

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCANOLOGICAS



"EFECTO DE LA MATERIA ORGANICA DISUELTA EN EL CRECIMIENTO, SOBREVIVENCIA Y METABOLISMO DE LAS LARVAS DE ABULON ROJO, *Haliotis rufescens*".



**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**O C E A N O L O G O**  
**PRESENTA:**  
**GERARDO AMADOR CANO**


Ensenada Baja California, Junio 1988

" EFECTO DE LA MATERIA ORGANICA DISUELTA EN EL CRECIMIENTO, SOBREVIVENCIA Y METABOLISMO DE LAS LARVAS DE ABULON ROJO, *Haliotis rufescens*".

T E S I S  
QUE PRESENTA:  
GERARDO AMADOR CANO

Aprobada por:

  
-----  
Presidente del Jurado.  
M.C. Zaúl García Esquivel.

  
-----  
Sinodal Propietario.  
M.C. Lewis Samson McAnally Salas

  
-----  
Sinodal Propietario.  
M.C. Antonio Silva Loera.

## RESUMEN

Se evaluó el efecto de la adición de glucosa y aminoácidos esenciales sobre el crecimiento, sobrevivencia, tasas metabólicas ( $VO_2$ ) y reservas energéticas del abulón rojo *Haliotis rufescens* durante su desarrollo larval. Los tratamientos de prueba fueron 1) un control de agua de mar cruda, 2) agua de mar mas glucosa a concentracion final  $7 \mu M$ , 3) agua de mar mas mezcla de 10 aminoácidos esenciales en concentraciones equimolares de  $7 \mu M$  y 4) agua de mar mas mezcla de glucosa-aminoácidos. Se realizó una prueba preliminar (PRE) en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC en abril de 1997, con agua de mar sintética en lugar del agua de mar cruda. Se realizaron, además, dos pruebas experimentales (AQUAM1 y AQUAM2) en la planta de cultivo de abulón Aquam Internacional entre julio y agosto de 1997. No se detectó un crecimiento significativo de las larvas en la corrida PRE, pero el tratamiento con aminoácidos resultó en mayor  $VO_2$  ( $179.5 \mu mol O_2/h/g$  tejido) que el tratamiento con glucosa o el control ( $81.4$  y  $74.1 \mu mol O_2/h/g$  tejido, respectivamente). En AQUAM1 las larvas aumentaron significativamente de talla al final del período larval (desde  $269$  hasta aprox.  $273 \mu m$ ), pero no se detectaron diferencias entre los tratamientos de prueba en relación al peso orgánico, sobrevivencia, tasa metabólica o contenido de lípidos y proteínas. En AQUAM2 se observó una disminución significativa del contenido de lípidos de todos los tratamientos ( $0.165$  a  $0.184 \mu g/larva$ ) con respecto al valor inicial ( $0.226 \mu g/larva$ ) y un aumento en la talla (de  $270$  hasta aprox.  $275 \mu m$ ), con excepción del tratamiento con aminoácidos. El resto de las variables no cambió. Se sugiere que las larvas de abulón utilizan para su desarrollo la materia orgánica disuelta presente en el agua de mar, pero las concentraciones de nutrientes adicionados no fueron las suficientes para aumentar significativamente las reservas endógenas de los organismos. Se observó además un ligero efecto negativo de los tratamientos que contenían aminoácidos, por lo que se sugiere la adición de estos modificaron la calidad química del agua.

Dedicada a Tech y Fallo

## AGRADECIMIENTOS

A la universidad autónoma de Baja California, a la facultad de Ciencias Marinas y al Instituto de investigaciones Oceanológicas por las facilidades prestadas para la realización de esta proyecto.

A la granja abulonera Aquam Internacional y a todo su personal, por el gran apoyo y amable cooperación durante el desarrollo experimental de este trabajo.

A los proyectos UABC 4047 y 4078, así como a los proyectos CONACYT 1925PB y 4023PB, por el apoyo económico recibido.

A mi director de Tesis M. C. Zaúl García Esquivel, por su gran apoyo e infinita paciencia. No pude caer en mejores manos.

A mis Sinodales MC Antonio Silva Loera y OC Lewis Samson McAnally Salas, por su comprensión y apoyo.

A la Dra. Ma. Teresa Viana y al Dr. Ricardo Searcy por su acertada guía y gran ayuda.

A la Generación "Guamos". Yada, Israel, Marco, Bule, Dahren y Faustus. Ya solo faltan dos!

A la bola de palurdos: ustedes saben a quien me refiero (DFC).

A mis hermanos: Fallo, Mauricio y paco. Por que no importa ni el espacio ni el tiempo, siempre estarán conmigo.

A mi novia, sin ti nunca lo hubiera conseguido.

## INDICE

<b>I. INTRODUCCION</b> .....	1
1.1 Antecedentes .....	5
1.2 Objetivo .....	7
<b>II. METODOLOGIA</b> .....	8
2.1 Condiciones generales de cultivo .....	8
2.2 Diseño experimental .....	9
2.3 Enumeración de variables.....	12
2.4 Análisis estadístico .....	14
<b>III. RESULTADOS</b> .....	15
3.1 Talla.....	15
3.2 Peso orgánico .....	19
3.3 Supervivencia .....	19
3.4 Consumo de oxígeno por individuo .....	22
3.5 Consumo de oxígeno por unidad de peso. ....	24
3.6 Lípidos totales .....	26
3.7 Porcentaje de lípidos por unidad de peso .....	29
3.8 Proteínas totales .....	29
3.9 Porcentaje de proteínas por unidad de peso .....	31
<b>IV. DISCUSION</b> .....	33
4.1 Relevancia estadística de los resultados .....	33
4.2 Crecimiento y acumulación / utilización de reservas .....	34
4.3 Influencia de la MOD adicionada .....	37
4.4 Supervivencia .....	39
4.5 Tasa metabólica .....	40
4.6 Prueba preliminar .....	42
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	44
<b>VI. RECOMENDACIONES</b> .....	44
<b>VII. LITERATURA CITADA</b> .....	45
ANEXO .....	42

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Lista de aminoácidos empleados y sus cantidades para un volumen de 8 litros.....	11
--	----

**Tabla 2.** Promedios o medianas para cada tratamiento de todas las variables utilizadas en la corrida PRE. También se presentan los valores de los estadísticos de prueba ANOVA paramétrica y no paramétrica según el caso, y los grados de libertad (gl). Las letras comunes indican que no hay diferencia significativa entre tratamientos, después de aplicar la prueba de comparaciones múltiples de SNK..... 15

**Tabla 3.** Promedios o medianas para cada tratamiento de todas las variables utilizadas en la corrida AQUAM1. También se presentan los valores de los estadísticos de prueba ANOVA paramétrica y no paramétrica según el caso, y los grados de libertad (gl). Las letras comunes indican que no hay diferencia significativa entre tratamientos, después de aplicar la prueba de comparaciones múltiples de SNK..... 16

**Tabla 4.** Promedios o medianas para cada tratamiento de todas las variables utilizadas en la corrida AQUAM2. También se presentan los valores de los estadísticos de prueba ANOVA paramétrica y no paramétrica según el caso, y los grados de libertad (gl). Las letras comunes indican que no hay diferencia significativa entre tratamientos, después de aplicar la prueba de comparaciones múltiples de SNK..... 18

## LISTA DE FIGURAS

**Fig. 1.** Comparación de talla promedio de larvas de abulón sometidas a distintos nutrimentos en tres corridas distintas. (INI) = valores iniciales; controles: (AC) agua cruda y (AS) agua sintética; y tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estándar..... 17

**Fig. 2.** Comparación de peso orgánico promedio de larvas de abulón sometidas a distintos nutrimentos en tres corridas distintas. (INI) = valores iniciales; controles: (AC) agua cruda y (AS) agua sintética; y tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estándar ..... 20

**Fig. 3.** Comparación de sobrevivencia promedio de larvas de abulón sometidas a distintos nutrimentos en dos corridas distintas. (INI) = valores iniciales; control: (AC) agua cruda; y tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estándar ..... 21

**Fig. 4.** Comparación de consumo de oxígeno promedio de larvas de abulón sometidas a distintos nutrimentos en tres corridas distintas. (INI) = valores iniciales; controles: (AC) agua cruda y (AS) agua sintética; y tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estándar ..... 23

**Fig 5.** Comparación de consumo de oxígeno promedio por gramo de tejido de larvas de abulón sometidas a distintos nutrimentos en tres corridas distintas. (INI) = valores iniciales; controles: (AC) agua cruda y (AS) agua sintética; y tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estándar..... 25

**Fig. 6.** Comparación de promedio de lípidos totales de larvas de abulón sometidas a distintos nutrimentos en dos corridas distintas. (INI) = valores iniciales; controles: (AC) agua cruda tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estándar ..... 27

**Fig.7.** Comparación de promedio de porcentaje de lípidos totales referido al peso orgánico de larvas de abulón sometidas a distintos nutrimentos en dos corridas distintas. (INI) = valores iniciales; controles: (AC) agua cruda y tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estándar ..... 28

**Fig. 8.** Comparación de promedio de proteínas totales de larvas de abulón sometidas a distintos nutrimentos en dos corridas distintas. (INI) = valores iniciales; controles: (AC) agua cruda y tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estándar ..... 30

**Fig. 9.** Comparación de promedio de porcentaje de proteínas totales referido al peso orgánico de larvas de abulón sometidas a distintos nutrimentos en dos corridas distintas. (INI) = valores iniciales; controles: (AC) agua cruda y tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estándar ..... 30

## I. INTRODUCCION.

Existen aproximadamente 100 especies de abulón en el mundo habitando en niveles de profundidad que van desde la línea de marea baja, hasta 30 metros bajo el agua. Viven sobre o bajo las rocas y entre mantos de algas, las cuales son su principal fuente de alimento. El nombre genérico *Haliotis*, significa "oreja de mar", y le fue otorgado por Linnaeus en 1758. Todos los miembros de la familia Haliotidae se ven como abulones típicos y poseen conchas aplastadas en forma de oreja con perforaciones (Bevelander, 1988). Su distribución comprende los dos hemisferios, y las especies mas grandes se encuentran en las regiones templadas, las mas pequeñas en las regiones tropicales y árticas. El mayor número de especies se encuentra en el Pacífico Central y en el Pacífico Sur, y parte de ellas se encuentran también en el Océano Indico, pero ninguna es de gran tamaño (Hahn, 1989). Siete de estas especies se encuentran en Norteamérica, dentro de las cuales destaca el abulón rojo (*Haliotis rufescens*) (Hooker y Morse, 1985), que alcanza la mayor longitud dentro del género (hasta 30 cm). Además, en el mercado llega a ser muy bien cotizado y la demanda está por arriba de la oferta en países como Japón, China y Estados Unidos (McBride, 1997). Esta especie es la mas importante en la pesquería comercial estadounidense, debido a su gran tamaño y a que se distribuye a todo lo largo de la costa del estado de California. El abulón rojo se encuentra en tres regiones, las cuales varían considerablemente en su disponibilidad de alimento, depredadores y características físicas de su hábitat, factores que afectan la estructura de la población, el crecimiento, la reproducción y

su conducta (Tegner *et al.*, 1992). Por lo anterior y por cambios sociales y prácticas modernas en la administración del recurso, aunado a los efectos de El Niño (1982-1984) que deterioraron la base alimenticia, las poblaciones de abulón rojo declinaron en 1985 un 97% en cuatro de las islas Channel de California (Davis *et al.*, 1992).

El cultivo de abulón es una actividad en plena expansión a nivel mundial, tarea que se encuentra apoyada por varias décadas de investigación en aspectos como biología, ecología, nutrición y diseño de sistemas (Fleming y Hone, 1996). Debido a la sobreexplotación a que ha sido sometido el abulón, y debido también a la merma en sus poblaciones ocasionada por factores climáticos, en México se consideró la acuacultura como una alternativa. A partir de 1984 iniciaron operaciones las dos primeras granjas de producción de semilla, la cual se destinaría al repoblamiento de los bancos naturales. Los laboratorios comerciales y/o granjas de abulón, que operan en Bahía Tortugas, La Bocana y Punta Eugenia en Baja California Sur, tenían hasta 1992 mortalidades superiores al 99% durante la metamorfosis y los días posteriores a esta. También hasta ese año su producción anual promedio había sido muy baja, de 7 000 a 20 000 juveniles por laboratorio, a pesar de que algunos de estos tenían entre cinco y hasta diez años en operación (Salas-Garza y Searcy-Bernal, 1992). Las únicas dos granjas de abulón que operan actualmente a escala comercial en la producción de semilla de este molusco, son privadas y se encuentran ubicadas en el Ejido Eréndira, Baja California Norte. Una de las causas principales que han limitado el crecimiento de

estas empresas, son las grandes mortalidades que se presentan en los estadios tempranos de estos organismos (Endo R, com. pers. Aquam Internacional. S A).

El abulón *Haliotis* spp es un molusco marino que inicia su ciclo de vida con la fertilización externa de los óvulos y una posterior eclosión a larva lecitotrófica planctónica, para después empezar su proceso de asentamiento al fondo marino donde se dará lugar la metamorfosis y así, iniciar su fase bentónica (Salas, 1995).

La etapa larvaria del abulón dura, por lo general, de cinco a ocho días dependiendo de la temperatura a la cual se desarrolla, y la sobrevivencia puede llegar a ser hasta del 90%. Sin embargo, en la transición de larva véliger a juvenil bentónico, la sobrevivencia puede disminuir a menos del 10% (Ebert y Houk, 1984). Las causas de la mortalidad en esta etapa pueden ser diversas, sin embargo, Imai (1967), atribuye la alta mortalidad que se observa durante y posterior al asentamiento, a problemas relacionados con una deficiente nutrición.

Esta deficiencia nutricional se ha asociado, entre otras cosas, a que la larva de abulón es estructuralmente incapaz de capturar alimento particulado durante el desarrollo larval y metamórfico, por lo que se asume que subsiste enteramente de sus reservas endógenas debido a su carácter de desarrollo lecitotrófico. No obstante, Jaeckle y Manahan (1989) han reportado que las larvas trocófora y véliger son capaces de obtener energía a partir de la materia orgánica disuelta (MOD) presente en el agua de mar, esto incluye la detección y transporte de azúcares sencillos y aminoácidos libres como taurina y alanina.

La capacidad para utilizar MOD presente en el medio marino, ha sido ampliamente documentada en larvas y adultos de moluscos bivalvos, los cuales utilizan las branquias y el velum como órganos transportadores (Pequignant, 1973). Pese a que Manahan y Crisp (1982) reportan que los niveles de carbono presentes en el medio marino son suficientes para suplir un monto significativo de energía de estas larvas, se cree que la distribución y las fluctuaciones de la MOD en el medio propician una baja disponibilidad real de esta, con la consiguiente carencia energética. Para organismos cultivados, se cree que este tipo de carencias podrían ser minimizada si se incrementa la disponibilidad de MOD presente en el medio de cultivo con un suplemento alimenticio adecuado.

Algunos investigadores no parecen darle gran importancia a las excesivas mortalidades iniciales en los cultivos de este organismo debido a que es posible obtener mas de un millón de huevos de una sola hembra de abulón. Sin embargo, en Japón hay laboratorios que producen más de 2,000 000 de juveniles anualmente, y las altas sobrevivencias proporcionan una mayor eficiencia que permite bajar los costos de producción (Kan-no, 1975).

Por lo anterior, este estudio intenta dilucidar si la inclusión de MOD durante el período larval disminuye las mortalidades y aumenta la tasa de crecimiento del abulón rojo, *H. rufescens*, en condiciones de cultivo comercial.

## 1.1 Antecedentes.

La habilidad de los invertebrados marinos para tomar materia orgánica disuelta (MOD) directamente del agua de mar ha interesado a los científicos por más de un siglo (Stephens, 1988). La asimilación de MOD (principalmente aminoácidos y azúcares) se ha encontrado en muchos invertebrados de cuerpo blando representados por 13 distintos phyla (Ferguson, 1982).

Acercas de esto Manahan y Crisp (1982) refieren que, hasta ese momento, los estudios sobre el papel que desempeña la materia orgánica en la nutrición de los moluscos bivalvos se habían confinado a organismos adultos. Sin embargo, estos mismos autores indican que las formas larvales de dichos bivalvos presentan en proporción, una mayor capacidad para absorber el material disuelto en el medio y que inclusive pueden competir por el mismo con las bacterias.

Manahan (1989) establece que larvas de moluscos bivalvos son capaces de absorber materia orgánica disuelta, misma que les servirá como un aporte extra energético permitiéndoles llegar con mayores reservas a la etapa crítica de la metamorfosis y el asentamiento. Welborn y Manahan (1990) realizaron experimentos de medición directa de las cantidades en picomoles de mono, di y trisacáridos en el agua de mar combinando medición de cromatografía líquida de alta resolución con detección amperométrica. Este método fue aplicado en un estudio de asimilación de azúcares disueltos en agua de mar por larvas del bivalvo *Crassostrea gigas* y del gasterópodo *Haliotis rufescens*. Encontraron que ambos eran capaces de asimilar glucosa y maltosa presente en el medio de cultivo, y que

la cinética de asimilación de los organismos era similar a la cinética de enzima-sustrato. Aprovechando esa ventaja, los autores determinaron la velocidad máxima de transporte de azúcares ( $J_{\max}$ ) y la concentración de sustrato a la cual se alcanzaba  $\frac{1}{2} J_{\max}$  ( $K_t$ ) por parte de las larvas, a partir de concentraciones experimentales presentes en el agua de mar.

Por su parte, Jaeckle y Manahan (1989a) indican que, aunque a la larva de abulón *Haliotis rufescens* se le clasifica como lecitotrófica, esto es, que no se alimenta durante su periodo larvario sino que empieza a hacerlo hasta su cambio a juvenil bentónico, esta clasificación pudiera no ser apropiada puesto que se observa un incremento en peso a partir del estadio de ovocito. También refieren que esto indica que las larvas asimilan MOD del medio.

Experimentos mas recientes (Shilling *et al.*, 1996), refieren que el costo de energía total que requieren las larvas de abulón rojo *Haliotis rufescens* durante su desarrollo de larva planctónica a juvenil, es casi el mismo monto que existe como reserva energética en el huevo fecundado. Por otro lado, dando por seguro que las larvas de abulón absorben aminoácidos y glucosa del medio, el mismo Shilling *et al* (1996), realizó experimentos de transporte en estos organismos utilizando glucosa y alanina, y determinó los valores de  $K_m$  y  $V_{\max}$  de estos componentes para diferentes estadios de crecimiento.

Aunque se encontraron varios trabajos que hacen referencia al papel que desempeña la materia orgánica disuelta en el desarrollo de las larvas del abulón rojo *Haliotis rufescens*, y que incluso algunos de ellos señalan en qué proporción

son absorbidos ciertos componentes específicos, no se encontró ningún trabajo que propusiera una aplicación práctica de este conocimiento en el cultivo de dichos organismos.

## **I.2 Objetivos**

- Evaluar la respuesta metabólica de las larvas del abulón *Haliotis rufescens* en agua de mar enriquecida con glucosa y aminoácidos.
- Determinar la tasa de sobrevivencia al finalizar la fase larval.
- Cuantificar las reservas energéticas endógenas del abulón durante su periodo larvario.

## II. METODOLOGIA

Se llevaron a cabo tres corridas, la primera se denominó prueba preliminar (PRE) y la segunda y tercera pruebas experimentales (AQUAM1 y AQUAM2). La prueba preliminar se realizó en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC, y las pruebas experimentales se realizó en las instalaciones de la empresa Aquam Internacional en el Ejido Eréndira, B. C.

### 2.1 Condiciones Generales De Cultivo.

#### Prueba Preliminar

El cultivo de larvas se realizó de la misma manera que en la prueba experimental, la cual se detalla abajo. A diferencia de esta, en la prueba preliminar se empleó agua de mar sintética en lugar de agua de mar filtrada a 10 $\mu$ m y pasada por luz ultravioleta. Esto se hizo con el fin de obtener datos adicionales sobre el comportamiento de los organismos en un medio en el que solo se encontraron los nutrientes adicionados, sin que se presentara la materia orgánica disuelta que comúnmente se encuentra en el medio natural.

Las temperaturas durante esta prueba se mantuvieron constantes a 18°C, ya que el laboratorio donde se desarrolló el experimento contó con sistema de refrigeración.

#### Pruebas Experimentales

Se colocaron larvas de abulón *Haliotis rufescens* en cubetas de 12 litros pero llenados hasta un volumen de 8 litros, a una densidad de 10 larvas por

mililitro. Se siguió la técnica de cultivo japonesa, que consiste en un sistema cerrado (sin flujo), con cambios diarios del 100% de agua de mar filtrada a 10µm y pasada por luz ultravioleta (Grant, 1981). Se mantuvieron las larvas en estas condiciones el tiempo de duración de los experimentos.

La temperatura durante las pruebas experimentales realizadas en la planta Aquam se trató de mantener constante, para lo cual, las cubetas conteniendo a las larvas se colocaron en un baño de agua enfriada con bombas refrigerantes, pero estos aparatos no trabajaron eficientemente, así que los incrementos de temperatura oscilaron entre los 18 °C y los 20 °C, siguiendo el mismo patrón que se encuentra referido en el anexo I.

A todos los tratamientos se les suministró, en cada cambio de agua, un antibiótico de uso probado con larvas de abulón (clorafenicol, 5 mg / L ) según comunicación personal ( Searcy-Bernal, IIO), esto con la finalidad de controlar el crecimiento desmedido de bacterias en el cultivo.

## **2.2 Diseño Experimental.**

### Prueba Preliminar.

La prueba preliminar se realizó con el fin de estandarizar los sistemas de medición y análisis, para después llevar al cabo la prueba experimental en las condiciones comerciales de cultivo. El diseño experimental durante la prueba preliminar se realizó de igual forma que en las pruebas experimentales realizadas en la planta AQUAM, lo cual se detalla abajo, excepto que en el ultimo caso se

añadió una unidad experimental como control de agua de mar cruda además del control de agua de mar sintética. La adición de los nutrimentos escogidos y su concentración, se realizó de igual forma que en las prueba experimentales.

Las larvas empleadas para la realización de la prueba preliminar, fueron proporcionadas por la planta de cultivo de abulón Abulones Cultivados S. A. El desove del que provinieron se realizó el 17 de abril de 1997, la eclosión se llevó a cabo el 18 de abril y se sometieron a los tratamientos el 21 de abril. Los análisis finales se realizaron el día 25 de abril de 1997.

#### Pruebas Experimentales.

Se buscó que durante el curso de dos experimentos consecutivos e iguales, se incrementara la materia orgánica disuelta en el agua adicionando un suplemento consistente en: a) glucosa; b) mezcla de aminoácidos, y c) mezcla de glucosa-aminoácidos. De esta manera, se contó con tres tratamientos y un control de agua de mar (y agua sintética, en el caso de la prueba preliminar) filtrada a  $10\mu\text{m}$  y pasada por UV. Todos los tratamientos se corrieron por triplicado. La mezcla de aminoácidos se preparó con diez aminoácidos que se consideran esenciales para el abulón adulto según Fleming *et al.* (1996), y su concentración fue determinada de la manera siguiente: inicialmente, se tomó como base el valor de Km de leucina reportado por Manahan (1990) en experimentos de transporte en larvas de ostión *Crassostrea gigas*, este valor se utilizó para obtener la cantidad de aminoácido necesaria para mantener la concentración de  $7.1\mu\text{M}$  durante el cultivo.

Posteriormente se tomó el porcentaje que, para el resto de los aminoácidos esenciales elegidos (ver Tabla 1), se encuentra en el tejido de abulón de acuerdo a lo reportado por Fleming *et al.* (1996). Con ello y con la cantidad de leucina obtenida inicialmente, se obtuvo la proporción en peso de los demás aminoácidos (Tabla 1). La concentración de glucosa utilizada fue de 7.1  $\mu$ M.

Tabla 1. Lista de aminoácidos empleados y sus pesos para un volumen de 8 litros:

Aminoácido	Peso Molecular	Molaridad ( $\mu$ M)	% AA en Abulón (Fleming, 1996)	Peso (mg/8lt)
Treonina (Thr)	191.10	2.86	77	4.38
Valina (Val)	117.15	4.79	79	4.49
Metionina (Met)	149.21	2.04	43	2.44
Leucina (Leu)	<b>131.20</b>	<b>7.1 (Manahan,1990)</b>	<b>131</b>	<b>7.45</b>
Tirosina (Tyr)	181.19	2.49	3.81	3.62
Fenitalanina (Phe)	165.00	2.93	68	3.86
Triptófano (Trp)	204.20	0.208	6	0.34
Lisina (Lys)	182.60	3.89	100	5.68
Histidina (His)	155.16	1.51	33	1.87
Arginina (Arg)	210.70	4.08	121	6.88

La adición de los nutrimentos se realizó en cada cambio de agua durante la fase larval.

Las larvas empleadas para la realización de la prueba experimental 1, fueron proporcionadas por la planta de cultivo de abulón Aquam Internacional. El desove del que provinieron se realizó el 24 de julio de 1997, la eclosión se llevó a cabo el 25 de julio y se sometieron a los tratamientos el 27 de abril a las. Los análisis finales se realizaron el día 30 de julio de 1997.

Las larvas empleadas para la realización de la prueba experimental 2, también fueron proporcionadas por la planta de cultivo de abulón Aquam Internacional. El desove del que provinieron se realizó el 29 de julio de 1997, la

eclosión se llevó a cabo el 30 de julio y se sometieron a los tratamientos el 31 de abril. Los análisis finales se realizaron el día 03 de agosto de 1997.

### **2.3 Enumeración De Variables**

Las mediciones realizadas durante la fase experimental se hicieron de manera inicial y final, esto es, los muestreos iniciales se llevaron al cabo justo antes de someter los organismos a los tratamientos. Los muestreos finales se realizaron un día antes de trasladar las larvas a las cubetas de fijación.

Durante los muestreos se evaluó:

1.- *Tasas de consumo de oxígeno:* Se midió el consumo de oxígeno a muestras de aproximadamente 800 a 1000 larvas de cada réplica, para lo cual se utilizaron cámaras respirométricas y sensores polarográficos según el método descrito por Bricelj y García-Esquivel (1995). Al final del periodo de incubación las larvas se contabilizaron y se pesaron en la forma descrita abajo (crecimiento). Los resultados de consumo de oxígeno obtenidos se dividieron entre el total de larvas incubadas y el resultado se expresó como  $\text{pmol O}_2/\text{larva}/\text{h}$ . Adicionalmente el consumo de oxígeno se dividió entre el peso orgánico de las larvas y se reportó con  $\mu\text{mol O}_2/\text{h}/\text{g}$  tejido.

2.- *Crecimiento:*

Consistió en evaluar talla y peso seco total y del tejido de los organismos. Una vez obtenida la medición de consumo de oxígeno, estos mismos organismos se

conservaron en formol al 10% y se trasladaron al final del experimento al laboratorio de bioquímica del IIO, en donde se hicieron las siguientes mediciones

- a) Talla: la medición de talla de aproximadamente 100 larvas de cada réplica con microscopio compuesto y micrómetro.
- b) Peso seco: las mismas muestras, incluidas las 100 larvas medidas, se filtraron en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C previamente calcinados y pesados y se sometieron a secado a 60°C durante 24 hrs, se pesaron nuevamente.
- c) Peso orgánico: los filtros secos y pesados se calcinaron a 450°C durante otras 24 hrs y una vez fríos se pesaron nuevamente.

La diferencia entre los pesos seco y peso de cenizas, determinó el peso orgánico.

3.- *Sobrevivencia*: Al final de la fase larval se tomaron 3 alícuotas de 1 ml de cada réplica, homogeneizando previamente el agua en las cubetas, cada alícuota se colocó en una cámara de recuento y se hizo conteo del total de larvas muertas y vivas determinado por movimiento bajo el microscopio estereoscópico, la suma del número de muertas y vivas se consideró como el 100% refiriéndose a esto el porcentaje de mortalidad, el promedio de los porcentajes de mortalidad de cada alícuota dio el porcentaje de mortalidad por réplica.

4.- *Contenido bioquímico*: Se tomaron muestras de los organismos para análisis de lípidos (100mg/mtra) y proteínas (50mg/mtra). Para la conservación de estas muestras se utilizó congelación *in situ* con nitrógeno líquido y almacenamiento en criocongelador a -70 °C hasta su análisis en laboratorio. El análisis de proteínas se

realizó mediante la evaluación del contenido de nitrógeno total con Método Micro-Kiejdahl (A. O. A. C., 1990). El análisis de lípidos totales se realizó mediante la extracción de los mismos con el método descrito por Bligh y Dyer (1959), seguida por cuantificación gravimétrica.

## **2.4 Análisis Estadístico**

A los datos obtenidos en todos los tratamientos se les aplicó las pruebas de normalidad utilizando el método de Kolmogorov-Smirnov y de homocedasticidad mediante el cómputo de la correlación de Spearman entre los valores observados y los residuales de las variables dependientes.

Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para hacer la comparación entre los resultados de los tratamientos en cada una de las variables medidas y para las diferentes pruebas. Para las variables que no pasaron las pruebas de normalidad y/o homogeneidad se aplicó la ANOVA de una vía no paramétrica (por rangos) de "Kruskal-Wallis". En los casos en los que se detectaron diferencias significativas, se empleó el análisis de comparaciones múltiples "Student- Newman-Keuls Method" (SNK). El nivel de significancia utilizado fue de 0.05 en todos los análisis. En la descripción de los resultados, los análisis realizados con estadística no paramétrica se diferencian con el estadístico de prueba (H), indicado entre paréntesis junto con los grados de libertad (GL) y la probabilidad del estadístico de prueba (P).

El paquete estadístico utilizado fue el Sigma Stat 2.0 para windows (Compañía Jandel Scientific 1995).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Talla

En la Prueba Preliminar (PRE), las longitudes finales promedio de las larvas de abulón no presentaron diferencias significativas con respecto a la talla promedio inicial (INI) (273.2  $\mu\text{m}$ /larva) o con respecto a los distintos tratamientos (H= 6.72; GL= 5; P= 0.242) (Tabla 2). No obstante, las larvas tendieron a aumentar de tamaño con respecto al valor inicial durante el periodo experimental (Fig. 1).

**Tabla 2.** Promedios o medianas para cada tratamiento de todas las variables utilizadas en la corrida PRE. También se presentan los valores de los estadísticos de prueba ANOVA paramétrica y no paramétrica según el caso, y los grados de libertad (gl). Las letras comunes indican que no hay diferencia significativa entre tratamientos, después de aplicar la prueba de comparaciones múltiples de SNK.

VARIABLES	TRATAMIENTO						P
	INI	AC	AS	G	AA	GAA	
TALLA ( $\mu\text{m}$ )	273.2 a	277.2 a	280.0 a	278.4 a	278.7 a	280.3 a	0.2423 H= 6.72 gl= 5
PESO ORGANICO ( $\mu\text{g}$ )	1.29 a	1.16 a	1.18 a	1.26 a	1.17 a	1.21 a	0.622 F= 0.722 gl= 5,10
O <sub>2</sub> pmol/larva/h	180.2 cb	129.4 cb	87.0 a	101.8 b	211.0 c	134.7 cb	0.00647 F= 6.0 gl= 5,11.
O <sub>2</sub> $\mu\text{mol/h/gr}$ tejido	140.259 ab	114.723 ab	74.07706 b	81.38224 b	179.52 a	112.00 ab	0.00647 F= 4.93 gl= 5,11

Por otra parte, en la primera prueba experimental en Aquam (AQUAM1), se detectaron diferencias significativas entre las longitudes promedio de las larvas de abulón (H= 9.58; GL= 4; P= 0.048) (Tabla 3). Las comparaciones múltiples de medias indicaron que la longitud final alcanzada por las larvas en los distintos tratamientos con nutrimento (Md = 271.0 a 275.4) fue significativamente distinta del

**Tabla 3.** Promedios o medianas para cada tratamiento de todas las variables utilizadas en la corrida AQUAM1. También se presentan los valores de los estadísticos de prueba ANOVA paramétrica y no paramétrica según el caso, y los grados de libertad (gl). Las letras comunes indican que no hay diferencia significativa entre tratamientos, después de aplicar la prueba de comparaciones múltiples de SNK.

VARIABLES	TRATAMIENTO					
	INI	AC	G	AA	GAA	P
TALLA ( $\mu\text{m}$ )	269.3 a	271.0 b	275.4 b	273.6 b	271.4 b	0.0482 H= 9.58 gl= 4
PESO ORGANICO ( $\mu\text{g}$ )	1.25 a	1.11 a	1.18 a	1.24 a	1.22 a	0.784 F=0.925 gl= 4, 9
SOBREVIVENCIA (%)	100 a	88 a	99 a	80.9 a	78.7 a	0.026 H= 8.94 gl=4
O <sub>2</sub> pmol/larva/h	107.7 a	92.0 a	87.7 a	95.0 a	93.0 a	0.146 F= 6.0 gl=5,11
O <sub>2</sub> $\mu\text{mol/h/gr}$ tejido	84.92269 a	72.76431 a	62.34207 a	74.22879 a	69.44126 a	0.0955 F= 2.75 gl= 4, 9
PROTEINAS %/larva/peso tejido	25.8 a	25.8 a	28.3 a	22.9 a	26.0 a	0.534 F= 0.834 gl= 4, 10
LIPIDOS %/larva/peso tejido	18.1 a	12.8 b	14.9 b	13.8 b	15.6 b	0.0046 F= 7.52 gl= 4, 10
PROTEINAS $\mu\text{g/ larva}$	0.326 a	0.328 a	0.394 a	0.292 a	0.341 a	0.0586 F= 3.27 gl= 4, 10
LIPIDOS $\mu\text{g/ larva}$	0.233 a	0.163 a	0.212 a	0.176 a	0.204 a	0.107 F= 2.52 gl= 4, 10

valor inicial ( $p < 0.05$ ), pero no se detectaron diferencias entre los tratamientos al final del cultivo larval ( $p > 0.05$ ).

En contraste, durante la segunda prueba experimental en Aquam2 (Tabla 4) se detectaron diferencias significativas en la longitud promedio de las larvas ( $F= 22.1$ ;  $GL= 4, 9$ ;  $P= 0.242$ ; poder de prueba con  $\alpha 0.05 = 1.000$ ), tanto con respecto al valor inicial ( $X = 267.9$ ) como con respecto al tratamiento de agua enriquecida

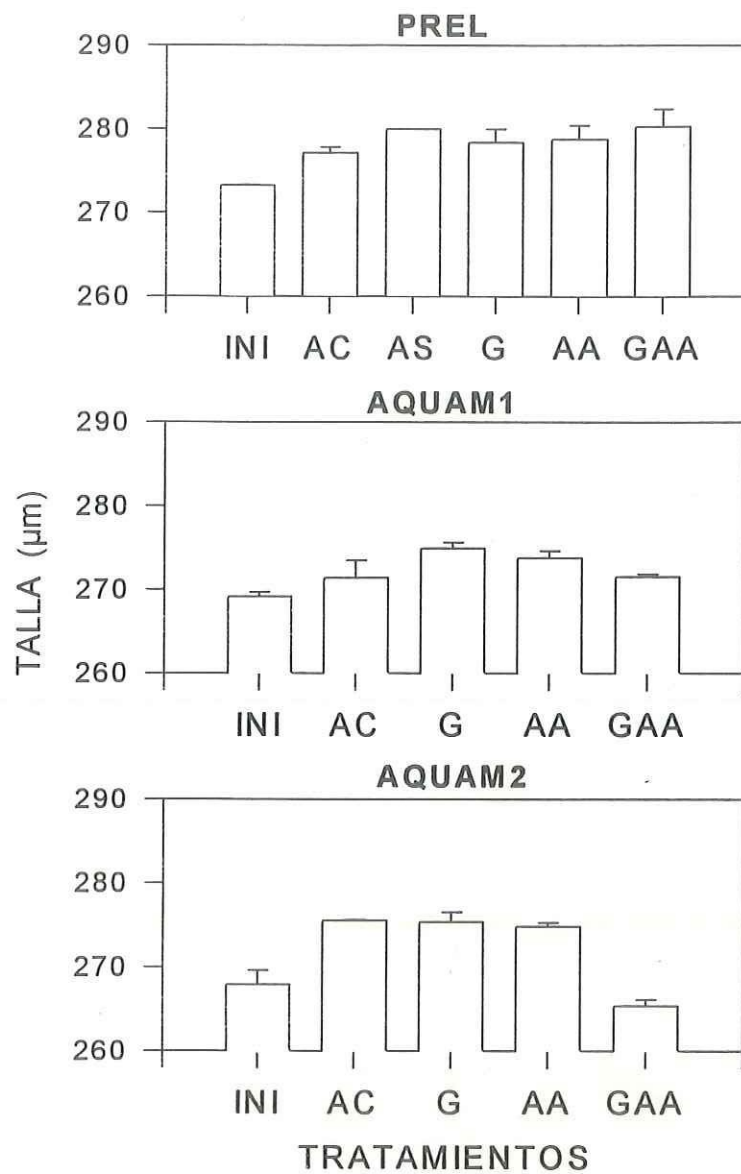


Fig. 1. Comparación de talla promedio en de larvas de abulón sometidas a distintos nutrimentos en tres corridas distintas. (INI) = valores iniciales; controles: (AC) agua cruda y (AS) agua sintética; y tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estandar.

con la mezcla de glucosa/aminoácidos (GAA,  $X = 265.4$ ). La prueba de comparaciones múltiples de medias (SNK) indicó que los abulones del tratamiento con la mezcla GAA no mostraron diferencias significativas con respecto a la longitud inicial ( $p > 0.05$ ), pero fueron significativamente más pequeños ( $p < 0.05$ ) que los abulones de los tratamientos con agua cruda (AC), glucosa (G) o aminoácidos (AA). En los tres últimos casos la talla promedio final osciló entre 274.8 y 275.4  $\mu\text{m}$  (Fig. 1).

**Tabla 4.** Promedios o medianas para cada tratamiento de todas las variables utilizadas en la corrida AQUAM2. También se presentan los valores de los estadísticos de prueba ANOVA paramétrica y no paramétrica según el caso, y los grados de libertad (gl). Las letras comunes indican que no hay diferencia significativa entre tratamientos, después de aplicar la prueba de comparaciones múltiples de SNK.

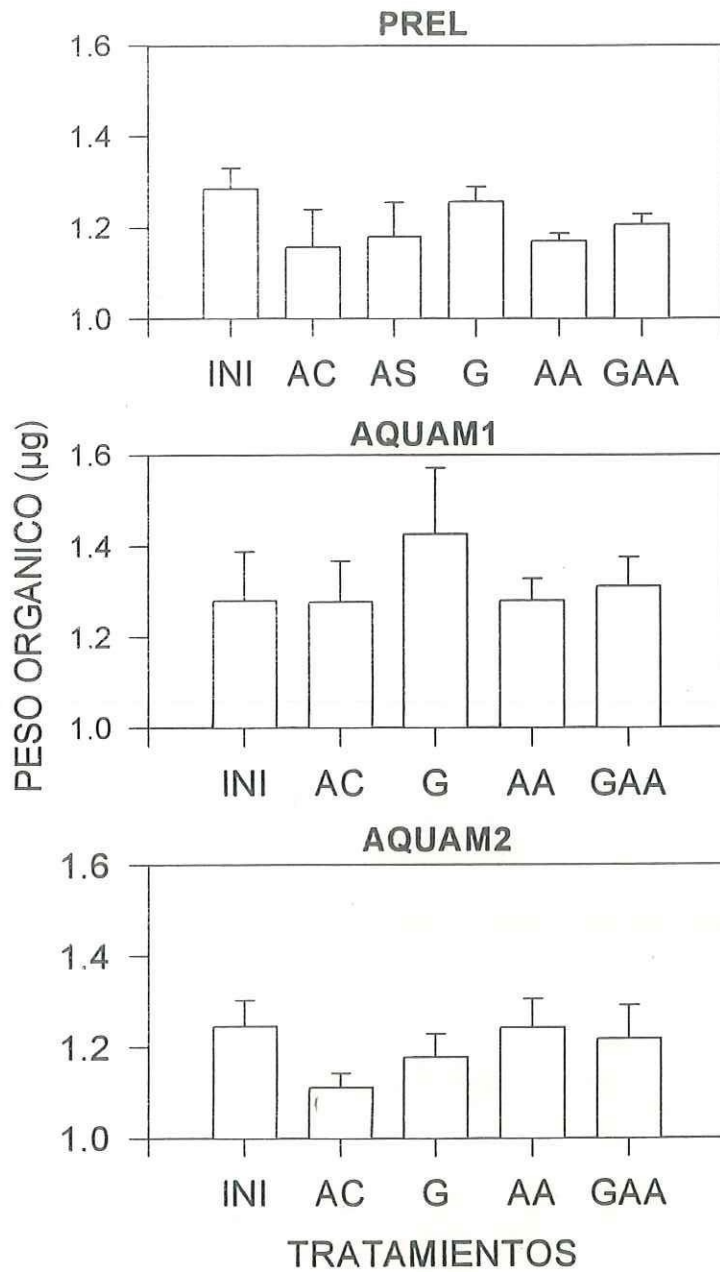
VARIABLES	TRATAMIENTO					
	INI	AC	G	AA	GAA	P
TALLA ( $\mu\text{m}$ )	267.9 a	275.5 b	275.4 b	274.8 b	265.4 a	0.2423 F=22.1 gl= 4,9
PESO ORGANICO ( $\mu\text{g}$ )	1.25 a	1.11 a	1.18 a	1.24 a	1.22 a	0.491 F= 0.925 gl= 4, 9
SOBREVIVENCIA (%)	100 a	88.0 a	99.1 a	80.9 a	78.7 a	0.0471 F= 3.72 gl= 4, 9
O <sub>2</sub> pmol/larva/h	101.1 a	70.3 a	131.4 a	91.6 a	119.9 a	0.177 F= 2.01 gl= 4, 9
O <sub>2</sub> $\mu\text{mol/h/gr}$ tejido	80.161 a	62.67031 a	114.5253 a	74.26162 a	98.98664 a	0.264 F= 1.57 gl= 4, 9
PROTEINAS %/larva/peso tejido	23.7 a	26.9 a	24.5 a	24.5 a	23.2 a	0.423 F= 1.08 gl= 4, 9
LIPIDOS %/larva/peso tejido	18.1 a	16.6 ab	14.1 b	14.4 b	14.6 b	0.0450 F= 8.21 gl= 4, 9
PROTEINAS $\mu\text{g/ larva}$	0.296 a	0.298 a	0.287 a	0.304 a	0.282 a	0.851 F=0.330 gl= 4,9
LIPIDOS $\mu\text{g/ larva}$	0.226 a	0.184 b	0.165 b	0.179 b	0.178 b	0.0201 F= 5.09 gl= 4, 9

### **3.2 Peso Orgánico**

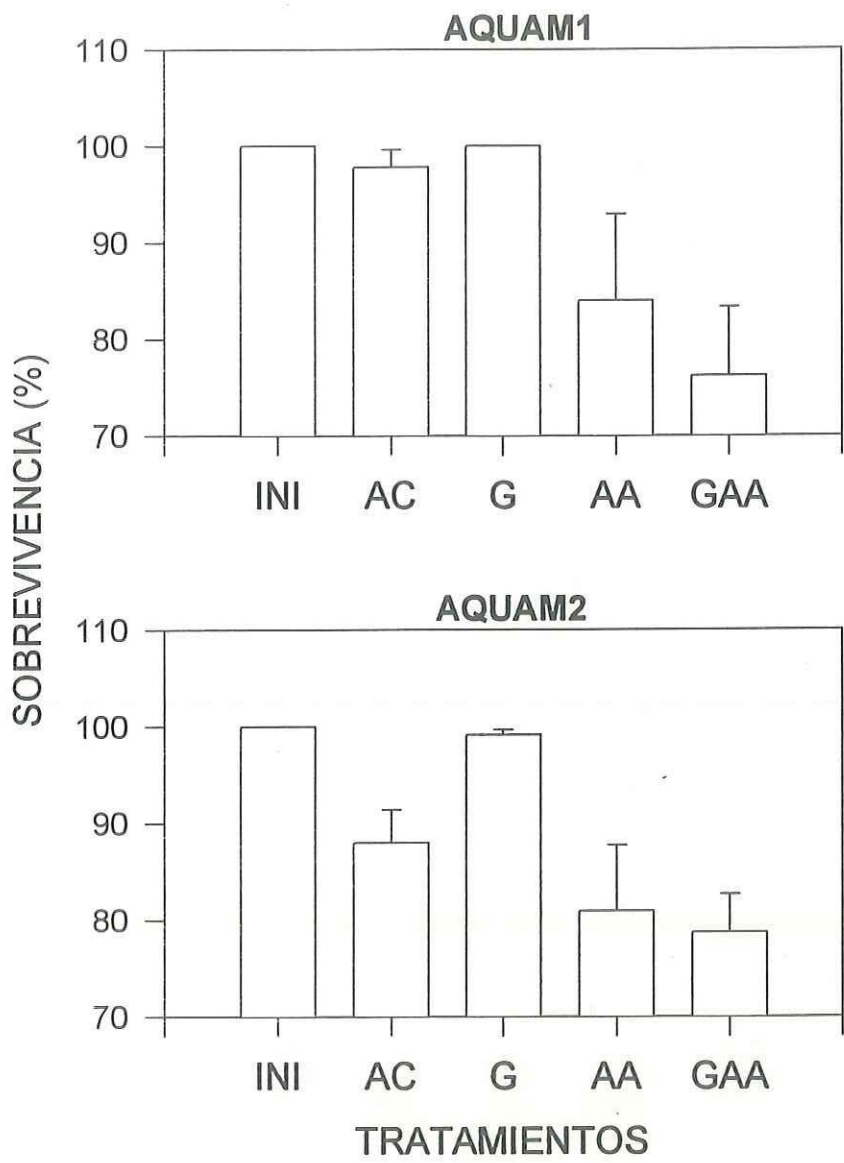
Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre los valores iniciales (INI) (1.29 µg/larva) y los valores finales de cada tratamiento en las corridas PRE (F= 0.722; GL= 5, 10; P= 0.622), AQUAM1 (F= 0.430; GL= 4, 10; P= 0.784) o AQUAM2 (F= 0.925; GL= 4, 9; P= 0.491). No obstante, en las primeras dos corridas se observó una tendencia del tratamiento con glucosa para producir ligeramente mayor peso orgánico de las larvas (X = 1.26 y 1.43 µg/larva, AQUAM1 y 2 respectivamente), mientras que en AQUAM 2 las larvas cultivadas en agua de mar cruda (AC) y glucosa (G) mostraron una tendencia hacia los menores pesos de tejido, con valores de 1.11 y 1.18 µg/larva respectivamente (Fig. 2).

### **3.3 Supervivencia**

En la corrida AQUAM1 no se observaron diferencias significativas entre el promedio de los porcentajes de supervivencia correspondientes a cada uno de los tratamientos, incluyendo el valor inicial (H= 8.94, GL= 4; P= 0.0626). En la corrida AQUAM2 se detectaron diferencias entre las medias de los tratamientos (F= 3.72; GL= 4, 9; P= 0.0471), pero dichas diferencias no fueron distinguibles por el método



**Fig. 2.** Comparación de peso orgánico promedio de larvas de abulón sometidas a distintos nutrimentos en tres corridas distintas. (INI) = valores iniciales; controles: (AC) agua cruda y (AS) agua sintética; y tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estandar.



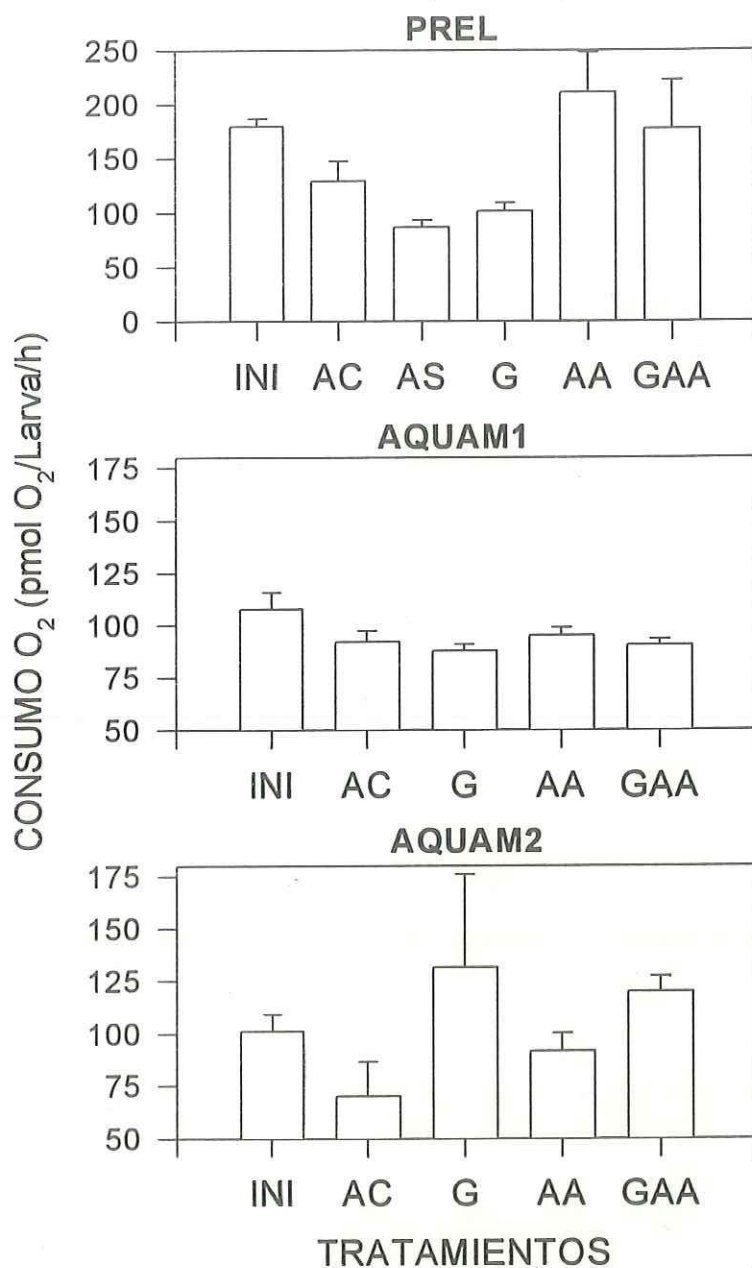
**Fig. 3.** Comparación de sobrevivencia promedio de larvas de abulón sometidas a distintos nutrimentos en dos corridas distintas. (INI) = valores iniciales; control: (AC) agua cruda; y tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estandar.

SNK de comparaciones múltiples ( $p > 0.05$ ). En ambas corridas hubo una tendencia a las más altas sobrevivencias en el tratamiento con glucosa (99–100 %, exps. 1 y 2 respectivamente), seguido en orden descendente por AC, AA y GAA (76 a 79 %) (Fig.3).

Para la prueba preliminar, debido a que al parecer se presentó una infección bacteriana durante el cultivo (ver discusión) lo cual ocasionó una alta mortalidad, los análisis de sobrevivencia y bioquímicos no se realizaron.

### **3.4 Consumo De Oxígeno Por Individuo**

En la corrida PRE se detectaron diferencias significativas entre el consumo de oxígeno por individuo entre los tratamientos de prueba ( $F = 6$ ;  $GL = 5, 11$ ;  $P = 0.006$ ), pero en las corridas subsecuentes (Fig. 4) no se observaron diferencias significativas (AQUAM1,  $F = 2.23$ ;  $GL = 4, 9$ ;  $p = 0.146$ ; poder de prueba = 0.246; AQUAM2,  $F = 2.01$ ;  $GL = 4, 9$ ;  $p = 0.177$ ; poder de prueba = 0.205). Los valores más altos de consumo de oxígeno en la corrida PRE (211 pmol  $O_2$ /larva) correspondieron al tratamiento AA (Fig. 4) y los más bajos (87 pmol  $O_2$ /larva) al control con agua de mar sintética (AS). La prueba SNK de comparaciones múltiples solo identificó diferencias claras entre ambos extremos ( $P < 0.05$ ), mientras que en el resto de los tratamientos no se detectaron diferencias claras (ver anexo, IV). No obstante, hubo una tendencia decreciente de consumo de oxígeno por individuo en el siguiente orden: INI (180.2 pmol  $O_2$ /larva), GAA (134.7 pmol  $O_2$ /larva), AC (129.4 pmol  $O_2$ /larva), G (101.8 pmol  $O_2$ /larva) y AS (87.0 pmol  $O_2$ /larva).

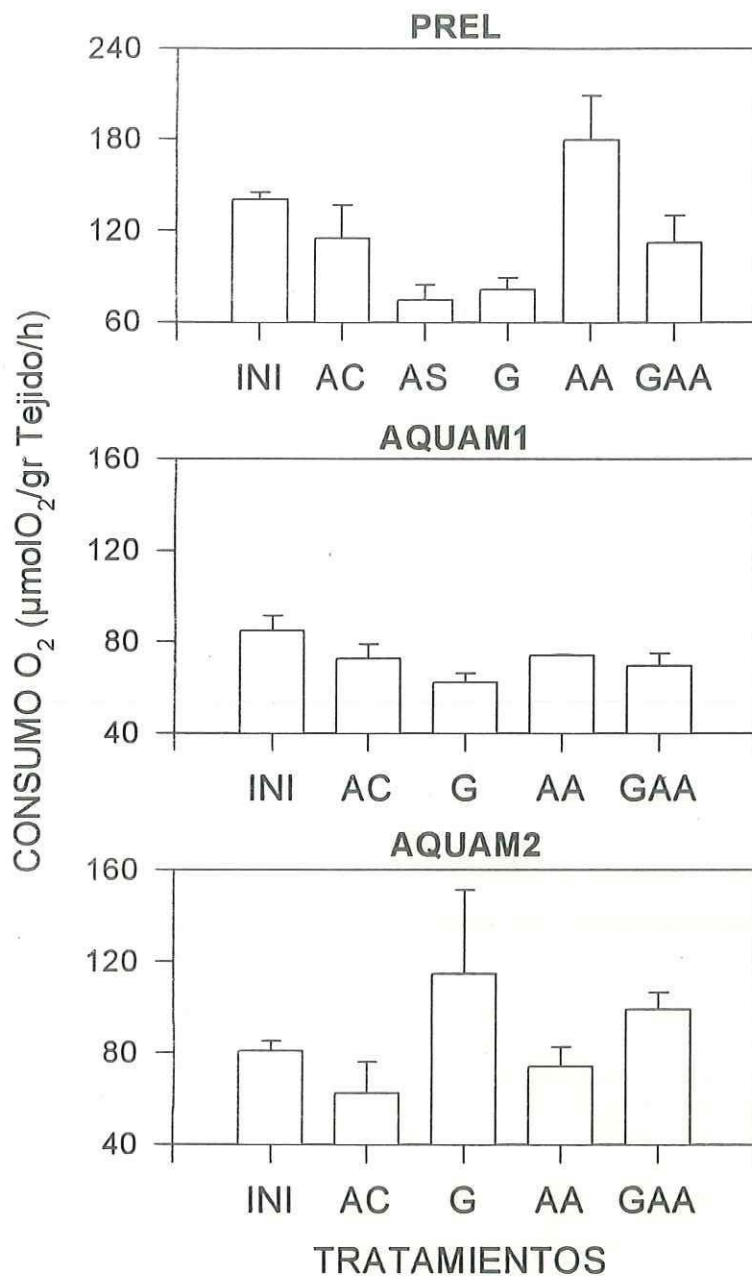


**Fig. 4.** Comparación de consumo de oxígeno promedio de larvas de abulón sometidas a distintos nutrientes en tres corridas distintas. (INI) = valores iniciales; controles: (AC) agua cruda y (AS) agua sintética; y tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estandar.

El poder de la prueba con  $\alpha = 0.05$  fue de 0.88. En la corrida AQUAM1 la tasa de consumo de oxígeno por individuo al final del periodo larva osciló entre 92 y 95  $\mu\text{mol O}_2/\text{larva}$  (inicial 107.7  $\mu\text{mol O}_2/\text{larva}$ ) y en AQUAM2 entre 70.3 y 119.9  $\mu\text{mol O}_2/\text{larva}$  (inicial 101.1  $\mu\text{mol O}_2/\text{larva}$ ).

### 3.5 Consumo De Oxígeno Por Unidad De Peso

En general, todos los valores finales de consumo de oxígeno en todos los tratamientos, mostraron una tendencia a ser menores al valor inicial (Fig. 5). En la corrida PRE se detectaron diferencias significativas en el consumo de oxígeno por unidad de peso entre los tratamientos de prueba ( $F = 4.93$ ;  $GL = 5, 11$ ;  $P = 0.013$ ), pero en las corridas subsecuentes (Fig. 5) no se observaron diferencias significativas (AQUAM1,  $F = 2.75$ ;  $GL = 4, 9$ ;  $p = 0.095$ ; poder de prueba = 0.340; AQUAM2,  $F = 1.57$ ;  $GL = 4, 9$ ;  $p = 0.264$ ; poder de prueba = 0.131). Los valores más altos de consumo de oxígeno en la corrida PRE (179.5  $\mu\text{mol O}_2/\text{g/h}$ ) correspondieron al tratamiento AA (Fig. 5) y los más bajos (74.9  $\mu\text{mol O}_2/\text{g}$ ) al control con agua de mar sintética (AS). La prueba SNK de comparaciones múltiples solo identificó diferencias claras entre el valor más alto (AA, 179.5  $\mu\text{mol O}_2/\text{g/h}$ ) y los dos extremos inferiores ( $G = 81.4 \mu\text{mol O}_2/\text{g/h}$ ;  $AS = 74.9 \mu\text{mol O}_2/\text{g/h}$ ) ( $P < 0.05$ ). El consumo de oxígeno por unidad de peso tendió a ser menor en el tratamiento con glucosa para las corridas PRE ( $X = 81.4 \mu\text{mol O}_2/\text{g/h}$ ) y AQUAM1 ( $X = 62.3 \mu\text{mol O}_2/\text{g/h}$ ), pero en AQUAM2 dicho tratamiento mostró el valor más



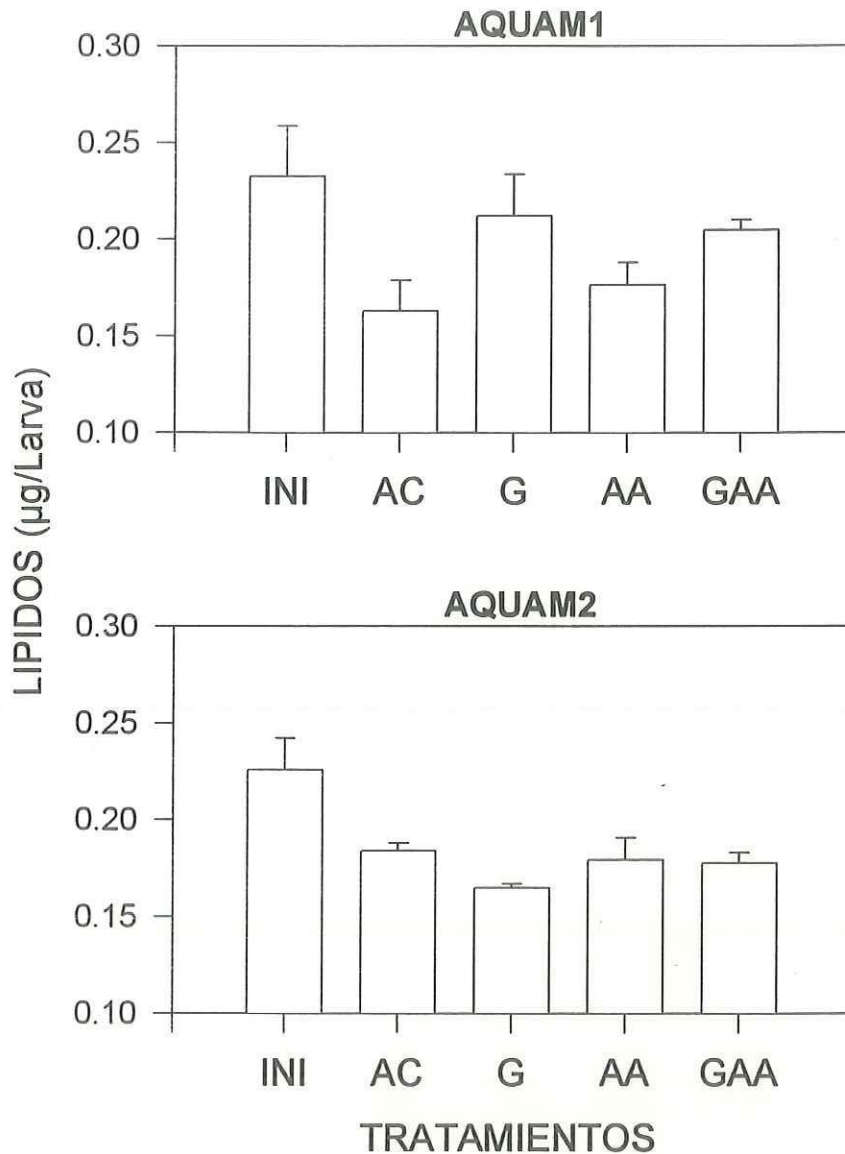
**Fig. 5** Comparación de consumo de oxígeno promedio por gramo de tejido de larvas de abulón sometidas a distintos nutrimentos en tres corridas distintas. (INI) = valores iniciales; controles: (AC) agua cruda y (AS) agua sintética; y tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estandar.

alto de consumo promedio de oxígeno ( $X = 114.5 \mu\text{mol O}_2/\text{g/h}$ ) y de error estándar (Fig. 5).

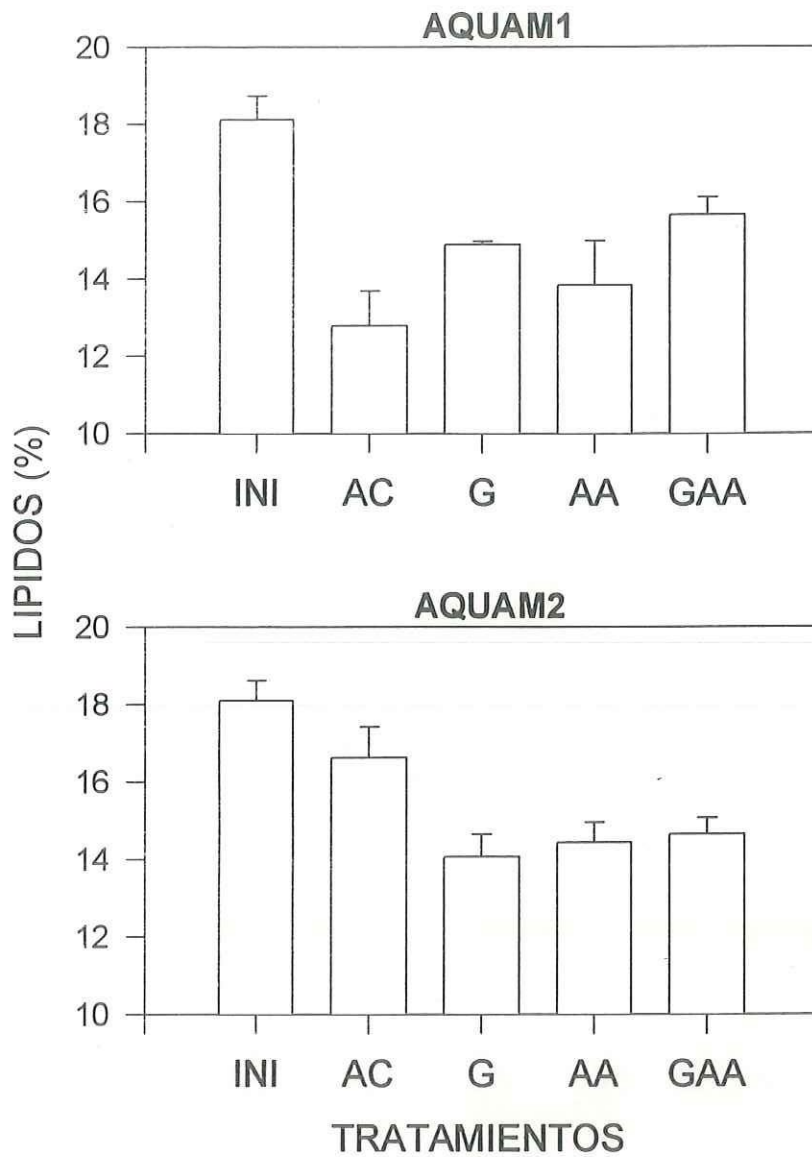
### 3.6 Lípidos Totales

El contenido de lípidos en larvas de abulon tendió a disminuir en función del tiempo, y al final del periodo larval, el promedio de lípidos fue menor que el inicial independientemente del tratamiento (Fig. 6). En la corrida AQUAM1 no se encontraron diferencias significativas entre el valor inicial ( $0.233 \mu\text{g/larva}$ ) y los valores finales de cada tratamiento ( $F = 2.52$ ;  $GL = 4, 10$ ;  $P = 0.107$ ; potencia de prueba =  $0.311$ ), pero las larvas tratadas con glucosa tendieron a mostrar más lípidos ( $0.212 \mu\text{g/larva}$ ) que el resto, seguido por GAA ( $0.204 \mu\text{g/larva}$ ), AA ( $0.176 \mu\text{g/larva}$ ) y AC ( $0.163 \mu\text{g/larva}$ ).

En AQUAM2 sí se detectaron diferencias estadísticas en el contenido promedio de lípidos entre tratamientos, incluido el valor inicial ( $F = 5.09$ ;  $GL = 4, 9$ ;  $P = 0.0201$ ; poder de prueba =  $0.709$ ). La prueba SNK de comparaciones múltiples indicó que el contenido inicial de lípidos ( $0.226 \mu\text{g/larva}$ ) fue significativamente mayor que los valores finales, pero no se detectaron diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos enriquecidos o el control ( $p > 0.05$ ). En AQUAM 2 no hubo una tendencia clara entre tratamientos, y el valor de lípidos osciló entre  $0.165$  (G) y  $0.184 \mu\text{g/larva}$  (AC).



**Fig. 6.** Comparación de promedio de lípidos totales de larvas de abulón sometidas a distintos nutrimentos en dos corridas distintas. (INI) = valores iniciales; controles: (AC) agua cruda tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estandar.



**Fig.7.** Comparación de promedio de porcentaje de lípidos totales referido al peso orgánico de larvas de abulón sometidas a distintos nutrimentos en dos corridas distintas. (INI) = valores iniciales; controles: (AC) agua cruda y tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estandar.

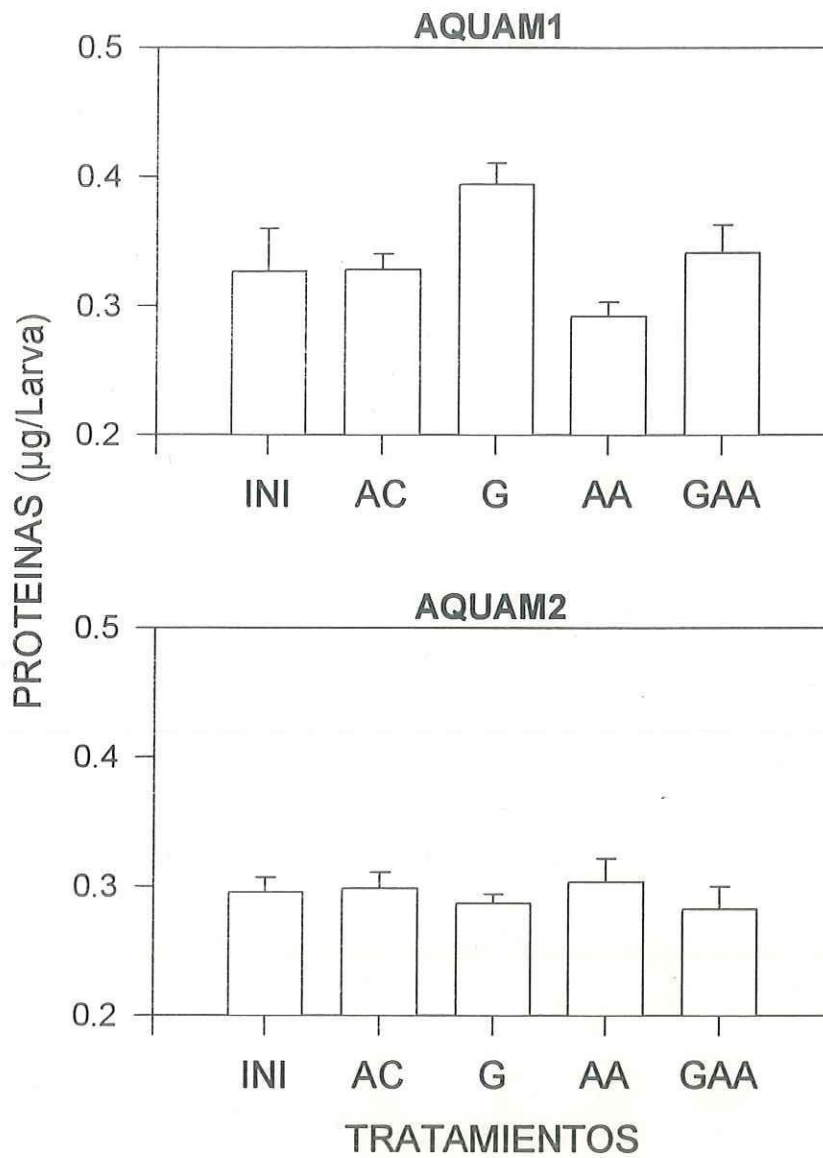
### 3.7 Porcentaje De Lípidos Por Unidad De Peso

Al igual que el contenido total de lípidos, el contenido porcentual de lípidos en larvas de abulón tendió a disminuir en función del tiempo, y al final del periodo larval el promedio de lípidos fue significativamente menor que el inicial, independientemente de la corrida (Fig. 7). El ANOVA para AQUAM1 ( $F = 7.52$ ;  $GL = 4, 10$ ;  $P = 0.005$ ; potencia de prueba = 0.920) indicó que el porcentaje inicial de lípidos (18.1 %) fue mayor que el del resto de los tratamientos al final del experimento, los cuales oscilaron entre 12.8 y 15.6 %, sin encontrar diferencias entre ellos (SNK,  $p > 0.05$ ).

En AQUAM2 se repitió el mismo patrón ( $F = 8.21$ ;  $GL = 4, 9$ ;  $P = 0.0450$ ; poder de prueba = 0.931), siendo el contenido inicial de lípidos (18.1 %) el único distinto entre el resto de los tratamientos (SNK,  $p < 0.05$ ). En estos últimos, el contenido porcentual de lípidos osciló entre 14.1 y 16.6 % (Fig. 7).

### 3.8 Proteínas Totales

Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre el contenido total de proteínas para los organismos de las corridas AQUAM1 ( $F = 3.27$ ;  $GL = 4, 10$ ;  $P = 0.0586$ ; poder de prueba = 0.453) o AQUAM2 ( $F = 0.330$ ;  $GL = 4, 9$ ;  $P = 0.851$ ; poder de prueba = 0.050). En el primer caso los promedios mostraron una tendencia a disminuir con los tratamientos en el siguiente orden: G (0.394  $\mu\text{g/larva}$ ), seguido por GAA (0.341  $\mu\text{g/larva}$ ), AC (0.328  $\mu\text{g/larva}$ ), INI (0.326  $\mu\text{g/larva}$ ) y AA (0.292  $\mu\text{g/larva}$ ), mientras que en AQUAM2 el orden fue el

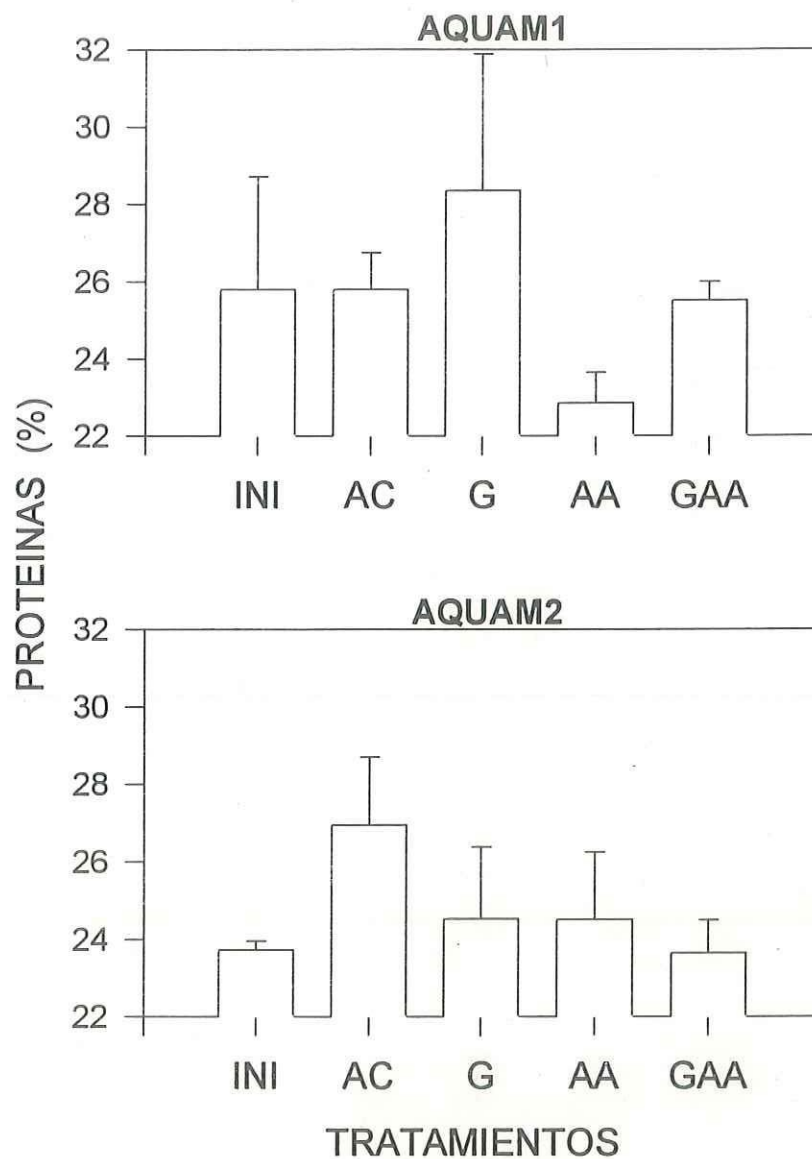


**Fig. 8.** Promedio de proteínas totales finales de larvas de abulón sometidas a distintos nutrimentos en dos corridas distintas. (INI) = valores iniciales; controles: (AC) agua cruda y tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estandar.

siguiente: A (0.304  $\mu\text{g/larva}$ ), seguido por AC (0.298  $\mu\text{g/larva}$ ), INI (0.296  $\mu\text{g/larva}$ ), G (0.287  $\mu\text{g/larva}$ ) y GAA (0.282  $\mu\text{g/larva}$ ) (Fig. 8).

### **3.9 Porcentaje De Proteínas Por Unidad De Peso**

Estadísticamente no se observaron diferencias significativas entre el promedio de los porcentajes de proteína para los tratamientos de las corridas AQUAM1 (F= 0.834; GL= 4, 10; P= 0.534; poder de prueba = 0.05) o AQUAM2 (F= 1.08; GL= 4, 9; P= 0.423; poder de prueba = 0.06). El porcentaje de proteínas al final del experimento oscilo entre 22.9 y 26 % (AQUAM 1) y entre 23.2 y 26.9 % (AQUAM 2). En el primer caso la tendencia observada de mayor a menor fue G (28.3 %), seguido por GAA (26.0 %), AC (25.8 %) y AA (22.9 %). En AQUAM2 la tendencia observada fue: GAA (23.2 %), G y AA con el mismo valor (24.5 %) y, finalmente, AC (26.9 %) (Fig. 9).



**Fig. 9.** Comparación de promedio de porcentaje de proteínas totales referido al peso orgánico en de larvas de abulón sometidas a distintos nutrientes en dos corridas distintas. (INI) = valores iniciales; controles: (AC) agua cruda y tratamientos: (G) glucosa, (AA) aminoácidos y (GAA) glucosa-aminoácidos. Las líneas verticales indican el error estandar.

## IV. DISCUSION

### 4.1 Relevancia estadística de los resultados

En algunos de los resultados encontrados en los análisis de ANOVA, los valores promedio de los tratamientos no presentaron diferencias significativas, sin embargo, el poder estadístico o potencia de prueba ( $1 - \beta$ ) estaba por debajo del recomendado por varios autores ( $1 - \beta < 0.800$ , Searcy 199x). Esto indica que los resultados de esas pruebas deben interpretarse con precaución, ya que pueden no ser concluyentes. Una de las principales causas que propician que se presente un poder menor al esperado, es el bajo número de réplicas empleadas ya que el poder de prueba es directamente proporcional al número de elementos (Zar, 1984).

En el presente estudio se utilizaron 3 réplicas (cubetas) por tratamiento, y en la mayoría de los casos no se detectaron diferencias significativas entre las medias o medianas de cada tratamiento, pero la potencia de prueba fue en esos casos menor que 0.8000. También se presentaron casos en los que el ANOVA mostró diferencias significativas con una potencia de prueba menor a la esperada, para esto se aplica la misma consideración anterior: los resultados de los análisis estadísticos deben interpretarse con cautela, pues pueden no ser concluyentes. Entre estos últimos casos se encontraron los aplicados a las variables de sobrevivencia y lípidos totales (AQUAM2), así como al consumo de oxígeno por unidad de peso (PREL). Asimismo, en el caso de la sobrevivencia de la corrida AQUAM2, la prueba de ANOVA indicó que existían diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, el método SNK no hizo distinción entre cuales de los

tratamientos presentaban las diferencias. Esto es un efecto causado por la baja sensibilidad de la prueba de comparaciones múltiples con respecto a la prueba de análisis de varianza (Zar, 1984). Una conclusión clara de este trabajo es que aún cuando en algunos casos las tres réplicas utilizadas fueron suficientes para detectar el efecto de los tratamientos en algunas variables (Ej. % Lípidos, AQUAM1 y AQUAM2; Talla, AQUAM2; Cons. de O<sub>2</sub>/ind, PRE), en la mayoría de las pruebas es necesario aumentar el número de réplicas para aumentar la resolución de los tratamientos. Tomando en cuenta las consideraciones anteriores, la interpretación de los resultados que se presentan en este trabajo se basó tanto en los resultados estadísticos como en las tendencias de los valores de los promedios encontrados en los distintos tratamientos.

#### **4.2 Crecimiento y Acumulación/Utilización de Reservas**

Parte de los objetivos de este trabajo fue evaluar el efecto del agua de mar enriquecida con nutrimentos en el crecimiento, sobrevivencia, reservas endógenas y metabolismo de larvas de abulón rojo *Haliotis rufescens*. Estas larvas son normalmente consideradas como lecitotróficas, esto es, presumiblemente no se alimentan durante su desarrollo larval ya que no capturan alimento particulado del medio (Jaeckle y Manahan, 1989a). De ser esto cierto, entonces dichos organismos serían energéticamente independientes del medio y usarían una fuente de reserva energética interna, lo cual se reflejaría con la pérdida paulatina de peso orgánico durante su desarrollo (Jaeckle y Manahan, 1989b). Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que no existen diferencias significativas entre

los pesos iniciales y los pesos finales de los tratamientos en todas las pruebas (PRE, AQUAM1, AQUAM2). Tampoco se encontraron diferencias significativas en el contenido de proteínas en el tejido de los organismos, e incluso en el experimento AQUAM1, los valores muestran una tendencia a ser mayores. En donde sí se presentaron diferencias significativas entre los valores iniciales y los valores finales de los tratamientos, es en el crecimiento en talla y el contenido de lípidos (AQUAM1 y 2), siendo mayor la longitud y menor el contenido de lípidos al final de la etapa larval.

Estos resultados podrían sorprender si se parte de la base en que estas larvas no se alimentan durante el período previo a su asentamiento por su carácter de desarrollo lecitotrófico. Sin embargo, en esta clasificación no se consideró los altos niveles de carbono presentes en la materia orgánica disuelta (MOD), el cual puede ser hasta diez veces mayor que el monto aportado por el material particulado en el medio marino (Manahan, 1983). Algunos autores refieren que las larvas de abulón, así como de otros invertebrados marinos, de hecho asimilan algunos carbohidratos (Welborn y Manahan, 1990) y aminoácidos libres (Jaekle y Manahan, 1989a) entre otros componentes de la MOD. Otros estudios mas recientes (Shilling *et al*, 1996) indican que no solo utilizan estos compuestos, sino que solo una pequeña fracción de las reservas endógenas son empleadas en el desarrollo de las larvas, y que la mayoría de los requerimientos energéticos son entonces suplidos por una fuente de alimento externa.

Los resultados obtenidos en este trabajo parecen confirmar parcialmente lo reportado por los autores mencionados arriba. Ya que si bien las proteínas permanecieron relativamente constantes a lo largo del desarrollo, una fracción de lípidos endógenos fue utilizada durante ese periodo, y el balance neto se registró como crecimiento en concha y mantenimiento de la masa de tejido corporal.

En nuestro caso, los niveles de MOD en el agua fueron incrementados con la adición de glucosa y/o aminoácidos, con lo cual se esperaba que las larvas crecieran o aumentaran sus reservas energéticas. Una posible explicación del por qué no se observó un incremento en el peso, sería el que las larvas permanecieron conservadas en formol a concentración de 10% durante aproximadamente 3-4 semanas antes de su análisis en laboratorio. Se sabe que el tejido de estos organismos tiende a deshidratarse si se expone a periodos prolongados de conservación en formol a estas concentraciones (Kapisir et al, 1997; Silva, A., com. pers. FCM UABC). Sin embargo, todas las larvas destinadas al análisis de peso fueron sometidas a este proceso durante el mismo periodo de tiempo, incluyendo las muestras tomadas para los valores iniciales. De existir algún deterioro en los tejidos provocado por el uso del formol, este se aplicaría en todos los casos y el consecuente error que pudiera existir en las mediciones sería similar para todos los tratamientos, por lo que los resultados estadísticos no se alterarían de manera significativa. Una explicación que parece mas adecuada es la que propone Shilling *et al* (1996), quien refiere que el equivalente energético en peso orgánico requerido por las larvas de abulón para su desarrollo hasta su asentamiento, es de 1.3 a 1.7

µg. El que parte de esta energía no se refleje en un incremento en el peso, se explica por el alto costo energético que representa el reacomodar tejidos y crear nuevos durante el desarrollo y preparación para el asentamiento de la larva.

#### 4.3 Influencia de la MOD Adicionada

Como se puede observar, hasta este punto las variables analizadas no aportan evidencia clara que apoye la efectividad de los nutrimentos adicionados al medio de cultivo, de ser así, esto no pudo deberse a que las larvas no asimilaron la glucosa y los aminoácidos adicionados, ya que según Welborn y Manahan (1990) carbohidratos como la maltosa y la glucosa son asimilados por larvas de abulón, y según Lock (1994) y Jaeckle y Manahan (1989b) existe transporte de aminoácidos tomados del medio por estos mismos organismos. Por lo tanto, se pueden dar dos posibles explicaciones a la poca efectividad visible del incremento de MOD:

- 1). Posiblemente la concentración de los nutrimentos adicionados fue inadecuada,
- 2) La competencia de las bacterias en la captación de MOD. Como se refiere en la metodología, el criterio empleado para obtener dichas concentraciones se basó en el del Km de leucina (7.1µM) obtenido en experimentos de transporte para larvas de ostión reportado por Manahan (1990), esta concentración de 7.1µM fue la misma a la que se mantuvo a los organismos en los tratamientos de glucosa. Al respecto, Shilling *et al* (1996) refiere que en experimentos de transporte realizados con larvas de abulón *Haliotis rufescens*, se encontró que el Km de glucosa y alanina varía durante el desarrollo de estas larvas, oscilando entre 19 a 27 µM para la glucosa, y 29 a 96 µM para la alanina. Como puede verse, estas

concentraciones son considerablemente mayores a las empleadas en el presente estudio y, por tanto, el posible beneficio aportado por los nutrimentos adicionados, pudo verse enmascarado por la presencia normal de MOD en el agua de mar. Aunmas, se ha reportado que el potencial máximo de transporte de aminoácidos en larvas de moluscos es una función potencial de su peso, y el exponente es comparable al de las tasas metabólicas (Manahan 1990), por lo tanto, en un trabajo futuro sería recomendable utilizar una concentración de sustrato (aminoácidos/glucosa) en la cual las larvas alcancen la velocidad máxima de transporte ( $V_{max}$ ). De esta manera se estaría asegurando que las larvas no tendrían ninguna limitación para captar dichos nutrimentos. Con las concentraciones utilizadas en el presente estudio ( $\sim 7.1 \mu\text{M}$ ) es probable también que se haya presentado competencia de las bacterias por el alimento, ya que se ha reportado la capacidad de este grupo de adaptarse a una cinética de transporte bifásica, lo cual le permite captar eficientemente glucosa en bajas o altas concentraciones ( $K_m = 3 \text{ nM}$  y  $4 \text{ mM}$  respectivamente)(Manahan 1990).

Durante el desarrollo experimental de este trabajo, como posible prevención contra las bacterias se utilizó un antibiótico de uso probado (ver metodología), no obstante, en el transcurso de todas las pruebas (PRE, AQUAM1 y AQUAM2) y sobre todo en los tratamientos que contenían aminoácidos, se detectó un ligero olor a materia orgánica en descomposición. Esto puede indicar que, pese a las medidas de prevención tomadas, existió una proliferación de bacterias y estas, posiblemente, compitieron con las larvas por la MOD presente en el medio, ya que

a las bacterias heterotróficas se les considera como los principales usuarios de la materia orgánica disuelta en el agua de mar (Newell, 1979; Manahan y Crisp, 1982), esto debido a que se encuentran mejor adaptadas que los invertebrados marinos para asimilar sustratos disueltos a concentraciones sub-micromolares (Sepers, 1977). Además, se sabe que bacterias del género *Vibrio* spp. son comunmente encontradas en cultivos de larvas y juveniles de abulón rojo *Haliotis rufescens* (Elston y Lockwood, 1983), en algunos casos según Ebert y Houk (1983), son organismos patógenos que causan de bajas a grandes mortalidades en los cultivos, y aunque estos pueden ser efectivamente tratados con algunos antibióticos como el Neomycin sulfato, esto no asegura la eliminación total de los microorganismos (Ebert y Houk, 1984).

#### **4.4 Sobrevivencia**

En los resultados de sobrevivencia se observa que, aunque la prueba estadística no registró diferencias significativas entre el valor inicial y los valores finales de los tratamientos, sí se nota una tendencia en el tratamiento de glucosa (G) a presentar los valores mas altos y a los tratamientos de aminoácidos (AA y GAA) a presentar los mas bajos (ver gráfica 3), incluso estos porcentajes de sobrevivencia en el tratamiento con glucosa son mayores al 90% reportado para larvas de *Haliotis* spp por Ebert y Houk (1984). Esto puede compararse con los resultados obtenidos por Chacón (1998), quien realizó un trabajo similar al presentado aquí pero en los estadios de postlarva a juvenil, período en el que estos organismos presentan sus mayores mortalidades (sobrevivencia de hasta menos del 10%,

según Ebert y Houk, 1984). Durante el estudio referido, en el tratamiento de glucosa se encontraron también los mayores porcentajes de sobrevivencia (18.3% en la prueba preliminar, 12.2 y 13.18% para las pruebas experimentales 1 y 2 respectivamente), mientras que los tratamientos con aminoácidos presentaron los menores (entre 02 y .96%). Esto podría referir, entonces, que probablemente el tratamiento con glucosa sí propició un efecto benéfico en las larvas de abulón y que los tratamientos con aminoácidos presentaron el efecto contrario. Esto no quiere decir que en estudios posteriores se deba descartar a los aminoácidos como un posible tratamiento benéfico para las larvas de abulón, sino que se debe estudiar con cuidado la cantidad y el tipo de aminoácidos que se emplearon en este estudio para determinar otras posibles combinaciones que no ocasionen un efecto negativo, para ello hay que considerar lo que refieren al respecto Manahan y Jaeckle (1992), ellos sugieren que la alteración de la química orgánica del agua de mar puede afectar el metabolismo de las larvas y postlarvas de abulón. Por tanto, se deben controlar la presencia o ausencia de compuestos orgánicos disueltos en el agua de mar durante el cultivo de estos organismos.

#### **4.5 Tasa Metabólica**

En párrafos anteriores se ha hecho referencia a que, en los resultados de peso y talla obtenidos en la prueba preliminar, no se detectaron diferencias significativas entre los valores iniciales y los valores finales de los tratamientos. Tampoco se observaron diferencias significativas en los resultados de consumo de oxígeno durante la misma prueba, excepto entre el valor inicial y el control AS en la

medición de consumo de oxígeno por organismo. De hecho, los valores encontrados en estas tres variables (peso orgánico, talla y consumo de oxígeno) durante la prueba preliminar, son equiparables con los valores de las pruebas experimentales AQUAM 1 y 2 (ver Anexos V, VI y Vii). En el caso de las variables de crecimiento, el que no existan cambios en el peso de estos organismos indica, como se refiere al inicio de estas discusiones, que las larvas no consumen mas que en una proporción pequeña sus reservas endógenas, esta proporción puede obtenerse si comparamos el consumo de oxígeno contra el decremento en las reservas lipídicas en base a sus equivalentes oxicalóricos, ya que el consumo de oxígeno puede ser utilizado como una medida del gasto energético de los animales (Schmidt-Nielsen, 1976). Por otro lado, los lípidos son considerados como uno de los principales sustratos utilizados como material de reserva en los animales (Chu y Webb, 1984) y fue, además, la única variable en la que los resultados fueron netamente contrarios a lo esperado (ver anexo VII). Para calcular la contribución de los lípidos al gasto metabólico, se calculó en primer lugar, las medias del consumo de oxígeno final y el decremento de lípidos en las larvas de la prueba AQUAM2. Ya que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos, se pueden utilizar para ello los valores promedio finales de consumo de oxígeno para cada tratamiento como si fueran réplicas uno del otro, esto es:

$$X = (\text{Prom VO}_{2AC} + \text{Prom VO}_{2G} + \text{Prom VO}_{2AA} + \text{Prom VO}_{2GAA}) / 4$$

posteriormente, con las medias obtenidas se obtuvo el valor energético equivalente para ambos casos. Para esto se utilizó los equivalentes calóricos que reporta

Gnaiger (1983) para lípidos y los equivalentes oxicalóricos reportados para el mismo sustrato por el mismo autor, estos son:

$$\text{Eq calórico} = 39.5 \text{ kJ/g líp.}$$

$$\text{Eq oxicalórico líp} = 441 \text{ kJ/ mol O}_2$$

Como el consumo de oxígeno se encuentra referido a 1 hora, el resultado se multiplicó por 24 para referirlo al consumo por día. En cuanto al consumo de lípidos, se obtuvo la diferencia entre el valor de lípidos totales inicial y el final, esto con el fin de conocer la pérdida de lípidos neta durante los 4 días (ver metodología) que estuvieron las larvas sometidas a los tratamientos. Para estandarizar unidades el valor obtenido se dividió entre 4 para referir la pérdida de lípidos a un día. Finalmente, el porcentaje de consumo de las reservas endógenas se obtuvo dividiendo el equivalente energético de consumo de oxígeno entre el equivalente energético de pérdida de lípidos multiplicándolo por cien.

El porcentaje de consumo de reservas endógenas obtenido durante la prueba AQUAM2 fue de 45%, esto nos indica que, efectivamente, los organismos obtuvieron el resto de su energía (55 %) de una fuente externa de alimento.

#### **4.6 Prueba Preliminar**

Como se refiere en la metodología, uno de los objetivos de la prueba preliminar era obtener datos adicionales del desarrollo de las larvas en condiciones de cultivo en las que la única fuente de MOD presente fuera la adicionada. Sin embargo, existe una clara evidencia como se discute párrafos arriba que, por como lo refiere el que no se encontraron diferencias significativas entre los valores

iniciales de peso orgánico con respecto a los finales, en realidad sí existió una fuente alterna de MOD aún en el control de agua sintética, en donde se suponía no debía encontrarse ningún nutrimento disuelto. Una posible explicación a este fenómeno: durante el desarrollo de la prueba preliminar se presentó una gran mortalidad de larvas aparentemente producida por una infección provocada por bacterias del género *Vibrio* spp, ya que se caracterizó por la aparición de aglutinamientos de larvas muertas en las paredes de los recipientes de cultivo, los cuales son síntomas que describen Ebert y Houk (1984) para infecciones de este tipo en cultivos de larvas de abulón. De cualquier manera esto provocó, entre otras cosas, que la sobrevivencia de las larvas en esta fase no pudiera ser medida adecuadamente (ver metodología), y además, que existiera una descomposición de materia orgánica dentro de las cubetas de cultivo, lo cual pudo ser la posible fuente de MOD que emplearon las larvas para su desarrollo.

## **CONCLUSIONES**

- Los experimentos demostraron que las larvas de abulón se alimentan de materia orgánica disuelta en el agua de mar para su desarrollo.
- Las concentraciones de nutrimentos empleadas en el agua de mar no fueron suficientes para aumentar las reservas endógenas de los organismos.
- El tratamiento con glucosa propició un efecto favorable en la sobrevivencia de las larvas.
- Los tratamientos de aminoácidos provocaron un ligero decremento en la sobrevivencia de los abulones.

## **RECOMENDACIONES**

Para estudios posteriores, se recomienda incrementar las concentraciones de los nutrimentos empleados.

Los tratamientos con aminoácidos no deben ser descartados como posibles fuentes adecuadas para incrementar las reservas endógenas de los organismos, solo se debe hacer una selección mas cuidadosa de los mismos.

## VII. LITERATURA CITADA

A. O. A. C. (1990). Official Methods Of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. K. Helrich (ed.). pp. 74. Association of Official Analytical Chemists Inc. Alington, Virginia, USA.

Bevelander, G (1988). Abalone: gross and fine structure. The Boxwood Press. Pacific Grove, Ca. USA.

Bligh, EG y Dyer, WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., 37: 911-917.

Bricelj, M y Garcia-Esquivel, Z (1995). A comprehensive investigation of larval development and mortality in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Reporte final. Northeast Regional Aquaculture Center, University of Massachusetts at North Dartmouth, MA. 13p.

Chacón, AO (1988). Respuesta metabólica de poslarvas de abulón *Haliotis rufescens* con diferentes nutrimentos disueltos en el agua. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, UABC. Ensenada, México.

Gnaiger, E (1983). Appendix C: Calculation of Energetic Biochemical Equivalents of Respiratory Oxygen Consumption. Polarographic Oxygen Sensors. Ed., Gnaiger/Forstner. Berlin, Pp: 337-345.

Chu, FLE y Weebb, KL (1984). Polyunsaturated fatty acids and neutral lipids in developing larvae of the oyster *Crassostrea virginica*. *Lipids*, 19: 815-820.

Davis, Richards, Haaker y Parker (1992). Abalone population declines and fishery management in southern California. pp. 237-249. En: Abalone of the world; Biology, Fisheries and Culture. Eds by S.A. Shepherd

Ebert, EE y Houk, JL (1984). Elements and innovations in the cultivation of red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture.*, 39: 375-392.

Ferguson, JC (1982). A comparative study of the net metabolic benefits derived from the uptake and release of free amino acids by marine invertebrates. *Biol. Bull.* 162: 1-7.

Fleming, AE, Van Barnereid, RJ y Hone, PW (1996). The development of artificial diets for abalon: A review and future directions. *Aquaculture.* 140: 5-53

Grant, JF (1981). Abalone culture in Japan: development and current commercial practice. *Tas. Fish. Res.*, 23: 1-17.

Hooker, N y Morse, DE (1985). Abalone: The emerging development of commercial cultivation in the United States. P: 365-413 In. Hunger, JV and Brown, EE. *Crustacean and mollusk aquaculture in the United States*. AVI Publishers, Westport, USA.

Imai, T (1967). Mass production of molluscs by means of rearing the larvae in tanks. *Venus.*, 25(3): 159-167.

Jaeckle, WB y Manahan, DT (1989a). Feeding by a "nonfeeding" larva: uptake of dissolved amino acids from seawater by lecithotrophic larvae of the gastropod *Haliotis rufescens*. *Mar. Biol.*, 103: 87-94.

Jaeckle, WB y Manahan, DT (1989b). Growth and energy imbalance during development of a lecithotropic molluscan larva (*Haliotis rufescens*). *Biol. Bull.* 177: 237-246.

Kan-no, H (1975). Recent advances in abalone culture in Japan. Proceedings of the First International Conference on Aquaculture Nutrition. University of Delaware: 195-211.

- Kapiris, K, Miliou, H y Moraitou-Apostolopoulou, M (1997). Effects of formaldehyde preservation on biometrical characters, biomass and biochemical composition of *Arcatia clausi* (Copepoda, Calanoida). Helgoländer Meeresunters., 51: 95-106.
- Lock, M (1994). Dynamics of particulate and dissolved organic matter over the substratum of water bodies. Pp-137-155. En: Wotton (Ed). The biology of particles in aquatic systems. 2da. Edicion. CRC press, inc
- Manahan, DT (1983). Nutritional implications of dissolved organic material for laboratory culture of pelagic larvae. En: Berg Carl (Ed). Culture of marine invertebrates. pp. 179-190.
- Manahan, DT (1989). Aminoacid fluxes to and from seawater in axenic veliger larvae of a bivalve (*Crassostrea gigas*). Mar. Ecol. Prog. Ser., 53: 247-255.
- Manahan, DT (1990). Adaptations by invertebrate larvae for nutrient acquisition from seawater. Amer. Zool. 30: 147-160.
- Manahan, DT y Crisp, DJ (1982). The role of dissolved organic material in the nutrition of pelagic larvae: amino acid uptake by bivalve veligers. Amer. Zool., 22: 635-646.

Manahan, DT y Jaeckle, WB (1992). Implications of dissolved organic material in seawater for the energetics of abalone larvae *Haliotis rufescens*: a review. pp. 95-106. En: Abalone of the world; Biology, Fisheries and Culture. Eds. by S. A. Shepherd.

McBride, CS (1997). Abalone aquaculture in California. Abstract. Third International Abalone Symposium, Biology, Fisheries and Culture. October 26-31, Monterey, California USA

Pequignant, E (1973). A kinetic and autoradiographic study of the direct assimilation of amino acids and glucose by organs of the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol., 19: 227-224.

Perez-Muñoz, G (1995). El cultivo de abulón en México: desarrollo histórico, estado actual y sus perspectivas. Tesis de Lic. Oceanología. U.A.B.C.

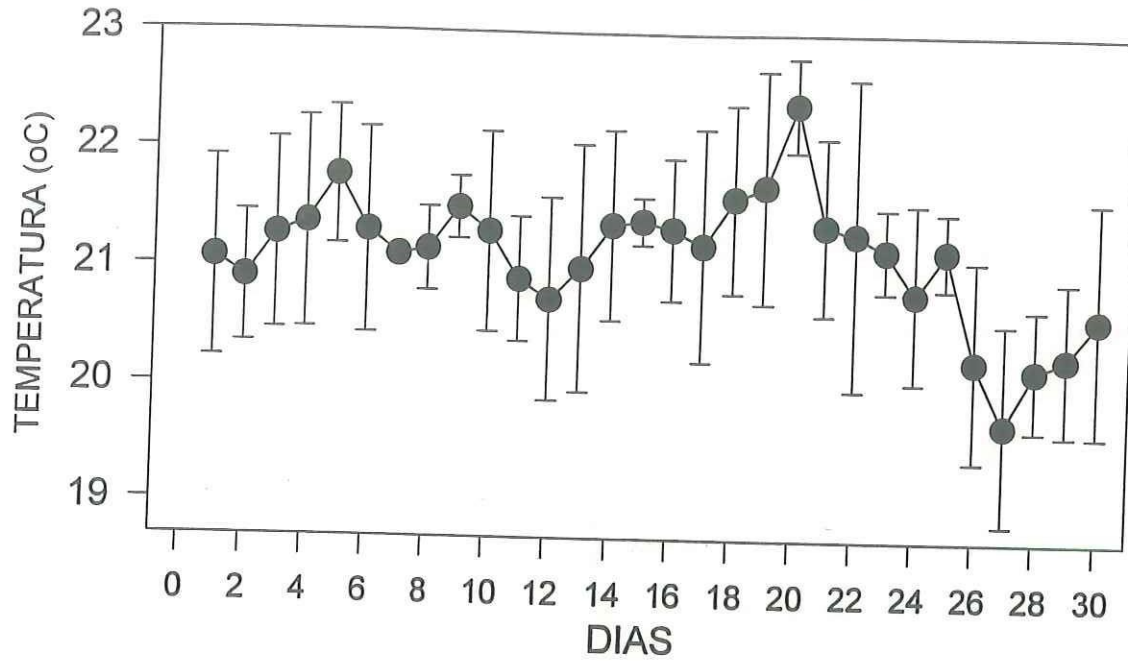
Salas, AE (1995). El efecto de la edad de la larva del abulón *Haliotis rufescens* en la inducción a su metamorfosis. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Marinas, UABC.

- Salas-Garza, A y Searcy-Bernal, R (1992). Development and present status of abalone culture on México. pp. 538-547. En *Abalone of the World; Biology Fisheries and Culture*. Eds by S. A. Shepherd, M. J. Tegner and S. A. Guzmán del Proó.
- Schmidt-Nielsen (1976). *Fisiología animal*. Ediciones Omega, S.A., Barcelona España. Pp- 499.
- Searcy, BR (1994). Statistical power and aquacultural research. *Aquaculture*. 127: 371-338.
- Sepers, A B (1997). The utilization of dissolved organic compounds in aquatic environments. *Hydrobiology* 52: 39-54.
- Shilling, FM, Hoegh-Guldberg, O y Manahan., DT (1996). Sources of energy for increased metabolic demand during metamorphosis of the abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca). *Biol. Bull.* 191: 402-412.
- Tenger, DeMartini y Karpov (1992). The California red abalone fishery: a case study in complexity. pp. 370-383. En: *Abalone of the world; Biology, Fisheries and Culture*. Eds by S.A. Shepherd.

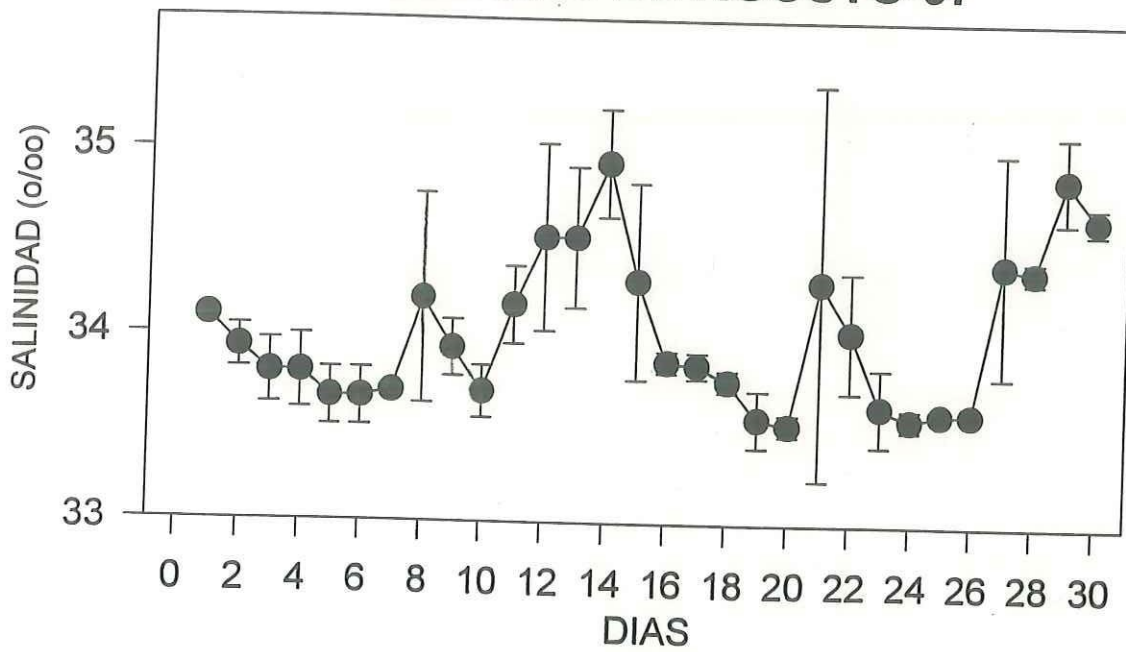
Welborn, JR y Manahan, DT (1990). Direct measurements of sugar uptake from seawater into molluscan larvae. *Marine Ecology Progress Series*. 65: 233-239.

Zar, JH (1984). *Biostatistical Analysis*. 2da. Edicion. Prentice Hall, Inc., New Jersey. Pp-718.

## GRAFICA DE TEMPERATURAS DEL MES DE AGOSTO-97



## GRAFICA DE SALINIDADES DEL MES DE AGOSTO-97



## ANEXO II

### DATOS CRUDOS DE LA PRUEBA PRELIMINAR.

La tabla muestra los valores encontrados en cada tratamiento para todas las variables utilizadas.

VARIABLE	TRATAMIENTO					
	INI	AC	AS	G	AA	GAA
TALLA ( $\mu\text{m}$ )	273.333 273.166	277.166 277.166	279.166 280.833	276.500 280.333	280.833 276.666	282.833 277.833
PESO ORGANICO ( $\mu\text{g}$ )	1.34 1.23	1.10 1.05 1.32	1.09 1.12 1.33	1.20 1.31 1.26	1.17 1.14 1.20	1.20 1.20 1.25
PESO SECO ( $\mu\text{g}$ )	0.83 0.74	0.92 0.84 1.36	0.77 0.86 0.77	1.44 1.51 1.36	1.50 0.61 0.88	0.88 0.65 0.93
O <sub>2</sub> (pmol/larva/h)	192.30 179.11 169.08	160.3458 131.9959 95.95041	97.85 86.53 76.60	113.25 88.27 103.81	230.45 139.08 263.52	263.52 156.54 112.76
O <sub>2</sub> ( $\mu\text{mol/h/ gr tejido}$ )	149.65 133.66 137.47	145.7689 125.7104 72.6897	89.77 77.26 57.60	94.38 67.38 82.39	196.96 122.00 219.60	133.80 90.21

### ANEXO III

#### DATOS CRUDOS DE LA PRUEBA EXPERIMENTAL No. 1.

La tabla muestra los valores encontrados en cada tratamiento para todas las variables utilizadas.

VARIABLE	TRATAMIENTO				
	INI	AC	G	AA	GAA
TALLA ( $\mu\text{m}$ )	270.0907	271.1897	275.4180	273.5915	272.2216
	268.1881	267.9598	275.8786	275.3419	271.3845
	269.2536	271.0040	273.5154	272.4499	271.004
PESO ORGANICO ( $\mu\text{g}$ )	1.397849	1.105991	1.276297	1.359223	1.408046
	1.062417	1.4081163	1.283498	1.193838	1.190476
	1.375000	1.3149985	1.715686	1.285714	1.333333
PESO SECO ( $\mu\text{g}$ )	0.107527	0.122888	0.406732	0.095146	0.172414
	0.132802	0.020408	0.409027	0.089859	0.12987
	0.125496	0.061162	0.414624	0.09	0.061189
SOBREVIVENCIA (%)	100	100	100	100	70.58
	100	93.33	100	63.15	93.33
	100	1000	100	88.88	64.7
O <sub>2</sub> pmol/larva/h	100.6706	93.23516	84.77428	101.3817	84.86976
	98.487	99.949336	84.64883	88.94567	94.334555
	123.8173	82.8628	93.76654	94.62142	91.74387
O <sub>2</sub> $\mu\text{mol/h/gr}$ tejido	72.01823	84.30012	66.42204	74.58797	60.275
	92.70089	70.97853	65.95167	74.503995	79.24102
	90.04894	63.01427	54.65	73.594	68.8079
PROTEINAS %/larva/peso tejido	27.83231	27.70557	33.27605	22.96026	25.64812
	29.53661	24.74652	30.2836	24.17659	25.3915
	20.04529	24.96727	21.48862	21.41853	
LIPIDOS %/larva/peso tejido	19.26	12.37837	15.02338	11.60517	14.76682
	17.15058	11.46377	14.75955	14.48806	16.26299
	17.91485	14.5106	14.86111	15.4115	15.89378
PROTEINAS $\mu\text{g/}$ larva	0.389054	0.306421	0.424701	0.312081	0.379388
	0.313802	0.348471	0.388689	0.288629	0.305335
	0.275623	0.328316	0.368677	0.275381	0.287171
LIPIDOS $\mu\text{g/}$ larva	0.269226	0.136904	0.1981743	0.15774	0.207924
	0.182211	0.161429	0.189439	0.172964	0.193607
	0.246329	0.190812	0.25497	0.198143	0.211917
SOBREVIVENCIA DE POSTLARVAS	-	0	0	0	0
	-	0	0	0	0
	-	0.108475	0.034783	0	0

## ANEXO IV

### DATOS CRUDOS DE LA PRUEBA EXPERIMENTAL No. 2.

La tabla muestra los promedios de cada tratamientos para todas las variables utilizadas.

VARIABLES	TRATAMIENTO				
	INI	AC	G	AA	GAA
TALLA ( $\mu\text{m}$ )	271.3845	275.3419	276.7878	273.8959	264.0025
	266.3671	227.7224	274.0481	275.4941	265.6006
	265.9812	275.5702		275.1136	3266.590
PESO ORGANICO ( $\mu\text{g}$ )	1.223776	1.168831	1.102123	1.138561	1.355932
	1.352313	1.104651	1.252336	1.353211	1.190476
	1.162791	1.059113		1.235839	1.105845
PESO SECO ( $\mu\text{g}$ )	0.061169	0.238095	0.212336	0.150376	0.123267
	0.071174	0.174419	0.056075	0.022936	0.119048
	0.05814	0.336617		0.082389	0.100531
SOBREVIVENCIA (%)	100	90.27	100	73.5	75
	100	80	98.27	97.5	88.23
	100	93.75		71.82	72.91
O <sub>2</sub> pmol/larva/h	88.93614	88.1813	176.048	87.67726	129.3475
	116.51467	85.14731	192.834	79.17595	105.3752
	97.71291	37.5839		107.8493	125.0169
O <sub>2</sub> $\mu\text{mol/h/gr}$ tejido	72.67517	75.444	159.7353	77.00711	95.3938
	86.161	77.08072	69.31532	58.50968	88.515
	84.0331	35.4862		87.26808	113.051
PROTEINAS %/larva/peso tejido	23.46597	25.1565	26.80846	27.66796	22.36698
	23.5278	25.23381	22.26453	24.19015	24.93401
	24.20576	30.45466		21.71578	
LIPIDOS %/larva/peso tejido	17.3382	15.10014	14.77003	14.98207	13.82284
	19.10331	16.99248	13.3763	14.91775	14.89024
	17.84394	17.76548		13.38889	15.23543
PROTEINAS $\mu\text{g/ larva}$	0.287171	0.294037	0.295462	0.315017	0.300281
	0.31817	0.278746	0.278827	0.327344	0.296833
	0.281462	0.322549		0.268372	0.247006
LIPIDOS $\mu\text{g/ larva}$	0.212181	0.176495	0.162784	0.17058	0.187428
	0.258337	0.187708	0.167516	0.201869	0.177265
	0.207488	0.188157		0.165435	0.16848
SOBREVIVENCIA DE POSTLARVAS		0.974853	0.54	0.897959	0
		1.175	2.2590.82	0	0
		0	0	0	0