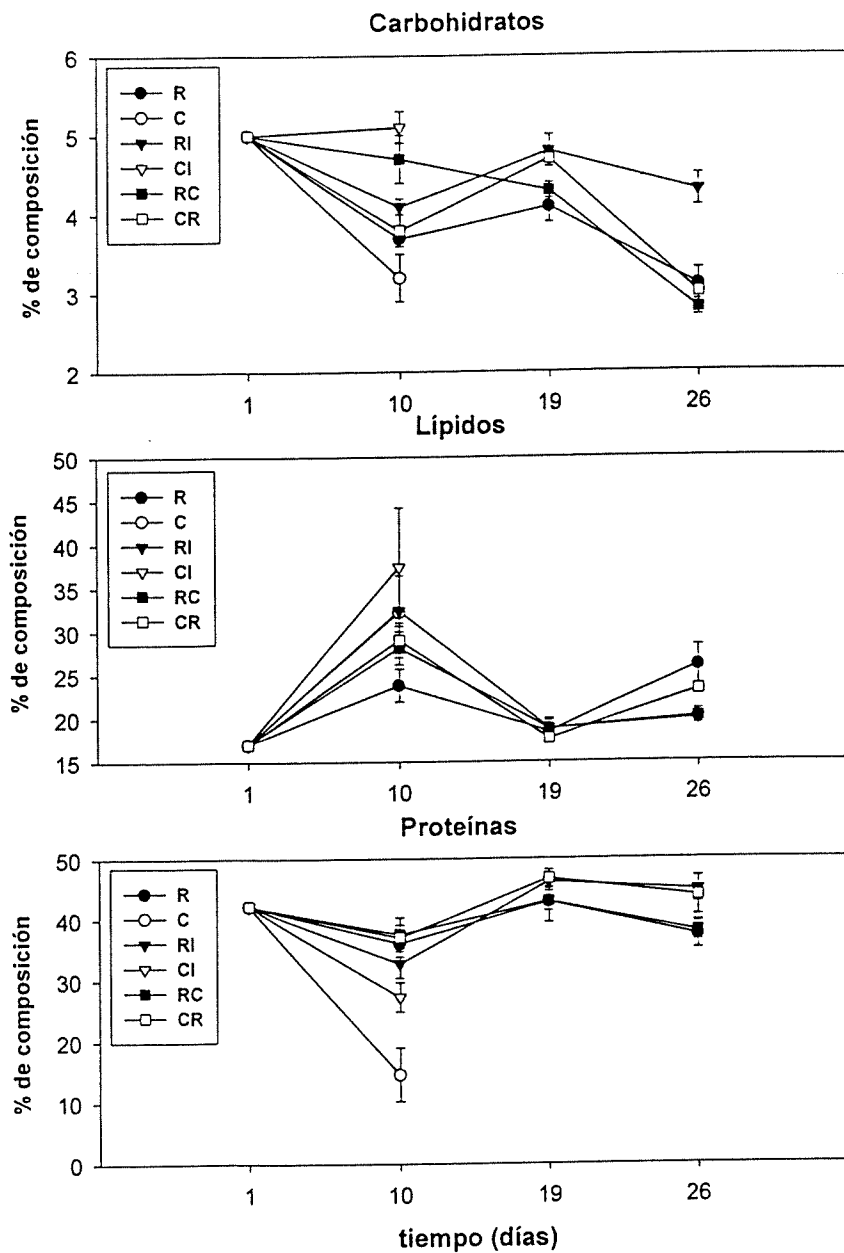


Figura 9- Porcentaje de carbohidratos, lípidos y proteínas de larvas de *S. purpuratus* alimentadas con seis dietas microalgales en cuatro muestreos distintos (día 1, 10, 19 y 26). R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clon T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. Las barras indican el error estándar.

Se encontraron algunas diferencias en la comparación de porcentajes de carbohidratos en larvas alimentadas con las distintas dietas durante el experimento. En el muestreo del día 10, las larvas alimentadas con las dietas C y CI fueron diferentes a las alimentadas con las otras dietas y diferentes entre sí ($H=30.407$ $P=0.000$; Figura 9). CI fue la dieta que más carbohidratos aportó a las larvas; por su parte, la dieta C fue la dieta que menos carbohidratos aportó.

Para el día 19 se observaron diferencias entre larvas alimentadas con la dieta RI y las alimentadas con la dieta RC ($H=10.697$ $P=0.0135$). En el muestreo del día 26, las diferencias principales se dieron entre larvas alimentadas con la dieta R y las alimentadas con las otras dietas ($H=16.733$ $P=0.0008$). Cabe hacer notar que en el día 19, todas las larvas alimentadas con C ya habían muerto (Figura 9 y 10). Lo mismo sucedió con las larvas alimentadas con CI en la fecha en que se realizó el cuarto y último muestreo.

Lípidos

El contenido de lípidos en larvas que se alimentaron con las distintas dietas no cambió significativamente ($H=10.341$ $P=0.0661$; Figura 9 y 10).

Las larvas prisma estuvieron compuestas de 17% de lípidos. Con el uso de todas las dietas fue evidente la acumulación de lípidos a partir del inicio de la alimentación (Figura 9 y 10). En el muestreo del día 10, las larvas con el mayor porcentaje de lípidos registrado (37.4%) fueron las alimentadas con CI, y el menor porcentaje fue de las alimentadas con RC (23.8%). A pesar de no haber diferencias en el muestreo del día 10 ($H=6.408$ $P=0.2685$), es notorio que la

cantidad de lípidos en dietas compuestas principalmente por *Chaetoceros muelleri*, fue mayor al encontrado en dietas compuestas principalmente por *Rhodomonas* sp. En el muestreo del día 26 se detectaron diferencias entre larvas alimentadas con R y las alimentadas con RI y RC ($H=10.454$ $P=0.0151$).

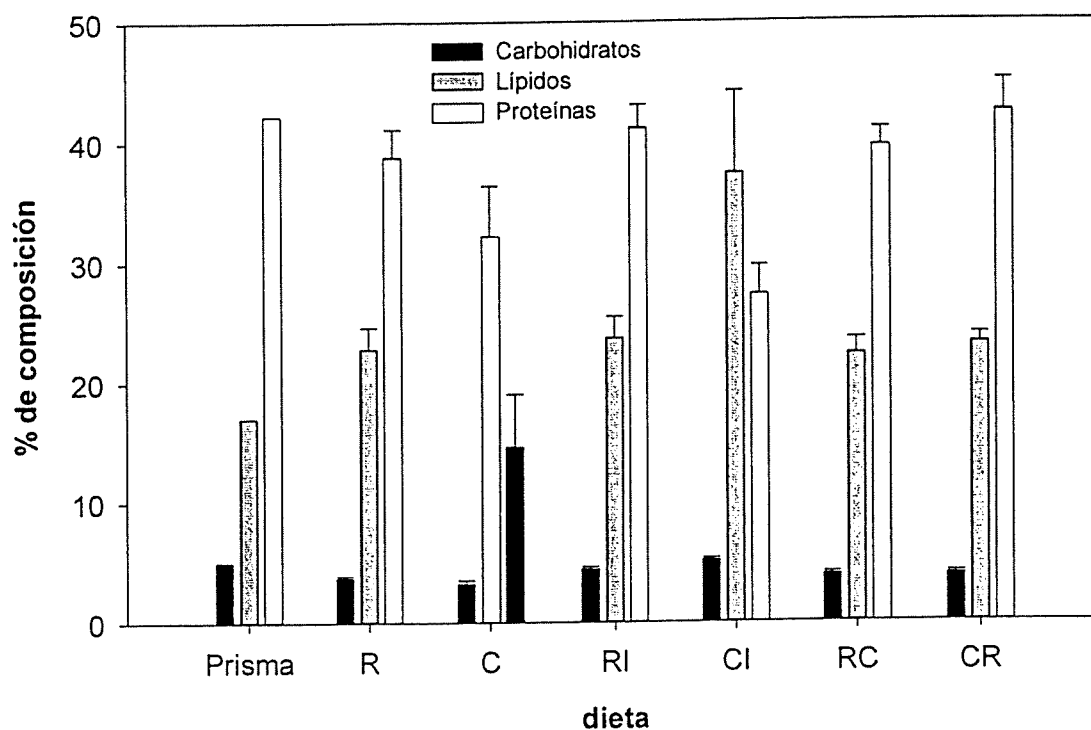


Figura 10.- Porcentaje promedio de carbohidratos, lípidos y proteínas de larvas de *S. purpuratus* alimentadas con seis dietas microalgales. R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. Prisma: estadio larvario en el que comienza la alimentación. Las barras indican el error estándar.

Proteínas

En general, las dietas compuestas por la microalga *Rhodomonas* sp, aportaron cantidades proteicas más elevadas (cercanas al 40%). Por su parte, las larvas alimentadas con las dietas C y CI presentaron los porcentajes de proteínas menores ($H=36.029$ $P=0.000$; Figura 9 y 10).

El porcentaje de composición de proteínas encontrado en larvas prisma fue de 42.2% y fue, en general, mayor al de estadios más avanzados a través del cultivo. Para el día 10 de cultivo, las larvas alimentadas con la dieta C presentaron el porcentaje más bajo de proteínas (14.6%; $H=23.627$ $P=0.0003$). Tanto en el muestreo del día 19 como del día 26, el contenido proteico de los organismos alimentados con las cuatro dietas que aportaron los requerimientos para el desarrollo larvario, no mostró diferencias ($H=2.520$ $P=0.472$, $H=6.361$ $P=0.0953$ respectivamente). En los dos últimos muestreos, las larvas alimentadas con las dietas C y CI ya habían muerto.

Se encontró una relación entre cantidad de proteínas en las dietas y cantidad de proteínas en larvas a los 10 días del experimento ($r=0.7$). Se observó que las proteínas de microalgas y larvas, y la longitud y ancho de las mismas también están relacionadas ($r=0.9$; Figura 11b, c, d y e). En los periodos del día 10 al 19 y del 19 al 26 se encontraron algunas concordancias pero no se observaron relaciones altas (Figura 12 y 13).

La cantidad de lípidos de microalgas en el periodo del día 1 al 10, también mostró una relación alta con la fracción lipídica en larvas ($r=0.7$; Figura 14a). La relación de la longitud y ancho de larvas con la cantidad de lípidos de las dietas,

es inversa a la relación existente con la fracción proteica ($r=1.0$). La fracción de lípidos de larvas también se relacionó negativamente con la longitud y ancho de las mismas ($r=-0.8$ y -0.7 respectivamente; Figura 14c y d)

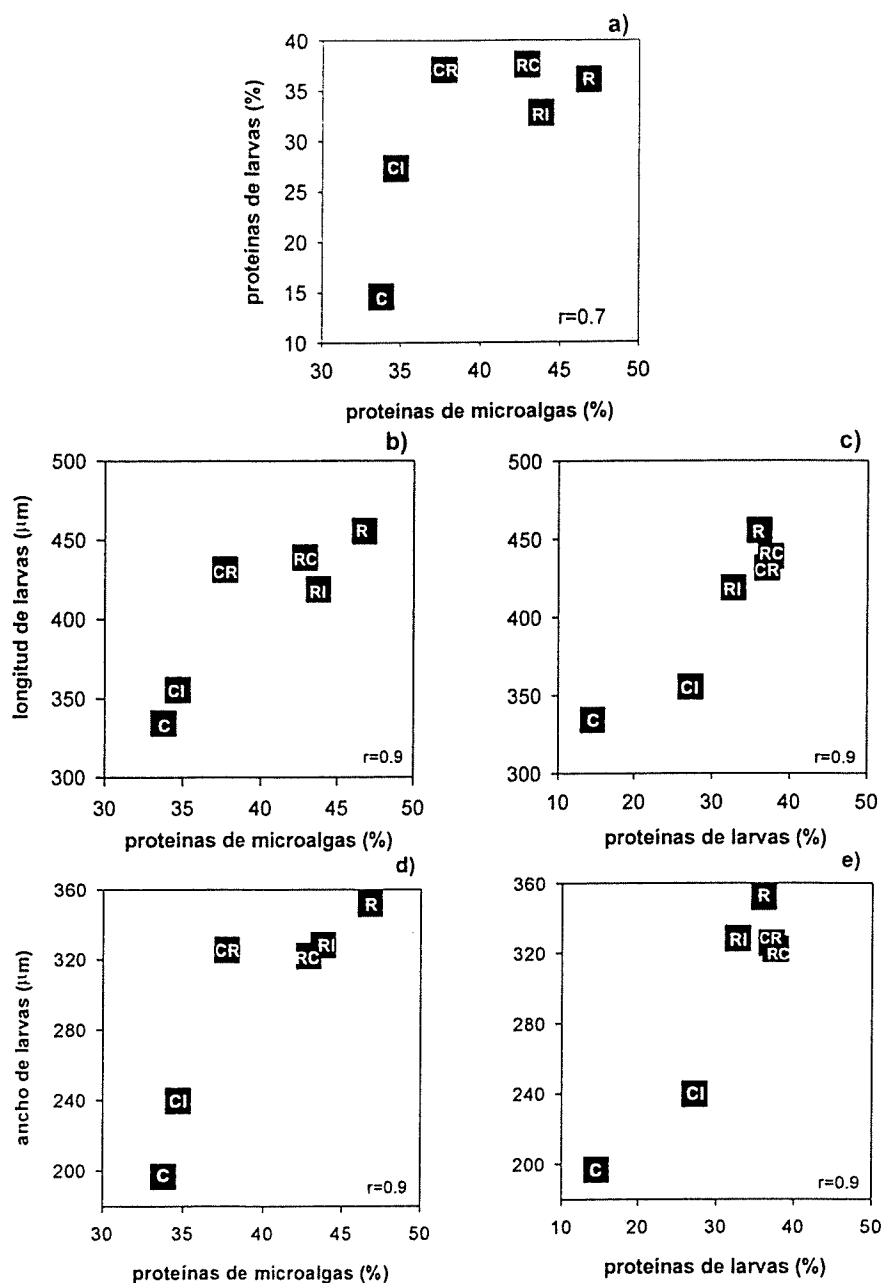


Figura 11.-Comparación del periodo correspondiente del día 1 al 10 del porcentaje de proteínas de: a) microalgas con el de larvas. b) microalgas con la longitud de larvas. c) larvas con la longitud de las mismas. d) microalgas con ancho de larvas. e) larvas con el ancho de las mismas. Las dietas microalgales para larvas de *S. purpuratus* fueron: R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clon T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. La "r" indica el valor de la relación (Pearson).

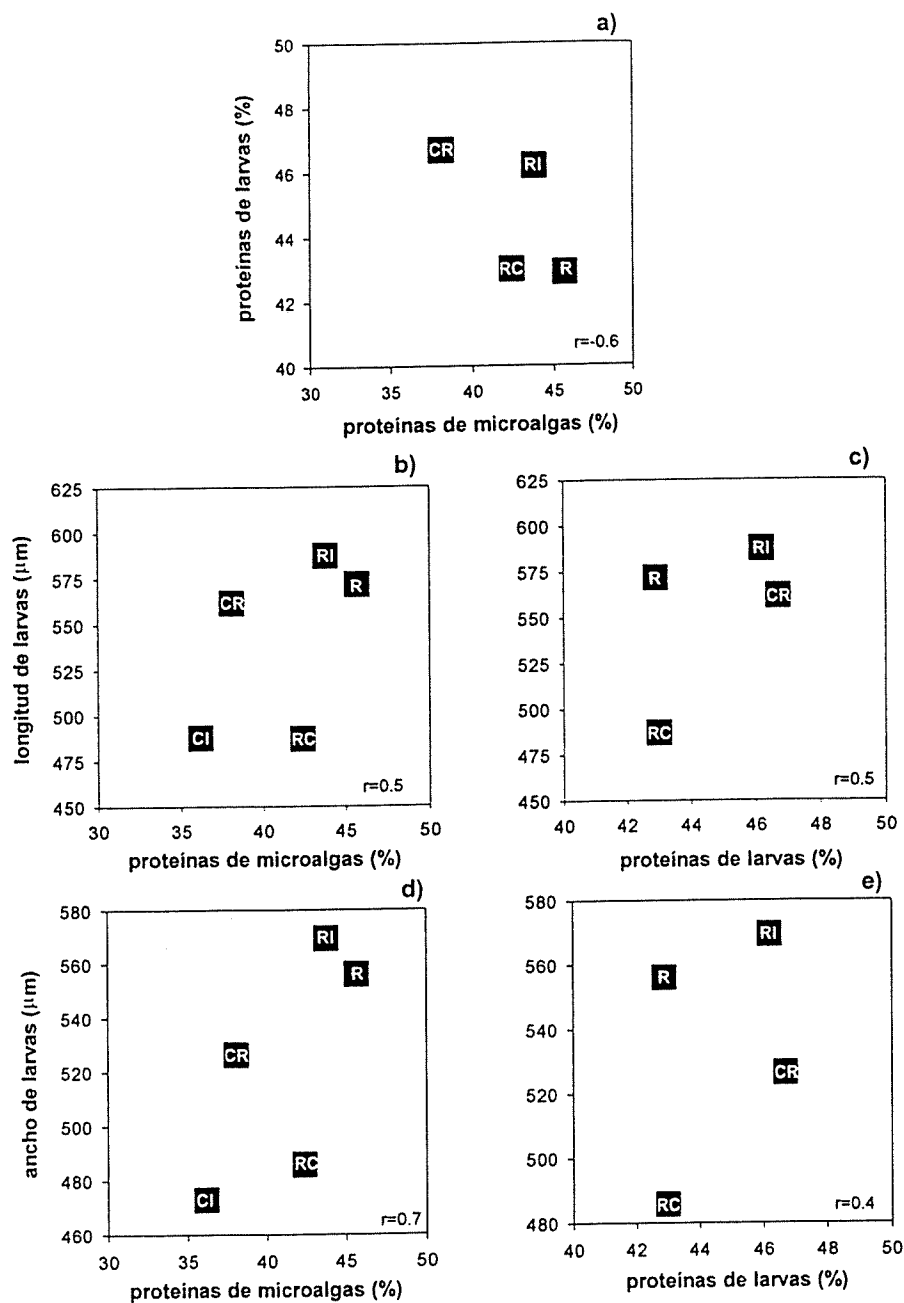


Figura 12.-Comparación del periodo correspondiente del día 10 al 19 del porcentaje de proteínas de: a) microalgas con el de larvas. b) microalgas con la longitud de larvas. c) larvas con la longitud de las mismas. d) microalgas con ancho de larvas. e) larvas con el ancho de las mismas. Las dietas microalgales para larvas de *S. purpuratus* fueron: R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. La "r" indica el valor de la relación (Pearson).

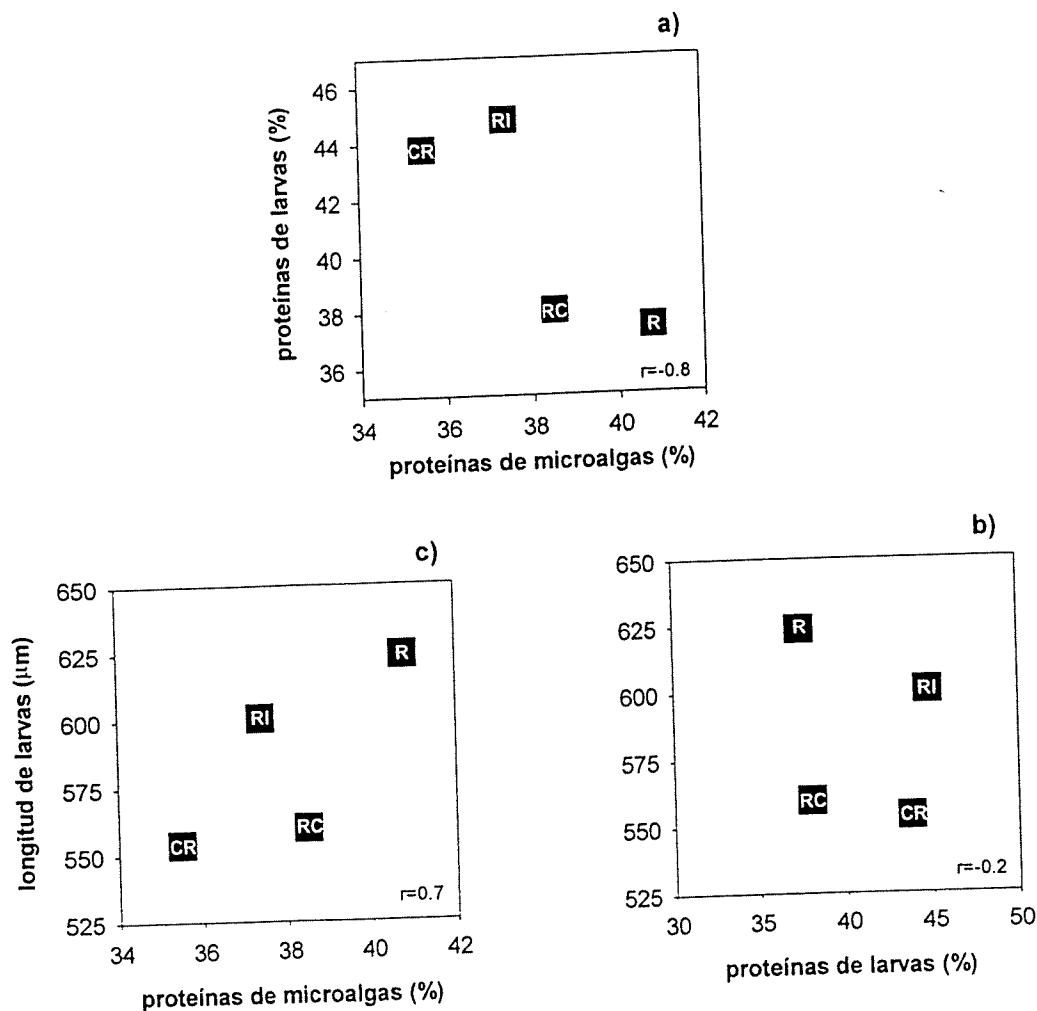


Figura 13.-Comparación del periodo correspondiente del día 19 al 26 del porcentaje de proteínas de: a) microalgas con el de larvas. b) microalgas con la longitud de larvas. c) larvas con la longitud de las mismas. Las dietas microalgales para larvas de *S. purpuratus* fueron: R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. La "r" indica el valor de la relación (Pearson).

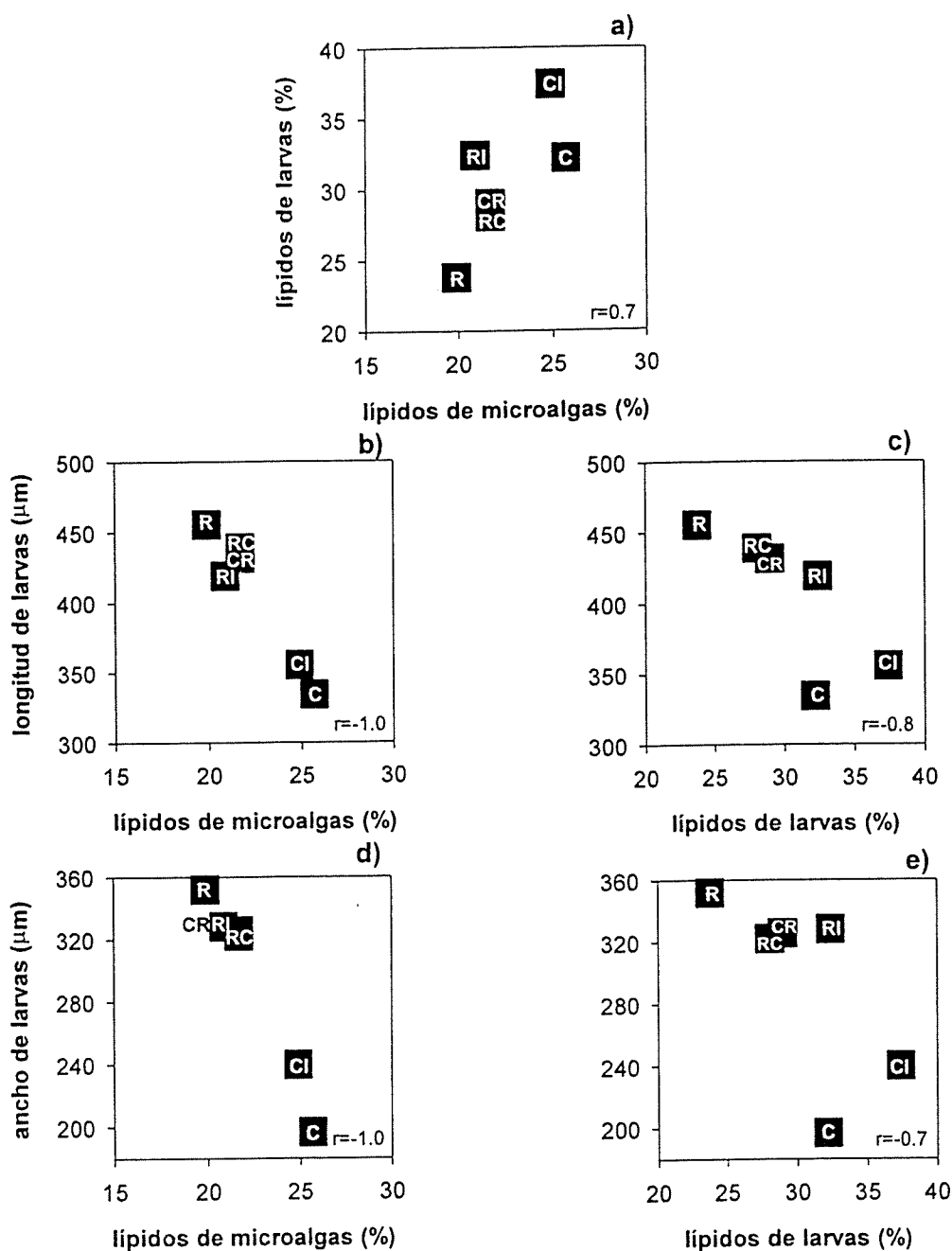


Figura 14.-Comparación del periodo correspondiente del día 10 al 19 del porcentaje de lípidos de: a) microalgas con el de larvas. b) microalgas con la longitud de larvas. c) larvas con la longitud de las mismas. d) microalgas con ancho de larvas. e) larvas con el ancho de las mismas. Las dietas microalgales para larvas de *S. purpuratus* fueron: R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. La "r" indica el valor de la relación (Pearson).

Sobrevivencia después de la metamorfosis

No se encontraron diferencias en la sobrevivencia de larvas alimentadas con las diferentes dietas a los 10 días de haber inducido a la metamorfosis ($H=5.344$ $P=0.1483$); sin embargo, es importante señalar la baja sobrevivencia que aportó la dieta CR (15.4%), si es comparada con la obtenida con las otras tres dietas (51.2% RC; 43.3% R; 38.8% RI; Figura 15). Después de diez días de la inducción a la metamorfosis no se encontraron organismos completamente metamorfizados. En todas las poslarvas se observó la presencia de una membrana que aún cubría la mandíbula. Tampoco se encontraron rastros de ramoneo en la película de diatomeas en las paredes de las cubetas.

A los 20 días de la inducción a la metamorfosis se encontraron diferencias entre la dieta RC, con el porcentaje de sobrevivencia más alto (38.1%) y CR con el porcentaje más bajo (11.9%; $H=7.848$ $P=0.0500$; Figura 15). Se observó que las larvas finalizaron el proceso fisiológico de la metamorfosis en las unidades experimentales de todas las dietas. Las poslarvas comenzaron a alimentarse y desde ese momento se consideraron "juveniles".

Los cálculos realizados para obtener valores hipotéticos de juveniles obtenidos se expresan en porciento. Estos cálculos indican que la dieta RI es la que aportó mejores condiciones para el desarrollo larvario y para los cambios morfofisiológicos a los cuales se enfrentan las larvas durante la metamorfosis. Esto se puede observar a los 10 días (9.2% de sobrevivencia) y al concluir la metamorfosis, a los 20 días (6.6% de sobrevivencia). En contraste, la dieta CR

resultó ser la que hubiera aportado el menor número de juveniles a los 10 días (1.5% de sobrevivencia) y a los 20 días (1.3% de sobrevivencia; Tabla V).

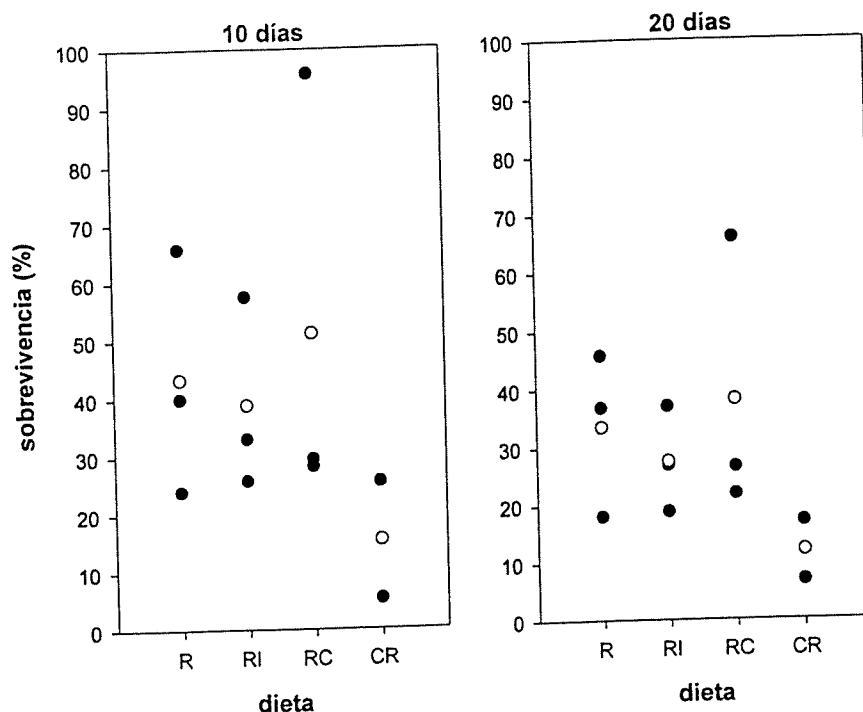


Figura 15.- Porcentaje de sobrevivencia después de 10 y 20 días de la inducción a la metamorfosis de larvas de *S. purpuratus* alimentadas con seis dietas microalgales. R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp. Los círculos negros representan cada uno de las réplicas y los círculos blancos representan el promedio de las mismas.

Tabla V.- Porcentaje de sobrevivencia a la metamorfosis hipotéticos de larvas de *S. purpuratus* alimentadas con seis dietas microalgales. R: *Rhodomonas* sp. C: *Chaetoceros muelleri*. RI: mezcla de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). CI: mezcla de *C. muelleri* e *I. aff. galbana* (Clone T-Iso). RC: mezcla de *Rhodomonas* sp y *C. muelleri*. CR: mezcla de *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp.

Dieta	10 días	20 días
R	4.6	3.3
RI	9.2	6.6
RC	6.4	4.9
CR	1.5	1.3

DISCUSIÓN

Desove y fertilización de gametos

Debido a que se observó un porcentaje de fertilización de 99%, se decidió proseguir con el cuidado de los embriones. Un porcentaje alto de fertilización indica que los huevos se encuentran en condiciones favorables para desarrollar los distintos estadios por los que pasa la larva hasta la metamorfosis. En cambio, un porcentaje de fertilización bajo, puede significar que los gametos femeninos no se encuentran maduros aún y por lo tanto las larvas no tendrán una condición de reserva energética para alcanzar el estadio prisma y su subsecuente desarrollo (Quintana-Rodríguez, 1999).

Parámetros fisicoquímicos

Un factor importante en el tiempo del desarrollo larvario es la temperatura del agua. A mayor temperatura, el tiempo del desarrollo larvario disminuye (Zimmerman y Pechenik, 1991). El experimento comenzó a finales del mes de febrero y en el onceavo día de cultivo se registró la temperatura más baja, 14.2°C (Figura 2). A partir de ese día, hasta el final del experimento, se observó un aumento en la temperatura del agua hasta los 18°C. Se ha establecido que la temperatura ideal para el cultivo de larvas de *S. purpuratus* es 15°C (Hinegardner, 1975), sin embargo, se ha determinado que el intervalo de 15 a 20°C también es adecuado, ya que en estas temperaturas las larvas sobreviven sin dificultades (Strathmann, 1987). En este experimento las larvas concluyeron su crecimiento

con la temperatura del agua dentro del intervalo aceptable para su desarrollo, por lo que, se descarta la posibilidad de que los organismos hayan sido afectados por el incremento de temperatura en los últimos días.

Debido a los continuos cambios de agua y a la aireación proporcionada en los recipientes, la concentración de oxígeno (entre 7.4 y 8.0 mg L⁻¹) y amonio (entre 0.02 y 0.05 mg L⁻¹) en los cultivos no fueron factores que hayan afectado a las larvas durante el cultivo. Preciado (2000) midió salinidad y pH en un sistema de cultivo similar dentro del mismo laboratorio (IIO, UABC). Determinó que no hay variaciones importantes debido a los frecuentes cambios de agua. A pesar de que en el presente trabajo no fue evaluada la salinidad y el pH, lo anterior sirve como base para descartar la posibilidad de que las larvas fueron afectadas por variaciones drásticas de estos factores.

En este trabajo se usó la aireación como método para resuspender a las larvas. Strathmann (1971) menciona que la aireación, como mecanismo de resuspensión, puede provocar deformaciones en las larvas. Sin embargo, en experimentos preliminares se demostró que la aireación no provocó ningún daño a larvas de esta especie, por lo que se consideró como un factor que no repercutió en la sobrevivencia larvaria.

Sobrevivencia larvaria

Aunque el efecto de las diversas dietas mostró diferencias claras en la sobrevivencia larvaria, ésta se considera baja, ya que la mayor sobrevivencia fue

de 23.7%, obtenida con la dieta R1. En un cultivo de larvas del erizo chileno *Loxechinus albus*, González *et al.* (1987), obtuvieron sobrevivencias de 94% con una dieta compuesta de *Dunaliella tertiolecta* e *Isochrysis* aff. *galbana*. Por su parte, Bustos *et al.* (1991), con la misma especie chilena, lograron obtener sobrevivencias de 20-40% proporcionando la microalga *Chaetoceros* sp como alimento.

La diferencia encontrada en los resultados de sobrevivencia respecto a otros trabajos pueden deberse a los métodos de cultivo. González *et al.* (1987) criaron a las larvas en recipientes de cinco litros y utilizaron una densidad de 0.05 larvas ml⁻¹. Pedrotti y Lemée (1999) obtuvieron 95% de sobrevivencia alimentando larvas del erizo *Paracentrotus lividus* con la microalga *Chricosphaera elongata*, sin embargo la técnica de cultivo que usaron no es efectiva si se pretende cultivar larvas con fines acuaculturales, ya que los recipientes que usaron fueron de un litro de capacidad. Salas-Garza y Parés-Sierra (2000), alimentaron a larvas de *S. purpuratus* con la mezcla microalgal compuesta de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis galbana* (proporción 50-50%) y con *Rhodomonas* sp únicamente, usando recipientes de cultivo de 100 litros. Mediante esas condiciones de cultivo, ellos obtuvieron porcentajes de sobrevivencia de 47 y 39% respectivamente.

La calidad del agua o la frecuencia en el cambio de la misma, son factores que, además de las dietas proporcionadas, pueden afectar a un cultivo de larvas (Bustos *et al.*, 1991). Dependiendo de la calidad del agua, se propician condiciones ambientales que favorecen la proliferación de bacterias, que pueden

ser patógenas para las larvas (Santiago, 1996). Por su parte, la frecuencia en los cambios de agua es un factor que afecta directamente el cultivo, ya que, a mayor frecuencia de cambio, mayor manipulación de los organismos. Las características microbianas del agua en donde se mantuvieron las larvas no fueron evaluadas en el presente trabajo, pero la manipulación de larvas es un factor que si pudo haber perjudicado la sobrevivencia.

Debido a la necesidad de tomar muestras con cierta cantidad de larvas para realizar los análisis bioquímicos, las larvas cultivadas en este trabajo fueron manipuladas fuertemente. Sin embargo, la manipulación de los cultivos fue la misma para todos los recipientes, por lo que el daño producido fue similar en cualquier tratamiento.

El alimento ofrecido a las larvas satisfizo la demanda durante todo el desarrollo. Esto se estableció con las observaciones realizadas diariamente a los recipientes, un día después de la alimentación y momentos antes de la misma, en donde era visible la existencia de alimento. Debido a la mortalidad larvaria en los tratamientos, se propicia mayor cantidad de alimento disponible por larva; a su vez, el incremento del tamaño de los organismos propicia mayor demanda alimenticia; por esta razón se consideró que la ración alimenticia inicial fue suficiente y no fue modificada. Para la elaboración de las dietas se tomó como base el peso orgánico seco de las microalgas y se aproximó la ración a 10,000 cél/ml, cantidad que se considera satisfactoria para el erizo rojo (Martínez-López, 1994).

La asimilación de materia orgánica disuelta del agua de mar por el epitelio de larvas de equinodermos ha sido descrita por pocos autores (Dixit, 1973 y Pavillon, 1976; citado por Fenaux 1982). Dixit (1973), observó cambios en el sistema de transporte de glicina durante el desarrollo larvario de *Strongylocentrotus purpuratus*. Por su parte, Pavillon (1976), probó que al agregar al agua de cultivo los aminoácidos ácido glutámico y glicina, incrementa el tamaño de las larvas de *Arbacia lixula* y *Paracentrotus lividus*. La logística y el diseño experimental establecido en el presente trabajo, no permitieron la evaluación de la asimilación de materia orgánica disuelta; sin embargo, es un aspecto que puede ser de gran utilidad para el conocimiento de la nutrición de larvas de erizo en un laboratorio de producción de semilla.

La duración del estadio larvario es un indicador indirecto de la eficiencia de las dietas suministradas que, además, juega un papel importante en los costos de producción de semilla. La dieta que resultó ser la más apropiada para el desarrollo larvario de *S. purpuratus* fue RI. Esta dieta se formuló con una proporción de 70% de contenido orgánico de la microalga *Rhodomonas* sp y 30% de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). Con el uso de esta dieta se obtuvo un tiempo de desarrollo larvario de 26 días. Salas-Garza y Parés-Sierra (2000), lograron larvas competentes de *S. purpuratus* en 28 días. Aparentemente la mejor dieta encontrada por Salas-Garza y Parés-Sierra fue la misma con la que se observaron mejores resultados en el presente trabajo (RI), sin embargo, la dieta fue ofrecida en un porcentaje de composición diferente y no fue basada en el

peso orgánico seco de las microalgas. Por su parte, Miller y Emlet (1999), alimentaron con una dieta compuesta de *Chaetoceros gracilis* y *Rhodomonas lens* a larvas de *S. purpuratus*, las cuales completaron su desarrollo larvario en 29 días (13-15°C). Esta dieta no fue basada en el peso orgánico seco de las microalgas, sin embargo, si se asume que el contenido orgánico de estas especies es similar al encontrado en el presente estudio, la proporción que ofrecieron fue cercana a 50-50%. En el presente trabajo se encontró que la diatomea *Chaetoceros muelleri* no presenta los requerimientos necesarios para ser utilizada como único alimento de larvas de *S. purpuratus*. Cuando se mezcla *Rhodomonas* sp con *C. muelleri* y se ofrece como alimento, este cumple con los requerimientos larvarios de *S. purpuratus*. La microalga *C. muelleri* debe ser proporcionada en bajas cantidades para obtener resultados favorables de sobrevivencia de esta especie de erizo. Las diferencias encontradas entre el presente trabajo y otras investigaciones, confirman que, en respuesta a una dieta deficiente, se incrementa el tiempo del periodo de desarrollo larvario (Pedrotti y Fenaux, 1993).

Crecimiento de larvas

Las larvas de *S. purpuratus* modifican su morfología en respuesta a diferentes dietas. En general, la tendencia encontrada indica que las larvas de mayor talla son también las que presentaron mejor sobrevivencia (Tabla II; Figura 3). Las larvas alimentadas con RI y con RC fueron las que mayor tamaño y sobrevivencia presentaron. Por su parte, las larvas alimentadas con C y con CI

fueron las más pequeñas y no fueron capaces de sobrevivir después de 19 días de cultivo. Esto sugiere que el tamaño es una referencia que puede tomarse en cuenta para la evaluación de la salud de las larvas. Sin embargo, el tamaño no debe considerarse como única referencia, ya que éste puede variar según la dieta ofrecida. En este estudio se observó un ejemplo de lo anterior; las larvas alimentadas con R fueron las más grandes, sin embargo, la sobrevivencia final obtenida con esta dieta fue la más baja (9.8 %; Tabla II; Figura 3). De todas las dietas, *Rhodomonas* sp proporcionó la mayor cantidad de proteínas a las larvas; los organismos alimentados con esta dieta, también presentaron la mayor cantidad de proteínas. Esto sugiere que el contenido proteico de la microalga fue aprovechado eficientemente por la larva, la cual utilizó este recurso para formar tejido e incrementar su tamaño. Sin embargo, la sobrevivencia con esta dieta fue baja. Esto sugiere que *Rhodomonas* sp carece de algún elemento esencial para la sobrevivencia larvaria. Es sabido que las dietas mixtas ofrecen una mayor variedad de componentes bioquímicos que satisfacen los requerimientos de las larvas (Metaxas y Young, 1998a; Metaxas y Young, 1998b; Pedrotti y Fenaux, 1993). Aunque *Rhodomonas* sp ha sido recomendada por diversos autores para esta especie de erizo (Hinegardner, 1969; Cameron y Hinegardner, 1974; Martínez-López, 1994; Emlet, 2000) es recomendable complementarla con otra microalga que aporte los componentes que cubran los requerimientos larvarios.

Desde los primeros ocho días de alimentación fue posible observar las diferencias nutricionales de algunas dietas que influyeron en el tamaño de las larvas. El aporte de proteínas por las microalgas y su contenido en larvas, se relacionó estrechamente con el crecimiento de los organismos. En particular, las dietas RI y C propiciaron resultados de crecimiento contradictorios. La fracción proteica en las microalgas estuvo altamente relacionada con la longitud y ancho de larvas ($r=0.9$). La fracción de lípidos en microalgas también se relacionó con las biometrías mencionadas, sin embargo, esta relación fue inversa ($r=-1.0$) (Figura 11, 12, 13 y 14).

En un estudio con larvas del erizo *Psammechinus miliaris*, Kelly *et al.* (2000), mencionan que el encogimiento de los brazos es un efecto cualitativo del tipo de dieta y no es una respuesta a la cantidad de alimento disponible. Considerando lo anterior, podemos inferir que las larvas, al aumentar de tamaño, pueden incrementar la longitud de las bandas ciliadas (organelos que usan para la captura de células fitoplanctónicas), lo que les sirve para incrementar el volumen de alimento capturado. Lo anterior, a su vez, está relacionado directamente con la sobrevivencia larvaria. En este estudio, el tamaño de las larvas se asocia más con la calidad de las dietas que con la cantidad de alimento disponible.

Crecimiento celular y biomasa de microalgas

El contenido de materia orgánica en las microalgas utilizadas fue similar a el reportado por otros autores (Brown *et al.*, 1998; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989;

Whyte, 1987)). La cantidad de cenizas en las tres especies de microalgas utilizadas en este estudio también se mantuvieron dentro los intervalos reportados (Brown *et al.*, 1989; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Lafarga, 2000; Tabla III; Anexo 1). Cerón (2000) menciona que la cantidad de cenizas puede variar debido a la edad del cultivo. Otro factor que es importante tomar en cuenta para la determinación del peso de cenizas es la toma de la muestra. Si no se realiza un lavado de las sales provenientes del agua de mar, el resultado puede ser sobrestimado. En el caso del presente trabajo, las muestras fueron correctamente enjuagadas para eliminar las sales del agua.

Composición bioquímica de microalgas

En general, el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas que registraron las microalgas *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso) y *Rhodomonas* sp fue similar al reportado por otros autores (Brown *et al.*, 1989; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Cordero y Voltolina, 1994; Renaud *et al.*, 1998; McCausland *et al.*, 1999; Cerón 2000; Lafarga, 2000; Anexo 1). Es importante señalar que algunas diferencias entre éste y otros trabajos pueden ser encontradas, sin embargo, éstas pueden ser el resultado de la metodología de detección utilizada (Fernández-Reiriz, 1989; Valenzuela-Espinoza, 1997; Leonardos y Lucas, 2000).

Aunque las condiciones ambientales en las que se mantuvieron los cultivos fueron siempre las mismas, no fue posible controlar la temperatura del laboratorio

de producción de microalgas, que varió de 16 a 21°C (Valenzuela-Espinoza com. pers.). Las variaciones de temperatura provocan cambios en la tasa de crecimiento de las microalgas (Ostroff *et al.*, 1980), lo que a su vez, puede modificar su composición bioquímica. Los cambios que se presentaron en la temperatura del laboratorio de cultivo de microalgas, posiblemente sean la razón que explique algunas variaciones en los porcentajes de los componentes bioquímicos registrados a través del tiempo (Figura 5).

El valor nutritivo de las microalgas está relacionado con su composición orgánica, principalmente de lípidos y su composición específica de ácidos grasos (Pedrotti y Fenaux, 1993; Brown *et al.*, 1997). Así, microalgas ricas en ácidos grasos y especialmente aquellas ricas en el ácido eicosapentanoico (EPA 20:5n-3) y en el ácido docosahexanoico (DHA 22:6n-3), han sido usadas en cultivos de larvas de ostión (Langdon y Waldock, 1981; Pillsbury, 1985; Enright *et al.*, 1986); además se ha mencionado que estos ácidos grasos pueden afectar el desarrollo de larvas de los erizos *Arbacia lixula* y *Paracentrotus lividus* (Pedrotti y Fenaux, 1993).

Algunos autores han comparado la composición bioquímica de microalgas usadas en acuicultura, entre las cuales se encuentran las tres utilizadas en este trabajo (Brown *et al.*, 1989; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Volkman *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1997; McCausland *et al.*, 1999). En esas comparaciones se evidencian las diferencias bioquímicas entre *C. muelleri* y *Rhodomonas* sp e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). Entre los ácidos grasos que se han

considerado como esenciales para algunos organismos se encuentra el poliinsaturado DHA 22:6n-3 (Volkman *et al.*, 1989; Caers *et al.*, 1998), el cual está escasamente presente (de 0.2 a 1%) en *C. muelleri*, mientras que en *Rhodomonas* sp y en *I. aff. galbana* (Clone T-Iso) se encuentra abundantemente (de 5 a 20%) (Volkman *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1997; McCausland *et al.*, 1999). Lo anterior es una evidencia que sugiere que el ácido docosahexanoico es esencial para el desarrollo larvario de *S. purpuratus*. La ausencia de dicho ácido graso en *C. muelleri* pudo ser la causa del bajo rendimiento que presentaron las larvas alimentadas con esta microalga. Un factor que contribuye a sostener la aseveración anterior está basado en lo siguiente: La microalga *Dunaliella tertiolecta* se ha usado exitosamente como alimento para larvas de otras especies de erizo (*Loxechinus albus*, González *et al.*, 1987; *Strongylocentrotus droebachiensis*, Meidel *et al.*, 1999; *Psammechinus miliaris*, Kelly *et al.*, 2000). Sin embargo, Salas-Garza y Parés-Sierra (2000) suministraron *D. tertiolecta* como alimento para larvas de *S. purpuratus*, dando como resultado un elevado porcentaje de mortalidad y un deficiente desarrollo larvario. Esta microalga también carece del ácido docosahexanoico (McCausland *et al.*, 1999). Cabe señalar que los argumentos usados anteriormente están basados en revisiones bibliográficas, por lo tanto, sirven como base para la interpretación de los resultados; sin embargo, es necesario realizar experimentos en los que se evalúe la composición de ácidos grasos, tanto en el alimento como en larvas.

Composición bioquímica de larvas

El cambio en la composición bioquímica de las larvas a través del tiempo (desde larva prisma hasta la competencia a la metamorfosis), indica la existencia de diferencias en la efectividad de las dietas (Tabla IV). Las diferencias bioquímicas que se encontraron entre larvas alimentadas con *C. muelleri* y el resto, coinciden con las grandes diferencias encontradas en la sobrevivencia larvaria (Figura 3 y 10). Esto puede tomarse como base para sugerir que el contenido bioquímico (principalmente de proteínas) encontrado en las larvas, puede servir como un indicativo de la calidad de las mismas, sin dejar a un lado la importancia que tienen los ácidos grasos y los aminoácidos contenidos en las dietas.

La adquisición y almacenamiento de gran cantidad de lípidos, observados en los primeros días de cultivo resalta la importancia de este componente como reserva energética para el desarrollo larvario (Figura 9). Existe una influencia por parte los lípidos y proteínas en la composición de los mismos en larvas (Figura 11a y 14a). Lo anterior y la notable asimilación del contenido orgánico de las dietas por las larvas, observado en la tasa de incremento de peso en los primeros 10 días de cultivo, (Figura 8), debe tomarse en cuenta para lograr sobrevivencias mejores en días posteriores.

En larvas del erizo morado el componente bioquímico principal son las proteínas, seguidas por los lípidos y por último los carbohidratos. Así sucede con larvas de otras especies de invertebrados marinos (Mann y Gallager, 1985; Whyte

et al., 1987; Ferreiro *et al.*, 1990; Whyte *et al.*, 1992; Fariás *et al.*, 1998; D'Souza y Kelly, 2000). Extrañamente, las larvas que fueron alimentadas con dietas que contenían principal o únicamente *C. muelleri* no presentaron ese patrón de composición. Durante los diez días que vivieron estas larvas, el principal componente bioquímico fueron los lípidos (Figura 10). De las tres microalgas utilizadas como alimento, *C. muelleri* presentó el mayor porcentaje promedio de lípidos, sin embargo, en los primeros muestreos de esta microalga, representativos de los pocos días en que las larvas se alimentaron con *C. muelleri*, el porcentaje de lípidos fue similar al de las otras dos microalgas (Figura 5 y 14a). Posiblemente las proteínas contenidas en esta microalga no fueron utilizadas completamente por las larvas. Aunque la calidad nutricional de las microalgas no está relacionada necesariamente con la composición de aminoácidos (Brown *et al.*, 1989), la carencia de calidad en las proteínas afecta el desarrollo de los organismos. Posiblemente la microalga *C. muelleri* carece de algún aminoácido que hace a la microalga de calidad deficiente para larvas de *S. purpuratus*; sin embargo, otra especie del género *Chaetoceros* no presentó carencia de ningún aminoácido, comportándose similar a las demás microalgas analizadas (Brown *et al.*, 1989). Brown *et al.* (1997) menciona que el valor nutricional de una microalga es considerado alto cuando su composición de aminoácidos esenciales es cercana a la del animal que se alimenta de esta. Por lo anterior, es importante realizar estudios más detallados de la composición bioquímica del alimento y de los organismos alimentados.

Sobrevivencia después de la metamorfosis

Las larvas alimentadas con la dieta RI se desarrollaron satisfactoriamente y sobrellevaron los cambios morfofisiológicos al final del desarrollo larvario con éxito. El valor nutricional de *Isochrysis galbana* es bajo si se usa como alimento único para larvas equinoplutei de *Loxechinus albus*, *Paracentrotus lividus* y *Arbacia lixula*, (Bustos *et al.*, 1991; Pedrotti y Fenaux, 1993); sin embargo, esta microalga presenta un contenido rico de ácidos grasos y aminoácidos que la hacen utilizable como alimento complementario de organismos marinos (Hinegardner, 1969; González *et al.*, 1987; Whyte, 1987; Volkman *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1998).

La adición de 30% de *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-Iso) al 70% de *Rhodomonas* sp resultó de alto valor alimenticio para los organismos, tanto para su desarrollo larvario (26 días), como para tener éxito en la metamorfosis (6.6%), proporcionando la mayor cantidad de juveniles. Salas-Garza y Parés-Sierra (2000), usaron una proporción de 50-50% de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis galbana* como alimento para larvas de *S. purpuratus*. Ellos basaron la dieta en número de células y no en el peso orgánico seco. Asumiendo que las microalgas que ellos utilizaron presentaron la misma cantidad de materia orgánica que las utilizadas en el presente estudio, la dieta proporcionada por los autores contenía una proporción aproximada de 85-15% de *Rhodomonas* sp e *Isochrysis galbana* respectivamente. Los autores mencionan que la dieta mixta no proporcionó tantos

juveniles como la dieta monoalgal compuesta por *Rhodomonas* sp; sin embargo, si se aplica el porcentaje de sobrevivencia a la metamorfosis al porcentaje de sobrevivencia larvaria, se puede concluir que ambas dietas hubieran proporcionado cantidades similares de juveniles, en porcentajes cercanos al 35%. Las diferencias entre el presente trabajo y el publicado por Salas-Garza y Parés-Sierra (2000), pueden explicarse por la cantidad de material orgánico disponible como alimento para las larvas. Los autores, al proporcionar las dietas con base en el número de células, ofrecieron mayor cantidad de alimento a las larvas que fueron alimentadas con *Rhodomonas* sp, por lo que, posiblemente, se produjeron sobrevivencias similares con ambas.

Es importante hacer notar la variación que presentó la dieta RC. Se encontró que en este tratamiento una réplica no se comportó de forma similar a las otras dos. Presentó una sobrevivencia elevada que superó por mucho a la sobrevivencia de las otras dos réplicas (Figura 15). Esta variación no tuvo una explicación evidente. No se encontró algún factor que halla provocado mortalidad de poslarvas de forma distinta en las réplicas. Por lo anterior, se consideró que las diferencias entre réplicas se deben a variaciones aleatorias propias del tratamiento.

Como se mencionó anteriormente, la microalga *Chaetoceros muelleri* no satisfizo los requerimientos nutricionales de las larvas. De las dietas que contenían en mayor proporción o bien únicamente esta microalga, solo la dieta CR proporcionó los nutrientes necesarios para la finalización del desarrollo

larvario. A pesar de que CR proporcionó mejor sobrevivencia larvaria que la dieta R, no satisfizo los requerimientos necesarios para que las larvas sobrellevaran el desgastante proceso de metamorfosis. Las considerables sobrevivencias larvianas positivas propiciadas por CR, se debieron posiblemente a las características nutritivas de la microalga *Rhodomonas* sp.

No fue posible encontrar, dentro de los datos de contenido bioquímico de las larvas, algún elemento que pueda explicar el bajo porcentaje de sobrevivencia a la metamorfosis de larvas alimentadas con la dieta CR. Las proteínas y los lípidos son la fuente de energía primaria de muchos invertebrados marinos (George *et al.*, 1990) y aunque no hubo diferencias en el contenido proteico de larvas, las alimentadas con CR presentaron el mayor porcentaje de proteínas (Figura 10). Finalmente se puede asegurar que la dieta CR no ofreció los componentes requeridos por las larvas durante el proceso de la metamorfosis, ya que únicamente cerca del 10% de las larvas inducidas completaron el proceso.

A pesar de que la microalga *C. muelleri* no fue efectiva como único alimento para larvas de *S. purpuratus*, cuando fue complemento de la microalga *Rhodomonas* sp (RC), proporcionó resultados favorables. La dieta RC resultó ser la segunda mejor dieta para el desarrollo de larvas (sólo superada por la dieta RI; Figura 3). Además, con RC se observaron los mejores porcentajes de sobrevivencia a los 10 y a los 20 días de la inducción a la metamorfosis. Por otro lado, a pesar de la deficiente sobrevivencia larvaria que propició la dieta R, su uso proporcionó mayor éxito en el proceso de la metamorfosis que las dietas RI y CR

(sólo superada por RC; Figura 15). Aunque la mayoría de los autores se refieren únicamente a la sobrevivencia en el desarrollo larvario, la efectividad que el uso de la microalga *Rhodomonas* sp representa como alimento para larvas de erizo, ya ha sido reportada (Cameron y Hinegardner, 1974; Martínez-López, 1994; Emlet, 2000).

El cálculo para conocer el porcentaje hipotético de juveniles obtenidos fue de gran utilidad para establecer las diferencias finales entre los efectos de las dietas. Por medio de este cálculo se visualizaron diferencias que no habían sido mostradas con los resultados de sobrevivencia a la metamorfosis de larvas de *S. purpuratus*. La dieta RI aportó los mejores resultados en la sobrevivencia al desarrollo larvario; después, los organismos alimentados con esta dieta presentaron un porcentaje de sobrevivencia a la metamorfosis de 27.5%, ubicándose por debajo de RC, 38.1% y de R, 33.5%. Estos resultados pueden ser valorados equivocadamente si no se observa el cálculo del porcentaje hipotético de juveniles obtenidos (Tabla V). La dieta RI pudo haber proporcionado más juveniles que ninguna otra dieta (6.6%), aún más que la dieta RC (4.9%), que proporcionó el porcentaje más alto de sobrevivencia a la metamorfosis.

Los requerimientos dietéticos durante la vida de una larva pueden cambiar (Pedrotti y Fenaux, 1993). Los resultados encontrados en este trabajo sugieren que las distintas dietas microalgales afectaron de diferente forma a las larvas de *S. purpuratus*. Se confirma la hipótesis que expone que el alimento que resulta efectivo para el desarrollo larvario, puede no servirle al organismo para

sobrellevar el proceso de metamorfosis o viceversa. Esto es importante para fines acuaculturales, ya que del éxito obtenido en el proceso de la metamorfosis dependerá el número de juveniles que se obtengan. Por lo anterior, el efecto de cualquier dieta para larvas de erizo debe ser observado tanto en el desarrollo larvario, como en el proceso de metamorfosis y finalmente en la obtención de juveniles.

CONCLUSIONES

- De las dietas probadas, R1 satisfizo mayormente los requerimientos nutricionales de larvas de *S. purpuratus*, ya que proporcionó los mejores resultados de sobrevivencia larvaria y obtención de juveniles.

- La microalga *C. muelleri* no es un buen alimento para larvas de *S. purpuratus* si se usa como única fuente de alimentación. Sin embargo, si esta microalga se usa como complemento de *Rhodomonas* sp en una proporción de 70-30%, puede ser un alimento que proporcione sobrevivencias altas, tanto en el desarrollo larvario como en el éxito a la metamorfosis.

- El alimento que cubre los requerimientos alimenticios en estadios larvarios, puede no ser el más adecuado para sobrellevar el proceso de metamorfosis.

- La composición bioquímica del alimento (principalmente proteínas) influyó y modificó la composición de las larvas de *S. purpuratus*. Las larvas que registraron mayor cantidad de proteínas, crecieron más, sobrevivieron más y fueron alimentadas con microalgas de alto contenido proteico (*Rhodomonas* sp).

BIBLIOGRAFÍA

- Bligh, E.G. y W.J. Dyer, 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol*, 37:911-917.
- Boidron-Métairon, I.F., 1995. Larval nutrition. En: *Ecology of marine invertebrate larvae*. McEdward L.R. Ed. CRC Press, Florida. 223-248.
- Brown, M.R., M.A. McCausland y K. Kowalski, 1998. The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture*, 165:281-293.
- Brown, M.R., C.D. Garland, S.W. Jeffrey, I.D. Jameson y J.M. Leroy, 1993. The gross and amino acid composition of batch and semi-continuous culture of *Isochrysis* sp (Clone T-Iso), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology* 5:285-296.
- Brown, M.R., S.W. Jeffrey, J.K. Volkman y G.A. Dunstan, 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151:315-331.
- Brown, M.R., S.W. Jeffrey, J.K. y C.D. Garland, 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; A literature review. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Marine Laboratories, Report 205.
- Bustos, R., C. Godoy, S. Olave y R. Troncoso, 1991. Desarrollo de técnicas de producción de semillas y repoblamiento de recursos bentónicos, Parte 1. Investigaciones en el erizo chileno *Loxechinus albus* (Molina, 1782). Instituto de Fomento Pesquero, Chile, PNUD. Impresos XIMPAUSER. pp 1-60.

- Bustos, E. y S. Olave, 2001. Manual: El cultivo del erizo (*Loxechinus albus*). Instituto de Fomento pesquero, Chile. 22 pp.
- Caers, M., P. Couteau, P. Lombeida y P. Sorgeloos, 1998. The effect of lipid supplementation on growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* spat. *Aquaculture* 162, 287-299.
- Cameron, R.A. y R.T. Hinegardner, 1974. Initiation of metamorphosis in laboratory cultured sea urchins. *Biol. Bull.*, 146: 335-342.
- Cameron, R.A. y S.C. Schroeter, 1980. Sea urchin recruitment: effect of substrate selection on juvenile distribution. *Marine Ecology Prog. Ser.* 2: 243-247.
- Cerón, A.N., 2000. Evaluación de tres mezclas de microalgas sobre el crecimiento de la almeja mano de león *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus*. Tesis Maestría CICESE. 87 pp.
- Colby, J., 1979. Larval development in the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* and the sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*. Report of Bodega Marine Laboratory and Santa Cruz University. No publicado.
- Cordero, B. y D. Voltolina, 1994. Growth of *Mytilus galloprovincialis* fed with four microalgae and two feeding regimes. *Journal of World Aquaculture Society*. 25 (3):471-474.
- D'Souza, F.M.L. y G.J. Kelly, 2000. Effects of a diet of a nitrogen-limited alga (*Tetraselmis suecica*) on growth, survival and biochemical composition of tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) larvae. *Aquaculture* 181:311-329.

- De Jong-Westman, M., P.Y. Qian, B.E. March y T.H. Carefoot, 1995. Artificial diets in sea urchin culture: Effects of dietary protein level and other additives on egg quality, larval morphometrics, and larval survival in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. Canadian Journal of Zoology, 73(11):2080-2090.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith, 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Analytical Chemistry, 28:350-356.
- Emlet, R.B., 2000. Nutrition links size, developmental and rates of larvae and newly metamorphosed juveniles. Larval 2000 program. Larval Biology Meetings. University of California Santa Cruz.
- Enright, C.T., F.G. Newkirk, J.S. Craigie y J.D. Castel, 1986. Evaluation of phytoplankton as diet for juvenile *Ostrea edulis* L. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 96 1-13.
- Farías, A., I. Uriarte y J.C. Castilla, 1998. A biochemical study of the larval and postlarval stages of the chilean scallop *Argopecten purpuratus*. Aquaculture 166:37-47.
- Fenaux, L., 1982. Larval nutrition, in Echinoderm Nutrition, Jangoux, M. and Lawrence, J. M., Eds., A.A. Balkema, Rotterdam, 479-489.
- Fernández-Reiriz, M. J., A. Pérez-Camacho, M.J. Ferreiro, J. Blanco, M. Planas, M.J. Campos y U. Labarta, 1989. Biomass production and variation in the

- biochemical profile (Total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83:17-37.
- Ferreiro, M.J., A. Pérez-Camacho, U. Labarta, R. Beiras, M. Planas y M.J. Fernández-Reiriz, 1990. Changes in the biochemical composition of *Ostrea edulis* larvae fed on different food regimes. *Marine Biology* 106:395-401.
- George, S.B., C. Cellario y L. Fenaux, 1990. Population differences in egg quality of *Arbacia lixula* (Echinodermata: Echinoidea). *International Journal of invertebrate Reproduction and Development*, 17:111-121.
- González, L.P., J.C. Castilla y C. Guisado, 1987. Effect on the larval diet and rearing temperature on metamorphosis and juvenile survival of the edible sea urchin *Loxechinus albus* (Molina, 1782) (Echinoidea:Echinodae). *J. Shellfish Research*. 6(2):109-115.
- Gosselin, P. y M. Jangoux, 1998. From competent larva to exotrophic juvenile: a morphofunctional study of the perimetamorphic period of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Zoomorphology* 118:31-43.
- Guillard, R.L.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates animals. p 29-60. En culture of marine invertebrates animals. Smith, W.L. y M.H. Chanley (Eds). Plenum Publishing Corp., New York, 338 pp.
- Hagen, N.T., 1996. Echinoculture: from fishery enhancement to closed cycle cultivation. *World Aquaculture* 7-19 pp.

- Hart, M.W. y R.R. Strathmann, 1994. Functional consequences of phenotypic plasticity in echinoid larvae. Biol. Bull. Mar biol Lab, Woods Hole 186:291-299.
- Hinegardner, R., 1975. Care and Handling of sea urchin eggs, embryos and adults (principally north american species). p 10-25. En, The sea urchin embryo, biochemistry and morphogenesis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1975. 700 pp.
- Hinegardner, R.T., 1969. Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. Biol. Bull. 137: 465-475.
- His, E. y D. Maurer, 1988. Shell growth and gross biochemical composition of *Cassostrea gigas* larvae in the natural environment. Aquaculture 69:185-194.
- Kelly, M.S., A.J. Hunter, C.L. Scholfield y J.D. McKenzie, 2000. Morphology and survivorship of larval *Psammechinus militaris* (Gmelin) (Echinodermata: Echinoidea) in response to varying food quantity and quality. Aquaculture 183:223-240.
- Kitamura, H., S. Kitahara y H.B. Koh, 1994. Induction of larval settlement and metamorphosis in the sea urchins *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocardaris crassispina* by fatty acids. Fisheries Science, 60(3), 311-313
- Lafarga, F., 1997. Relación entre el consumo de nutrientes y los cambios en la composición bioquímica de *Rhodomonas* sp cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Tesis Licenciatura. FCM. UABC. Ensenada, Baja California. 50 pp.

- Lafarga, F., 2000. Interacción entre luz, consumo de nutrientes, composición celular y producción de *Rhodomonas* sp en cultivos estáticos. Tesis Maestría. FCM. UABC. Ensenada, Baja California. 132 pp.
- Langdon, C.J. y M.J. Waldock, 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acids composition of *Cassostrea gigas* spat. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 61:431-448.
- Leonardos, N. y I.A.N. Lucas, 2000. The nutritional value of algae grown under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. larvae. Aquaculture 182:301-315.
- López, J.A., M.C. Báez y N. Huerta. 1995. Manual de técnicas analíticas aplicadas al cultivo de microalgas. Universidad de Sonora, Public. Academ. CICTUS. No. 5. 47 pp.
- Lowry, H.O., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Biological Chemistry, 193:265-275.
- Mann, R. y S.M. Gallager, 1985. Physiological and biochemical energetics of larvae of *Teredo navalis* L. and *Bankia gouldi* (Bartsch) (Bivalvia: Teredinidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 85:211-228.
- Martínez-López, R.E., 1994. Descripción del desarrollo larvario en el erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* (Echinoidea: Echinodermata) y efectos de la densidad, ración alimenticia y cambios de agua. Tesis Licenciatura. FCM. UABC. Ensenada, Baja California. 52 pp.

- McCausland, M.A., M.R. Brown, S.M. Barrett, J.A. Demiar y M.P. Heasman, 1999. Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Cassostrea gigas*). *Aquaculture* 174:323-342.
- Meidel S.K., R.E. Sheibling y A. Metaxas, 1999. Relative importance of parental and larvas nutrition on larval development and metamorphosis of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 240:161-178.
- Metaxas, A. y C.M. Young, 1998a. Responses of echinoid larvae to food patches of different algal densities. *Mar. Biol.* 130:433-445.
- Metaxas, A. y C.M. Young, 1998b. Behaviour of echinoid larvae around sharp haloclines: effects of the salinity gradient and dietary conditioning. *Mar. Biol.* 131:443-459.
- Miller, B.A. y R.B. Emlet, 1999. Development of newly metamorphosed juvenile sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. purpuratus*): morphology, the effects of temperature and larval food ration, and a method for determining age. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 235:67-90.
- Núñez-Cabrero, F., 1994. Efecto de las diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo en la calidad celular de *Chaetoceros muelleri* (Lemmerman) Bacillariophyceae en cultivos estáticos. Tesis Licenciatura. FCM. UABC. Ensenada, Baja California. 36 pp

- Ostroff, C.R., E.O. Karlander y S.D. Van Valkenburg, 1980. Growth rates of *Pseudopedinella pyriforme* (Chrysophyceae) in response to 75 combinations of light, temperature and salinity. J. Phycol. 16:421-423.
- Palleiro-Nayar, J.S., 1994. Pesquería de erizo rojo en Baja California, temporada 92-93. En Memorias del X Simposium Internacional de Biología Marina. 13-17 junio 1994; Ensenada, B.C., México. Universidad Autónoma de Baja California, Southern California Marine Institute y Universidad Autónoma de Baja California Sur. 161 pp.
- Pande, S.V., R. Parvin Khan y T.A. Venkitasubramanian, 1963. Microdetermination of lipid and serum total fatty acid. Analyt. Biochem. 6:415-423.
- Pearce, C.M. y R.E. Sheibling, 1994. Induction of metamorphosis of larval echinoids ("*Strongylocentrotus droebachiensis*" and "*Echinarachinus parma*") by potassium chloride KCl. Inv Rep. and Dev. 26:213-220.
- Pedrotti, M.L. y L. Fenaux, 1993. Effects of food diet on the survival, development and growth rates of two cultured echinoplutei (*Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*). Invertebrate Reproduction and Development, 24:59-70.
- Pedrotti, M. L. y R. Lemée, 1999. Effect of microalgae treated with natural toxins on the nutrition and development of filter-feeding sea-urchin larvae. Marine Environment Research 48:177-192.
- Pedrotti, M.L., 1995. Food selection (size and flavor) during development of echinoderm larvae. Invertebrate Reproduction and Development 27:29-39.

- Pillsbury, K.S., 1985. The relative food value and biochemical composition of five phytoplankton diets for queen conch, *Strombus gigas* (Linne) larvae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 90:221-231.
- Preciado, M., 2000. KCl, GABA y L-glutamina como inductores a la metamorfosis en larvas del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*. Tesis Maestría. FCM. UABC. Ensenada, Baja California. 51 pp
- Quintana-Rodríguez, R., 1999. Relación óvulo: espermatozoides en la fertilización de gametos de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* (AGASSIZ, 1863). Tesis Licenciatura. FCM. UABC. Ensenada, Baja California. 31 pp
- Ramírez, E. A., 1997. La concesión para explotación pesquera y su efecto en el erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*, A. Agassiz, 1863) en el área de Santo Tomás a Punta China, Baja California. Tesis Maestría. FCM. UABC. Ensenada, Baja California. 102 pp
- Rassoulzaedgan, F., L. Fenaux y R.R. Strathmann, 1984. Effect of flavor and size on selection of food by suspension-feeding plutei. Limnol. Oceanogr. 29:357-361.
- Rassoulzaedgan, F. y L. Fenaux, 1979. Grazing of echinoderm larvae (*Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*) on naturally occurring particulate matter. J. Plankton Res. 1:215-223.
- Renaud, S.M., L.V. Thinh y D.L. Parry, 1998. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for posible use in mariculture. Aquaculture 170:147-159.

- Rogers-Bennett, L., H.C. Fasteneau, T. Hibbard-Robbins, Z. Kain y C.M. Dewees, 1994. Culturing red sea urchins for experimental outplanting in Northern California. Final report of Bodega Marine Laboratory and Santa Cruz University. No publicado.
- Saito, K., K. Yamashita, K. Tajima, A. Obara, Y. Nishihama, M. Sawasaki, K. Kawamata y K. Kawamura, 1985. Manual of artificial seed production of sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius*. Hokkaido Inst. Maricult. 22 p.
- Salas-Garza, A. y G. Parés-Sierra, 2000. Dietary treatments in the development of purple sea urchin larvae *Strongylocentrotus* and their impact on metamorphosis. Larval 2000 program. Larval Biology Meetings. University of California Santa Cruz.
- Santiago, S.M.E., 1996. Calidad bacteriológica en un sistema de cultivo durante los estadios larvario y postlarvario del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*). Tesis Licenciatura. FCM. UABC. Ensenada, Baja California. 70 pp.
- SEMARNAP, 1998. Capturas de erizo morado por zona de pesca. Periodo 1994-95 a 1997-98. Centro Regional de Investigaciones Pesqueras de Ensenada.
- Sheltema, R.S., 1974. Biological interactions determining larval settle of marine invertebrates. *Thalassia Jugosl.* 110:263-296.
- Sorokin, C., 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343. En: Stein, J.R. (Ed): Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement. Cambridge University Press, Cambridge.

- Steel, R.G. y J.H. Torrie, 1986. Bioestadística: principios y procedimientos. 2da edición. McGraw-Hill. 622 pp.
- Strathmann, M.F., 1987. "Phylum Echinodermata, Class Echinoidea", en *Reproduction and development of marine invertebrates of the Northern Pacific Coast*. University of Washington Press. Seattle, Washington. 670 pp.
- Strathmann, R.R., 1971. The feeding behavior of planktotrophic larvae: mechanisms, regulation and rates of suspension-feeding. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 6:109-160
- Strathmann, R.R., 1975. Larval feeding in echinoderms. *Amer. Zool.* 15:717-730.
- Strathmann, R.R., 1978. Larval settlement in echinoderms. En: Chia F.S. y M.E. Rice (eds) *Settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae*. Elsevier-North Holland. New York, pp 235-246.
- Valenzuela-Espinoza, E., 1997. Uso de un medio alternativo al f/2 para el cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso). Tesis Maestría. FCM. UABC. Ensenada, Baja California. 51 pp.
- Volkman, J.K., S.W. Jeffrey, P.D. Nichols, G.I. Rogers y C.D. Garland, 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128:219-240.
- Whyte, J.N.C., N. Bourne y C.A. Hodgson, 1987. Assessment of biochemical composition and energy reserves in larvae of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 113:113-124.

- Whyte, J.N.C., N. Bourne, N.G. Ginther y C.A. Hodgson, 1992. Compositional changes in the larva to juvenile development of the scallop *Crassadoma gigantea* (Gray). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 163:13-29.
- Whyte, J.N.C., 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. Aquaculture, 60:231-241
- Yazaki, I., 1995. Quantitative analysis of metamorphosis induced by L-Glutamine in embryos of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* Zoological Science 12:105-112.
- Yazaki, I. y H. Harashima, 1994. Induction of metamorphosis in the sea urchin, *Pseudocentrotus depressus*, using L-Glutamine. Zoological Science 11:253-260.
- Yokota, Y., 2000. Sea urchin fishery in Japan. Sea urchin Aquaculture Workshop. Text book. International Marine Centre. Torregrande, Cerdeña, Italia.
- Zar, J. H., 1984. Biostatistical analysis, 2da edition. Prentice Hall, New Jersey. 652 pp.
- Zimmerman, K.M. y J.A. Pechenik, 1991. How do temperature and salinity affect relative rates of growth, morphological differentiation, and time to metamorphic competence in larvae of the marine gastropod *Crepidula plana*?. Biol. Bull. 180:372-386.

ANEXO 1.- Composición bioquímica de los géneros *Rhodomonas*, *Isochrysis* y *Chaetoceros* por diversos autores.

Especie de Microalga	Autor	Observaciones	% de Carbohidratos	% de Lípidos	% de Proteínas	% de Cenizas
<i>Rhodomonas</i> sp	Trabajo presente	Fase exp; medio f/2	13.10	17.70	45.40	29.70
<i>Rhodomonas</i> sp	Lafarga, 2000	Fase exp; medio f/2	18.30	12.70	21.00	47.80
<i>Rhodomonas</i> sp	Fernández-Reiriz <i>et al.</i> , 1989	Fase exp; medio Walne	12.60	27.86	16.50	49.33
<i>Rhodomonas</i> sp	Ferreiro <i>et al.</i> , 1990		1.42	11.91	4.15	
<i>Rhodomonas salina</i>	McCausland, 1999	Medio f _E	19.00	19.00	59.00	10.00
<i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (T-Iso)	Trabajo presente	Fase exp; medio f/2	10.60	21.30	35.80	30.50
<i>Isochrysis galbana</i> (T-Iso)	Whyte, 1987	Fase exp		25.06	33.44	
<i>Isochrysis</i> sp (T-Iso)	McCausland, 1999	medio f/2	30.00	24.00	34.00	13.00
<i>Isochrysis galbana</i>	Fernández-Reiriz <i>et al.</i> , 1989	Fase exp; medio f/2	15.21	28.60	39.97	49.01
<i>Isochrysis</i> sp	Cerón, 2000	Fase exp; medio f/2	10.00	11.62	23.70	
<i>Chaetoceros muelleri</i>	Trabajo presente	Fase exp; medio f/2	7.50	22.60	33.80	33.40
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	Cerón, 2000	Fase exp; medio f/2	9.00	14.37	23.36	
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	Fernández-Reiriz <i>et al.</i> , 1989	Fase exp; medio f/2	2.42	11.76	2.60	69.33
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	McCausland, 1999	medio f/2	23.00	19.00	47.00	23.00