

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**



**UTILIZACIÓN DE MICROPARTICULAS INERTES Y ALIMENTACIÓN EN PULSOS COMO ALTERNATIVAS PARA EL CULTIVO DE POSLARVAS TEMPRANAS DEL OSTION, *Crassostrea gigas*.**



**TESIS**  
**Que para obtener el título de**  
**OCEANOLOGO**  
**PRESENTA:**  
**Circe Esmeralda Badillo Salas**

**Ensenada Baja California, Abril de 2006**

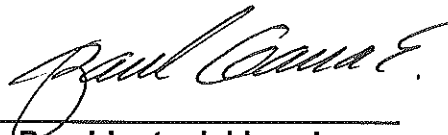
## RESUMEN

Se evaluó la interacción entre dos sistemas de cultivo, sistema cerrado (CERR) y sistema de pulsos (PUL), en conjunto con diferentes raciones alimenticias, la evaluación en cada sistema fue en términos de longitud (L), Peso Seco (PS), Peso Orgánico (PO), contenido de Carbono orgánico y Nitrógeno orgánico así como porcentaje de mortalidad acumulativa, en poslarvas de ostión japonés *Crassostrea gigas*, durante 28 días. Como alimento natural se utilizó la microalga *Thalassiosira pseudonana* contra alimento formulado. Las raciones alimenticias se hicieron en diferentes proporciones (100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 100:0), cada una con cuatro replicas en recipientes de 1.5 L. El alimento, en el sistema de pulsos (PUL) se ofreció durante 3 horas y después se mantuvo con flujo abierto las subsecuentes 21 horas y en el sistema cerrado (CERR) se renovó el alimento cada 24 horas. Cada siete días se determinó la longitud (L), Peso Seco (PS), Peso Orgánico (PO), contenido de Carbono orgánico y Nitrógeno orgánico así como la mortalidad acumulativa. Los organismos promediaron una talla inicial de  $1.98 \pm 0.040$  mm,  $0.41 \pm 0.0052$  mg peso seco, y  $45.0 \pm 0.8$   $\mu$ g peso orgánico. Las poslarvas alimentadas en el sistema CERR, con la proporción 100:0 M:A (Microalga:Alimento), presentaron mayor talla ( $3.8 \pm 0.06$  mm), PS ( $2.99 \pm 0.17$  mg) y PO ( $357.78 \pm 3.15$   $\mu$ g.) que las poslarvas alimentadas con alimento microparticulado. En lo que respecta al porcentaje de mortalidad no hubo diferencias significativas entre los tratamientos 100:0 M:A y 0:100M:A. En el sistema PUL, el mejor tratamiento fue la proporción 50:50 M:A ( $2.96 \pm 0.17$  mm, PS de  $2.011 \pm 0.28$  mg y un PO de  $166.39 \pm 29.23$   $\mu$ g). Los tratamientos difirieron significativamente del control de agua de mar. En este sistema de PUL, el porcentaje de mortalidad fue menor ( $4.09 \pm 2.4$ ) en la proporción 0:100 M:A. La razón C:N de tejido obtenida en este estudio (3.74-5.23) no mostró variaciones significativas en los tratamientos y estos valores coinciden con los reportados para esta especie. Con base en los resultados obtenidos, se concluye que el alimento inerte usado en este experimento no es recomendable en sistema cerrado pero en un sistema de pulsos combinado con microalga es una opción para la alimentación de poslarvas de *C. gigas*

UTILIZACIÓN DE MICROPARTICULAS INERTES Y ALIMENTACIÓN EN PULSOS COMO ALTERNATIVAS PARA EL CULTIVO DE POSLARVAS TEMPRANAS DEL OSTIÓN, *Crassostrea gigas*.

TESIS  
QUE PRESENTA:  
Circe Esmeralda Badillo Salas

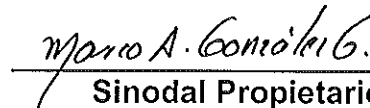
Aprobda por:



Presidente del jurado  
Dr. Zaúl García Esquivel



Sinodal Propietario  
M.C. Enrique Valenzuela Espinoza



Sinodal Propietario  
M.C. Marco Aurelio. González Gómez

## DEDICATORIA

A los mejores padres del mundo que siempre me han apoyado hasta en mis más osadas locuras, gracias Pa, gracias Ma.

A mis hermanitos Güera y Germo por ser mi ejemplo a seguir.

Señor:

Ayúdame a encontrar la fortaleza del viejo roble,  
para que ningún triunfo me envanezca.

La alegría de la naturaleza,  
para que ninguna soledad me abata,  
la libertad del ave,  
para elegir mi camino.

Y la voluntad de un expedicionario para seguir  
Siempre adelante y servir.

Así sea

Baden Powell

## AGRADECIMIENTOS

### Los formales...

A La universidad Autónoma de Baja California por la beca de tesis en el proyecto de la 10s Convocatoria UABC titulado "Uso de micropartículas inertes como fuente de alimento para poslarvas tempranas del ostión, *Crassostrea gigas*"

Al Dr. Zaúl García Esquivel por la paciencia y su gran ayuda en la realización de este trabajo.

Al M.C. Marco Aurelilo González por explicarme con manzanas cada paso del experimento.

Al M.C. Enrique Valenzuela por la elaboración del alimento y su ayuda.

Al M.C. Jaime González Muñoz por todo el apoyo y la dedicación durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Casandra Anguiano Beltrán por su ayuda en los conteos de organismos.

Al técnico Francisco Valenzuela Buriel del departamento de Acuicultura de CICESE por la realización de los esquemas de éste trabajo.

### Los personales...

A mi verdadero y único amor, M.C. Juan Delfino Salcedo Badillo, por ser mi inspiración todo el tiempo (tam, tem, tdm,tnm).

A mis tios Tita y José Luis Román por participar en mi vida durante la última etapa de mi carrera.

A la familia de con la que compartí momentos inolvidables mis queridos amigos Citlali, Dante, Emmanuel, Federico, Gloria, Hiram, Marcela, Mariana, Minka, Nayeli, Román, Salvador, Tihui, Viviana, a todos ellos gracias por su amistad.

4.3.2. Preparación y caracterización del alimento inerte	22
4.4. Análisis proximal del alimento inerte	23
4.5. Alimentación de poslarvas	25
4.6. Evaluación del crecimiento de poslarvas de <i>Crassostrea gigas</i>	26
4.6.1. Crecimiento y mortalidad de poslarvas de <i>C. gigas</i>	26
4.7. Carbono orgánico, Nitrógeno orgánico y Proteínas totales	28
4.8. Análisis estadístico	29
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
5.1. Alimento inerte	30
5.2. Crecimiento de poslarvas de <i>Crassostrea gigas</i>	31
5.2.1. Sistema Cerrado	31
5.2.2. Sistema de Pulsos	33
5.3. Mortalidad	37
5.4. Carbono orgánico, Nitrógeno orgánico	39
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
6.1. Alimento	40
6.2. Efecto de los sistemas y dietas en el crecimiento de poslarvas de <i>C. gigas</i>	42
6.2.1. Sistema cerrado (CERR)	42
6.2.2. Sistema de pulsos (PUL)	43
6.3. Mortalidad	44
6.4. Carbono orgánico, Nitrógeno orgánico	45
<b>7. CONCLUSIÓN</b>	<b>47</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>48</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Tratamientos de prueba (proporción de alimento Microalga: Alimento inerte, M:A) usados en el experimento, para determinar el efecto de microdietas formuladas sobre el crecimiento de poslarvas de ostión <i>C. gigas</i> . El alimento se ofreció en pulsos (PUL) de 3 horas por día con flujo abierto las subsecuentes 21 horas, en sistema cerrado (CERR) con renovación cada 24 horas.	18
2	Ingredientes contenidos en el alimento inerte para poslarva de <i>C. gigas</i> .	24
3	Raciones experimentales usadas para cada tratamiento en la botella (M=microalga: A=alimento inerte) de alimentación en <i>C. gigas</i> .	26
4	Talla y pesos finales de poslarvas de <i>C. gigas</i> alimentadas con las dietas de 100% microalga (100:0 M) y 100% dieta inerte (0:100 A), del sistema CERR.	32
5	Ecuaciones de ajuste lineal de tallas ( $\mu\text{m día}^{-1}$ ), peso seco ( $\mu\text{g día}^{-1}$ PS) y peso orgánico ( $\mu\text{g día}^{-1}$ PO) vs tiempo. La pendiente representa la tasa de crecimiento ( $\mu\text{g día}^{-1}$ ) de poslarvas de <i>C. gigas</i> alimentadas con las dietas de 100% microalga (100:0 M) y 100% dieta inerte (0:100 A), del sistema CERR.	32
6	Ecuaciones de ajuste lineal de tallas ( $\mu\text{m}$ ) La pendiente representa la tasa de crecimiento ( $\mu\text{m día}^{-1}$ ) de poslarvas de <i>C. gigas</i> alimentadas con pulsos (PUL) de 3 horas diarias, con diferentes proporciones de microalga <i>Thalassiosira pseudonana</i> y alimento microparticulado.	35

7	Ecuaciones de ajuste lineal del peso seco (ps) y peso orgánico (po) vs tiempo. La pendiente representa la tasa de crecimiento ( $\mu\text{g día}^{-1}$ ) de poslarvas de <i>C. gigas</i> alimentadas con pulsos (PUL) de 3 horas diarias, con diferentes proporciones de microalga <i>Thalassiosira pseudonana</i> y alimento microparticulado	35
8	Porcentaje de mortalidad acumulada en poslarvas de <i>C. gigas</i> alimentadas con las dietas de 100% microalga (100:0 M:A) y 100% dieta inerte (0:100 M:A), del sistema CERR y sistema PUL de 3 horas diarias, con diferentes proporciones de microalga <i>Thalassiosira pseudonana</i> y alimento microparticulado.	38
9	Contenido absoluto de C y N ( $\mu\text{g/ind}$ ) en organismos completos, tejido y concha de <i>C. gigas</i> , para tratamientos del sistema PUL, con diferentes proporciones de microalga <i>Thalassiosira pseudonana</i> y alimento microparticulado.	39

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Fig. 1	Unidades experimentales (botellas de refresco sin fondo) utilizadas para el cultivo de poslarvas de <i>C. gigas</i> , aforadas a 1.5 L.	19
Fig. 2	Distribución del tamaño de partícula de alimento inerte ( $\mu\text{m}$ ) utilizado en los experimentos de alimentación de poslarvas de <i>C. gigas</i> .	30
Fig. 3	Cambios temporales promedio de la longitud (mm) (a), peso seco (mg ps) (b) y peso orgánico ( $\mu\text{g}$ po) (c) de poslarvas de <i>C. gigas</i> alimentadas con pulsos (PUL) de 3 horas diarias, con diferentes proporciones de microalga <i>Thalassiosira pseudonana</i> y alimento microparticulado, las barras verticales indican el error estándar.	36

# UTILIZACIÓN DE MICROPARTICULAS INERTES Y ALIMENTACIÓN EN PULSOS COMO ALTERNATIVAS PARA EL CULTIVO DE POSLARVAS TEMPRANAS DEL OSTIÓN, *Crassostrea gigas*.

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde 1984 la producción acuícola ha aumentado a una tasa media anual de casi 10%, en comparación con el 3% correspondiente a la carne de bovino y 1.6% de la pesca (FAO, 2000). En 1997 la producción acuícola mundial total fue de 35 millones de toneladas (incluyendo animales y plantas), donde el 21% (7.4 millones de toneladas) corresponden a moluscos bivalvos, de las cuales el ostión japonés (*Crassostrea gigas*) contribuye con el 39% (2.92 millones de toneladas) (FAO, 2000).

El ostión japonés *Crassostrea gigas* ha sobresalido por la demanda comercial, especialmente en Japón y en E.U.A. A raíz de su introducción en el estado de Washington en 1902 y a nuestro país en 1973 en bahía de San Quintín, esta especie ha llegado a ser uno de los moluscos bajo cultivo más importantes en el Pacífico (Fernández-García, 1984).

El cultivo comercial de moluscos bivalvos depende obligadamente de la producción masiva de microalgas para alimentar larvas hasta su etapa pre-metamórfica. En el caso específico del ostión y almejas, la necesidad de alimento vivo se extiende en muchos casos hasta la etapa poslarval temprana, debido a que los ostiones se cultivan "libres" de sustrato ("ostiones individuales"), lo que implica el mantener poslarvas de hasta 2 o 3 mm en la granja ostrícola. Lo anterior ha planteado un reto tecnológico importante para

disminuir los costos de producción, ya que por una parte la demanda de alimento de los organismos aumenta exponencialmente con el aumento de la talla, y por otra parte las poslarvas tempranas (400 a 2000  $\mu\text{m}$ ) deben cultivarse en el laboratorio, debido a que aún no existen metodologías eficientes que permitan cultivar esos estadios en el campo. Los costos de producción de alimento (microalgas) en granjas comerciales varían entre \$50 y \$200 dólares/kg de peso seco de las microalgas, lo que equivale a un 20-50% del costo de operación (Coutteau y Sorgeloos, 1992).

La producción de semillas de ostión de buena calidad a un precio competitivo es prioritaria para las granjas productoras de moluscos (Soudant *et al.* 2000). Y la disponibilidad de una dieta diferente al fitoplancton vivo para el cultivo de moluscos bivalvos podría contribuir a reducir el costo de moluscos bivalvos en las granjas comerciales (Cotteau y Sorgeloos, 1992).

Hasta ahora la producción de microalgas como alimento vivo garantiza mejor crecimiento y sobrevivencia de los organismos en comparación con formulas alternas (Laing y Millican, 1992; Cordero-Esquivel y Voltolina, 1994).

En las últimas dos décadas se han realizado esfuerzos significativos para reemplazar a las microalgas vivas, así como mejorar los sistemas de producción con mejor rentabilidad (Brown, 2002). Algunas propuestas son: algas cultivadas heterotróficamente (Laing y Millican, 1986), emulsiones lipídicas (Cotteau y Sorgeloos, 1992), levaduras, bacterias, microencapsulados, alga liofilizada, productos basados en hongos thraustochytridos, concentrados

de microalgas, el uso de estos sustitutos ha dado resultados variables dependiendo de la especie y la edad (Robert y Trintagnac, 1997; Knauer y Southgate, 1999). La sustitución total de fitoplancton fresco por otro tipo de alimento aún no se ha alcanzado. Actualmente solo se ha sustituido entre el 40-50% de alimento fresco (Albentosa *et al.* 1997).

Existen dos líneas de trabajo enfocadas al desarrollo de alimento inerte para moluscos bivalvos: Una es el desarrollo de micropartículas de composición específica para estudiar los requerimientos de micro y macronutrientes en los organismos, y otra es el desarrollo de micropartículas como alimento para la producción masiva de organismos. En el primer caso se han desarrollado microcápsulas de proteína microenlazada y/o microenrejada que sirven como medio para transportar lípidos y compuestos hidrosolubles de alto peso molecular, tales como proteínas y carbohidratos (Langdon, 2003). Asimismo, se han desarrollado cápsulas con cubierta lipídica, microesferas lipídicas y liposomas para embeber y transportar moléculas de bajo peso molecular y micronutrientes hidrosolubles tales como vitaminas y aminoácidos (Soudant *et al.* 2000; Langdon, 2003).

Los alimentos disponibles para bivalvos en el mercado se basan comúnmente en microalgas secas (Cell Systems Ltd), pasta de microalgas (Coast Oyster Co.), microcápsulas (Frippak Feeds), algas secas producidas heterotróficamente (Algamac 2000) y dietas a base de levaduras (Artemia Systems N.V.S.A.). Hasta ahora estos productos no han sido satisfactorios

(Cotteau y Sorgeloos, 1992; Salinas-Ordaz, 1999; Ponis *et al.* 2003). A esto se suma el alto costo (ej. \$ 50.00 U.S el kilo de Algamac 2000) lo que hace incosteable su uso en criaderos comerciales, por lo cual es necesario continuar explorando alternativas para reemplazar/complementar a las microalgas vivas como fuente de alimento en estadios poslarvales tempranos de moluscos.

En condiciones naturales los moluscos bivalvos se alimentan de partículas inorgánicas, microalgas, detritus, bacterias y otras micropartículas orgánicas (Bayne y Newell, 1983). Lo anterior sugiere que el mayor reto en la producción de alimento inerte para bivalvos es encontrar y/o elaborar partículas con características adecuadas para su aprovechamiento como tamaño microscópico, alta calidad nutricional y alta estabilidad. Las aproximaciones utilizadas hasta ahora para reemplazar el alimento vivo se han basado en el uso de monodietas microparticuladas (Albentosa, 1994; Salinas-Ordaz, 1999) cuya relevancia principal radica en que tienen el tamaño adecuado para que puedan ser ingeridas por los organismos. El uso reciente y exitoso de dietas balanceadas microparticuladas en la pre-engorda de semillas de abulón (Stott *et al.* 2002) sugiere que es necesario utilizar simultáneamente más de un ingrediente para tener posibilidades de obtener un alimento inerte que pueda competir con el alimento vivo. No obstante, el mayor reto en el uso de esta aproximación es el manejo adecuado del cultivo, ya que debido a su tamaño microscópico las micropartículas podrían servir potencialmente como caldo de cultivo para bacterias no deseadas.

Un método que podría ayudar en la evaluación de la condición nutricional de los organismos en cultivo es la razón carbono: nitrógeno (C:N) ya que ayuda a detectar indirectamente la cantidad relativa de proteínas en el tejido del organismo en relación a los lípidos-carbohidratos. La razón es que de las tres macromoléculas energéticas de un organismo (lípidos, proteínas, carbohidratos) solo las proteínas contienen nitrógeno (Hernández-Luna, 2005). Por ello, si la razón C:N aumenta, esto implica una disminución en la cantidad relativa de proteínas en el tejido, mientras que valores de C:N disminuyen, indica un aumento en la cantidad relativa de proteínas

El presente estudio tiene como objetivo evaluar el uso de una dieta balanceada para poslarvas tempranas de ostión japonés utilizando un esquema de alimentación en pulsos, la cual no solo disminuiría las posibilidades de contaminación orgánica en los recipientes de cultivo, sino que podría acelerar la tasa de crecimiento de los organismos y disminuir los costos de producción de microalgas y la simplificación de los sistemas de cultivo para la producción de ostión japonés. Para fines comparativos también, se usó el alimento utilizando un sistema cerrado.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Generalidades**

En el género *Crassostrea* al igual que en todos los moluscos, la metamorfosis es un proceso de cambios fisiológicos y morfológicos que convertirá a la larva en un adulto en miniatura denominado poslarva o, de modo más general, semilla (Labarta-Fernández, 1997). Esta fase, se caracteriza por requerir mayor consumo de alimento, prolongándose hasta que el organismo alcanza varios milímetros de longitud (5-30 mm para ostras y escalopas, 4-15 mm en almejas y mejillones), (Cotteau y Sorgeloos, 1992).

### **2. 2. Filtración y tamaño de partícula.**

Un aspecto determinante para el cultivo de moluscos bivalvos es su fisiología alimenticia, la cual involucra procesos de filtración, retención, selección y sorteo de las partículas, así como la ingestión y asimilación del alimento, la producción de heces, pseudoheces y productos nitrogenados (Jørgensen, 1990). La tasa de filtración es un parámetro fundamental en estudios de alimentación de bivalvos, y ésta aumenta o disminuye para mantener constante la tasa de ingestión y la eficiencia de asimilación. Por lo tanto, ésta última tiende a ser independiente del tamaño del organismo y puede permanecer constante dentro de cierta concentración de partículas. (Gerdes, 1983).

Se han investigado un amplio número de métodos para la medición de la tasa de filtración, así como su relación con la concentración algal y la temperatura. Sin embargo, los resultados obtenidos causan controversia (Riisgard, 1991). Navarro y Winter (1982) encontraron que en el caso de bivalvos, la tasa de filtración se incrementa con la talla, indistintamente de la concentración de alimento. Lo anterior puede deberse a que la capacidad de filtración fluctúa en relación con las branquias, puesto que la superficie de estas estructuras aumenta su tamaño con la edad (Araya *et al.* 1993). Por otra parte, la máxima eficiencia de retención en larvas veliger de *Ostrea edulis* y del mejillón *Mytilus edulis*, es de partículas de 2 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro (Sprung y Rose, 1988). Wilson (1980) reporta una retención de partículas menores a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro para larvas de *Ostrea*. De igual forma Mackie (1969) establece que las larvas de ostión son capaces de seleccionar microalgas que varían de 1 a 30  $\mu\text{m}$  ya que la apertura oral en larvas véliger de *C. gigas* es de 30  $\mu\text{m}$  (Strathmann y Leise, 1979). Aunque el tamaño de partícula es importante, trabajos de Davis y Guillard (1958), demuestran que el grosor de la pared de las microalgas y el grado de toxicidad de sus metabolitos son factores importantes que determinan su asimilación por las larvas.

### 2.3. Alimentación de moluscos bivalvos: alternativas de reemplazo o complemento de microalgas vivas en diferentes estadios larvarios de moluscos bivalvos

Se han realizado diversos trabajos que abordan el tema de la alimentación en etapas larvarias de moluscos. Chu *et al.* (1987), reportan que al alimentar larvas de bivalvos con microalgas, éstas reúnen los requerimientos necesarios para su desarrollo. Por ello los cultivos unicelulares de algas han sido utilizados por décadas como una fuente de alimento en el cultivo comercial de bivalvos (ostiones, almejas, mejillones y escalopas).

Entre las alternativas propuestas para alimentación se tienen datos de concentrados de microalgas contra microalga viva. Ponis *et al.* (2003) determinaron que las larvas de *C. gigas* (48 horas < 60  $\mu\text{m}$ ) alimentadas con concentrados de alga de 7-14 días de almacenaje no generaron un crecimiento significativamente diferente al observado con alimento vivo. El resultado de las tallas de organismos alimentados con las dietas de *Pavlova lutheri* + T-Iso (PT) y T-*Isochrysis galbana* + *Chaetoceros calcitrans* (TC) en alimento vivo y alimento concentrado fue de 96.0 y 111.9  $\mu\text{m}$  contra 106.7 y 118.7  $\mu\text{m}$  respectivamente. En tanto que en organismos juveniles promediaron 1.4 mm en 28 días y un peso promedio de 0.12 mg por individuo), se encontró que las dietas concentradas (8-35 días de almacenaje) presentaron un crecimiento significativamente menor al equivalente en alimento vivo. Así, las tallas alcanzadas con las dietas vivas PT y TC (3.0 mm. y 3.3 mm respectivamente) fueron mayores que las dietas concentradas-almacenadas (1.7 mm. y 2.6 mm

respectivamente). Los resultados fueron similares con respecto al peso seco, con valores de 1.17 a 2.46 mg para ostiones alimentados con dieta fresca y 0.26 a 0.66 mg para ostiones alimentados con dieta concentrada (Ponis et al. 2003).

Por otra parte se ha sugerido que la alimentación combinada de microdietas inertes y alimento vivo produce una mejora en el crecimiento de bivalvos, comparado con la alimentación de microdieta sola o alimento vivo solo (Teshima et al. 2000). Langdon y Waldock (1981), al utilizar dietas artificiales con ácidos grasos poliinsaturados demostraron que estos son esenciales para el crecimiento en juveniles de ostión. De igual manera Webb y Chu (1982), mostraron que las microalgas contenían altos porcentajes de grupos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 los cuales tienen un perfil altamente nutricional para la larva de ostión. Se ha reportado que las diferencias entre los ácidos grasos en las larvas son una respuesta a las diferencias en la calidad nutricional en la microalga (Nikos y Ian, 2000).

#### **2.4. Efecto de dietas inertes sobre el crecimiento postlarval de moluscos bivalvos.**

Albentosa-Verdú et al. (1997), encontró que en las semillas de almeja *Ruditapes decussatus* ( $0.116 \pm 0.001$  peso seco ( $\text{mg ind}^{-1}$ ),  $0.845 \pm 0.101$  mm  $\text{ind}^{-1}$ ), alimentadas con la microalga *Isochrysis galbana* (clone T-ISO), alcanzaron un peso seco (ps) de ( $0.576 \pm 0.015$  mg  $\text{ind}^{-1}$ ) después de cuatro semanas. En

contraste al mezclar alimento inerte con 20% alimento fresco alcanzaron  $0.318 \pm 0.015 \text{ mg ps ind}^{-1}$ , y con un 100% alimento inerte  $0.276 \pm 0.009 \text{ mg ind}^{-1}$ .

Stott *et al.* (2002), evaluó dietas microparticuladas (K-2, MD-Q) y microalgas (*Amphora coffeaformis*, *Nitzschia* sp. y *Nitzschia frustulum*) en la alimentación de poslarvas de abulón (*Haliotis discus discus*) con una talla inicial de  $853 \pm 166 \mu\text{m}$ , los organismos fueron alimentados durante tres semanas y la talla final con la dieta microparticulada K-2 fue de  $1505 \pm 315 \mu\text{m}$ , con una tasa de crecimiento diaria de  $23 \mu\text{m día}^{-1}$  y tasa de sobrevivencia de 43.7%. Para la dieta MD-Q, registraron tallas de  $1443 \pm 302 \mu\text{m}$ , con una tasa de crecimiento diaria de  $21.5 \mu\text{m día}^{-1}$  y tasa de sobrevivencia de 44.2%. En cuanto a la dieta de diatomeas se obtuvo una talla de  $1485 \pm 367 \mu\text{m}$  con una tasa de crecimiento diaria de  $22.5 \mu\text{m día}^{-1}$  y tasa de sobrevivencia de 19.5%. No encontraron diferencias significativas entre las tallas obtenidas con dieta microparticulada y microalgas.

Namaguchi (2002), utilizó una dieta artificial (microcápsulas de gelatina-acacia GAM) contra la microalga *Isochrysis galbana* en la ostra *Pinctada fucata martensi*. Los organismos alimentados durante 11 días con la primera dieta presentaron una talla inicial de  $3.69 \pm 0.23 \text{ mm}$ , y una talla final de  $4.03 \pm 0.40 \text{ mm}$ , mientras que los alimentados con la microalga (talla inicial de  $3.45 \pm 0.29 \text{ mm}$ ) presentaron una talla final de  $5.12 \pm 0.54 \text{ mm}$ . El autor concluyó que los organismos alimentados con GAM no difirieron del control (organismos en inanición). Asimismo al mezclar GAM + microalga obtuvo una mejoría con

respecto al GAM. Los organismos expuestos a este tratamiento (talla inicial de  $3.79 \pm 0.18$  mm) alcanzaron  $4.73 \pm 0.33$  mm.

En relación a trabajos realizados con *C. gigas*, García-Esquivel *et al.* (2001), reportan que las larvas de 2-4 días de fijación (talla 320 a 326  $\mu\text{m}$  y peso orgánico de  $1.57\text{-}2.53 \mu\text{g ind}^{-1}$ ) alimentadas con *I. galbana* (clone T-ISO) y *Thalassiosira pseudonana* (clone 3H), en periodo de 24 días, alcanzaron una talla final de 3.8-5.1 mm y un peso orgánico de  $162\text{-}618 \mu\text{g ind}^{-1}$ .

Salinas-Ordaz (1999), encontró diferencias significativas en poslarvas de ostión japonés, al alimentarlas durante 12 días con ensilaje ácido de pescado, caolinita, una combinación de ensilaje-caolinita, microalga (*Isochrysis galbana*) y ensilaje-microalga. Encontró que el crecimiento fue mayor con la dieta ensilaje-microalga, mientras que la combinación de ensilaje-caolinita no mostró diferencias significativas en el crecimiento con respecto a la talla inicial, el menor peso en tejido lo obtuvo con ensilaje ( $71 \pm 4 \mu\text{g peso orgánico}$ ), el cual no difirió significativamente del control con agua de mar ( $70 \pm 2 \mu\text{g peso orgánico}$ ). A partir de estos datos, Salinas-Ordaz (1999), concluyó que aún cuando el ensilaje es incorporado a las poslarvas de ostión este no sustituye a las microalgas.

Estudios realizados por Hernández-Luna (2005) en poslarvas de *C. gigas* (talla inicial de 304 a 361  $\mu\text{m}$  y  $1.95$  peso orgánico  $\mu\text{g ind}^{-1}$ ) alimentadas con la microalga *T. pseudonana* durante 22 días. Observó mejor crecimiento con *T. pseudonana* en comparación con la microalga *I. galbana* y alimento inerte

Algamac 2000. Los organismos alimentados con *T. pseudonana* alcanzaron un talla de 1.6 mm con una tasa de crecimiento de  $67.43 \mu\text{m día}^{-1}$ , un peso seco de  $17.40 \mu\text{g día}^{-1}$  y  $1.91 \mu\text{g día}^{-1}$  (peso orgánico). En contraste, los organismos alimentados con la microalga *I. galbana clone T-ISO*, mostraron tasa de crecimiento de  $30.00 \mu\text{m día}^{-1}$ , y con alimento inerte Algamac 2000 fue de  $0.51 \mu\text{m día}^{-1}$ , el peso seco de  $0.90 \mu\text{g día}^{-1}$  y  $0.30 \mu\text{g día}^{-1}$  (peso orgánico).

Fernández-García (1984), utilizó una dieta mixta de la microalga *Pseudoisochrysis paradoxa* con miel de abeja y otra con almidón de maíz y la misma microalga, utilizadas en larvas de *C. gigas*, alimentadas durante 22 días. El mejor crecimiento se obtuvo con la dieta de *Pseudoisochrysis paradoxa* y almidón de maíz donde obtuvo una talla promedio final de  $1220 \mu\text{m}$  en tanto que para la dieta de microalga y miel de abeja no se obtuvo un incremento en el crecimiento ( $1077 \mu\text{m}$ ).

Por su parte Brown y McCausland (2000) determinaron que la tasa de crecimiento instantáneo para poslarvas de *C. gigas*, alimentadas con *Isochrysis* sp. (T-ISO) después de 26 días fue de  $k=0.054 \text{ día}^{-1}$  la cual es dos veces mayor que la obtenida con dietas secas Algamac 2000 y Microfeast MB-30 ( $k=0.024$  y  $0.032 \text{ día}^{-1}$ ) y en el control obtuvo una tasa de  $0.009 \text{ día}^{-1}$ . Por su parte Knauer y Southgate (1997) al alimentar poslarvas de *C. gigas* con una mezcla de 80% de *I. galbana* (T-ISO), y 20 % de cápsulas de gelatina y acacia con aceite de calamar, obtienen una tasa de crecimiento específico de 1.8 % en longitud, 4.7% para peso seco y 4.4% para peso orgánico, la combinación anterior no

mostró diferencias significativas con respecto a poslarvas alimentadas con 100% de *I. galbana* (T-ISO).

## 2.5. Mortalidad

La mortalidad metamórfica es difícil de explicar únicamente por factores de la especie, condiciones ambientales, de cultivo o problemas en criadero. La supervivencia de pos-fijación puede depender de la habilidad para completar el desarrollo de nuevas estructuras, especialmente aquellas usadas para alimentarse, mientras las reservas acumuladas con anterioridad a la metamorfosis son utilizadas. (Labarta-Fernández, 1997). Estudios realizados por Utting (1986) muestran una mortalidad de 3-11%, en larvas de *C. gigas* mientras que Osman *et al.* (1989) observan un 20%. Por su parte Chu *et al.* (1987) señalan un 50%

En referencia a la mortalidad, García-Esquivel *et al.* (2001), mencionan que la tecnología existente es adecuada para satisfacer las necesidades de producción de larvas tempranas de moluscos en granjas comerciales. Sin embargo existen pérdidas cuantiosas de ostiones y otros bivalvos durante el periodo de transición posterior a la fijación y metamorfosis (300 µm a 2-3 mm de la talla de concha) y reportan un porcentaje de mortalidad poslarval en 4 lotes de *Crassostrea gigas* mayor al 50%, dentro de la primera semana post-fijación.

## 2.6. Razón C:N

La razón C:N ha sido ampliamente usada en estudios de fitoplancton y peces, con la finalidad de evaluar la composición bioquímica/nutricional de los organismos. Hasta ahora solo existe un análisis en la especie *C. gigas* (Hernández-Luna, 2005).

Montes-Macias (2004) reporta para las diatomeas bentónicas *Navícula incerta* y *Nitzschia commutata* una razón C:N de 6.81 y 6.19 C:N respectivamente, en cultivos estáticos con medio f/2 de Guillard (1975).

Dhugal (2002) reporta para el pez *Cyclotone alba* una razón C:N de 4.45 Donnelly *et al.* (1993) en anchoveta *Engraulis japonicus* obtuvo una razón C:N de 4.30 C:N. En tanto que Bailey y Robinson (1986) para el pez *Lampanyctus tenuiformis* reportan 4.24 de C:N.

Gnaiger y Bitterlich (1984) determinaron una razón C:N de 4.25 en el camarón (*Sergia fillictum*). En los eufásidos *Euphausia pacifica* y *Euphausia krohnii* se presentó una razón C:N de 4.26 y 3.63 respectivamente (Iguchi e Ikeda, 1998; Bailey y Robinson, 1986).

En relación a *C. gigas*, Hernández-Luna (2005), determinó que el porcentaje de carbono en poslarvas fue mayor cuando se alimentaron con la microalga *I. galbana clone*, T-ISO (ISO) (15.5-17.5%), y menor al alimentar con *T. pseudonana* (THA) (14.3-15.7%). Asimismo el porcentaje de nitrógeno varió entre 1.3-1.8% en poslarvas alimentadas con (ISO), 1.3-1.7% al alimentar con la dieta (THA) y un porcentaje de 1.7-1.9% con el alimento *Algamac 2000* (ALG-

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Evaluar el uso de una micro dieta balanceada como sustituto o complemento para poslarvas tempranas del ostión *C. gigas*.

#### **3.2. Objetivos Particulares**

- 1.- Comparar el crecimiento (talla, peso seco, peso orgánico) de poslarvas tempranas de ostión (*C. gigas*) alimentadas con distintas proporciones de alimento balanceado y microalgas vivas.
- 2.- Comparar el crecimiento de poslarvas en sistemas de cultivo en pulsos y cerrado, bajo dos diferentes modos de alimentación: pulsos y estático.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Origen de las poslarvas de *Crassostrea gigas*

Las larvas de *C. gigas* utilizadas para este estudio se obtuvieron de la empresa MaxMar Mariscos S.A. de C.V. ubicada en Rincón de Ballenas, Ensenada B.C. Para el estudio se utilizaron organismos de 10 días post-fijación ( $1.98 \pm 0.040$  mm,  $0.41 \pm 0.0052$  mg peso seco, y  $45.0 \pm 0.8$   $\mu$ g peso orgánico). Estas se trasladaron en una hielera a temperatura constante (4 °C aprox.) al laboratorio de bioensayos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas.

### 4.2. Diseño experimental y mantenimiento

Se utilizaron dos sistemas de alimentación, pulso (PUL) y cerrado (CERR), el experimento consistió en siete tratamientos de alimento (Tabla 1), cada tratamiento, con cuatro unidades de evaluación (replicas), esto se hizo para ambos sistemas de alimentación (PUL y CERR), mientras que el control negativo solo contó con dos replicas. Las botellas se colocaron en una base de madera con 30 divisiones, y se distribuyeron de la siguiente forma, el sistema CERR y controles negativos con sus unidades de evaluación se colocaron a la derecha de la base y a la izquierda se colocó el sistema PUL. Cada tratamiento consistió de una combinación de alimento vivo (microalgas) e inerte (alimento formulado), mientras que el control consistió en organismos sin alimento particulado (Tabla 1). Un total de 30 unidades de evaluación se distribuyeron sobre una charola (2.50 x 0.82 m y 16 cm de altura) con agua. La charola contó

con un tubo vertical de 8 cm colocado en el dren de la misma, el cual permitió mantener una columna de agua en la charola. Esto ayudó a mantener la temperatura constante. Dando como resultado una temperatura del agua en el área experimental de  $23 \pm 1$  °C. La cual se midió con un termógrafo (Onset, modelo Optic Stow Away Temp).

Tabla 1. Tratamientos de prueba (proporción de alimento Microalga: Alimento inerte, M:A) usados en el experimento, para determinar el efecto de microdietas formuladas sobre el crecimiento de poslarvas de ostión *C. gigas*. El alimento se ofreció en pulsos (PUL) de 3 horas por día con flujo abierto las subsecuentes 21 horas, en sistema cerrado (CERR) con renovación cada 24 horas.

Tratamiento M:A	Número de replicas	Proporción de microalgas (%)	Proporción de alimento formulado
100:0 PUL	4	100	0
75:25 PUL	4	75	25
50:50 PUL	4	50	50
25:75 PUL	4	25	75
0:100 PUL	4	0	100
100:0 CERR	4	100	0
0:100 CERR	4	0	100
CONTROL	2	0	0
NEGATIVO			

Las unidades experimentales consistieron en botellas de refresco sin fondo y dispuestas en forma invertida, en la tapa de la botella, se le pegó otra tapa plástica perforada a la cual se insertó la manguera de aire. (Fig. 1), las botellas se aforaron a 1.5 L, y se les hizo una perforación de 1.5 cm de diámetro en la parte lateral, la cual fue cubierta con malla de 330  $\mu\text{m}$  de luz para evitar el escape de organismos en el recambio de agua.

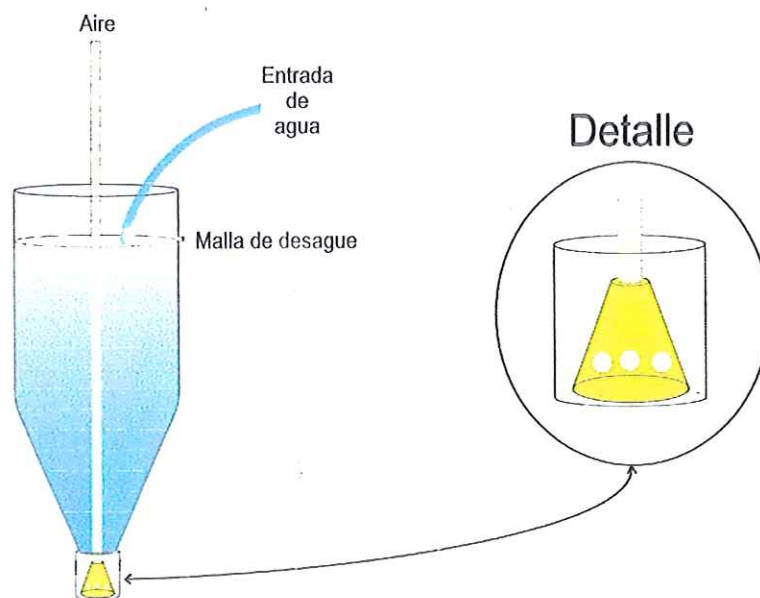


Fig. 1. Unidades experimentales (botellas de refresco sin fondo) utilizadas para el cultivo de poslarvas de *C. gigas*, aforadas a 1.5 L.

Se utilizaron 250 organismos (0.106 g), para realizar el muestreo inicial de tallas, peso seco total (PS) y el peso de las cenizas (peso orgánico). La cantidad inicial de individuos por unidad de evaluación fue de 2580 individuos (1.17 g). Para el control negativo 1 solo se colocaron aproximadamente 1027 organismos en la botella.

El aire se proporcionó con una manguera conectada al fondo de cada botella, anteriormente descrita en la Fig. 1. El aire que entraba al sistema, estaba conectado al sistema de aireación principal (Blower de 2.5 Hp). Al igual que éste, el agua de mar provino de la fuente principal (la cual pasó por un filtro de arena provista con una bomba Cyneget tipo jacuzzi de 1.5 Hp). Una vez en el laboratorio el agua fue filtrada con ayuda de dos filtros tipo cuno de 1  $\mu\text{m}$  posteriormente fue contenida en un reservorio de plástico con agua que contó con calentadores (marca CLEPCO, modelo QD501). El agua llegó a las unidades por gravedad y cada botella contó con una manguera.

Diariamente los recipientes experimentales fueron lavados para eliminar la materia orgánica (alimento/heces) que pudiera estar adherida a las paredes del recipiente, cada 24 horas los recipientes se lavaron utilizando una fibra y agua dulce para limpiar las paredes y la manguera de aire de cada unidad, se utilizó un tamiz 1.39 mm de luz de malla para evitar la pérdida de organismos durante el lavado.

## 4.3 Dietas

### 4.3.1. Cultivo de microalgas.

Como alimento vivo se utilizó la diatomea *Thalassiosira pseudonana* (2.6  $\mu\text{m}$  de diámetro) (Lora-Vilchis, 1997). Cuya composición proximal promedio es de 29% de proteína, 17% de carbohidratos y 10% de lípidos (Brown *et al.* 1989; Becker, 1994).

El cultivo de *T. pseudonana* se realizó en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas, en tres niveles. El primero se llevo a cabo en matraz Erlenmeyer con 150 ml de medio de cultivo el cual se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 lb de presión por 15 min. Una vez a temperatura ambiente los medios se inocularon por duplicado y se mantuvieron a una irradiancia de 150  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  suministrada con lámparas fluorescentes (Sylvania de 75 watts). Después las microalgas se transfirieron del matraz Erlenmeyer, a un matraz Fernbach, en el cual se prepararon 2 L de medio de cultivo y se esterilizó como se indicó anteriormente.

El cultivo logrado en el Fernbach se trasladó a garrafones con 18 L, de medio f/2 de Guillard (1975). Previo a su inoculación el agua de mar del garrafón se trató mediante cloro durante 24 horas y se neutralizó con tiosulfato de sodio y aireación (Pruder y Bolton, 1978). Diariamente se cuantificó el número de células en un contador de partículas (Beckman Coulter Multisizer 3). A partir de 72 horas se generaron cultivos semi-continuos, los cuales se cosecharon diario para alimentar a las poslarvas de *C. gigas*. Estos cultivos

suministraron alimento por 3 días y a partir de este tiempo, fueron reemplazados por cultivos nuevos los cuales a su vez se cosecharon por otros 3 días y se volvían a renovar. Dicho procedimiento se realizó durante el tiempo que duró el experimento.

#### **4.3.2. Preparación y caracterización del alimento inerte.**

El alimento inerte se preparó con los ingredientes y proporciones descritos en la Tabla 2. Los ingredientes se mezclaron de la siguiente manera: los componentes mayoritarios en seco (harina de soya, ostión y *Macrocystis sp.*), y después de la mezcla se agregó 120 ml de agua caliente. Por separado se disolvieron las vitaminas, la metionina y el cloruro de colina en 20 ml de agua.

Después se mezclaron los aceites (pescado y maíz), BTH, tocoferol y stay-C. La gelatina se mezcló con 70 ml de agua caliente, la mezcla con vitaminas, metionina y cloruro de colina, más la mezcla de gelatina con los aceites se vaciaron inmediatamente con los componentes mayoritarios, todo esto se mezcló con un la ayuda de un homogenizador (marca Osterizer). El alimento se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente fue congelado, liofilizado y empacado en bolsas plásticas, estas se almacenaron en frascos con diédrita. El alimento se ofreció a los organismos en suspensión.

La distribución del tamaño de micropartícula se obtuvo con un analizador de distribución de tamaño (marca Horiba, LA-910), el cual se observa en la Fig. 2.

#### 4.4. Análisis proximal del alimento inerte

Para determinar las cenizas, se colocó una nave de aluminio en la mufla a 550 °C durante 4 horas, se dejó enfriar durante 30 minutos en el desecador, posteriormente se pesó (peso A), a esta nave previamente pesada se le añadió la muestra (1 a 2 g) y se pesó en conjunto (peso B), se colocó la nave en la mufla a una temperatura de 200 °C durante 4 horas, posteriormente se elevó la temperatura a 550 °C durante 12 horas. Por último la nave se enfrió en el desecador treinta minutos y se pesó rápidamente (peso C).

Se utilizó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de cenizas (FAO, 2004).

$$\% \text{ de cenizas} = 100 \times (C-A) / (B-A)$$

Se calculó el porcentaje de nitrógeno por el método de Micro-Kjeldahl (AOAC, 1990) y la determinación de proteína cruda se calculó multiplicando N por el factor 6.25.

La cuantificación de lípidos totales se determinó gravimétricamente por el método de Soxhlet (AOAC, 1990)

El contenido de energía del alimento se determinó por combustión directa en un calorímetro adiabático marca Parr 1281.

Tabla 2. Ingredientes contenidos en el alimento inerte para poslarvas de *Crassostrea gigas*.

Ingredientes	Peso seco (%)
Harina de ostión <sup>1</sup>	22
Harina de soya <sup>2</sup>	14
Harina de <i>Macrocystis sp</i> <sup>3</sup>	40
Aceite de pescado <sup>4</sup>	5
Aceite de maiz <sup>5</sup>	5
Almidón <sup>6</sup>	7.8
Mezcla de vitaminas <sup>7</sup>	1.5
Stay-C <sup>8</sup>	0.04
Mezcla de minerales <sup>9</sup>	3.3
Metionina <sup>10</sup>	0.02
Benzoato de sodio <sup>11</sup>	0.02
Cloruro de colina <sup>12</sup>	0.01
BTH <sup>13</sup>	0.09
Tocoferol <sup>14</sup>	0.01
Gelatina <sup>15</sup>	6
Caolinita <sup>16</sup>	4
Total	100
Análisis proximal	
Proteína cruda	30.65
Energía	3425.38 cal/g
Lípidos totales	10.87256
Cenizas totales	38

<sup>1</sup>*Crassostrea gigas*, <sup>2</sup>ICN Biomedicals Inc, Sigma; <sup>3</sup>*Macrocystis pyrifera*, kindly provided by Productos del Pacífico, S.A. de C.V., <sup>4</sup>Sigma cat. #F-8020, <sup>5</sup>Sigma cat. #C-8267, <sup>6</sup>Modificado de Smart & Final ©, <sup>7</sup>ICN Biomedicals, cat.#904654 <sup>8</sup>Stay-C-35,0.04 (DSM Nutricional Products Inc.) <sup>9</sup>ICN Biomedicals, Inc. cat. #905455, <sup>10</sup>Sigma, cat. #M-9500, <sup>11</sup>Sigma, cat. #B-3375, <sup>12</sup>Sigma, cat. # C-7527, <sup>13</sup>Sigma, cat. #B-1378, <sup>14</sup>Sigma, cat. #T-3634, <sup>15</sup>275 bloom, Duche, <sup>16</sup>ICN Biomedicals, Inc. cat. #155144.

#### 4.5. Alimentación de poslarvas

Para los tratamientos de alimentación en pulsos (PUL) el alimento se suministró durante tres horas continuas al día con el flujo cerrado. Después de ese período se restableció un flujo de 50 ml/min. Para eliminar el alimento remanente. El alimento fue ofrecido al mismo tiempo en los tratamientos CERR, pero en estos no se tenía flujo abierto, por lo que el alimento permanecía disponible a los organismos las 24 horas.

La cantidad de alimento suministrado se realizó de acuerdo a las proporciones indicadas en la tabla 3. El alimento vivo dependió de la densidad diaria de microalgas y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Volumen diario de microalgas (ml)} = \frac{(\text{Vol. B. (ml)}) (\text{R.E. (cél/ml)})}{\text{Concentración diaria del cultivo de microalgas}}$$

Donde:

Vol. B.= Volumen de la botella 1500 ml

R.E.= Ración experimental (cél/ml), ver Tabla 3

En el caso del alimento formulado, se pesaron 0.4 gr. de alimento seco en un tubo Eppendorf al cual se le agregó 1 ml. de agua destilada con ayuda de una pipeta calibrada, se homogenizó y se dejó reposar 10 min. Después se volvió a homogenizar transfiriendo el contenido (solución de alimento) a un tubo plástico cónico Falcon de 15 ml. El alimento fue aforado a 10 ml, dando una concentración conocida de 40 mg/ml, con una micropipeta se tomó la muestra

de alimento y se repartió en las botellas de acuerdo a la proporción de la microalga y alimento inerte (Tabla 3). La concentración final de micropartículas varió entre (4.18 y 16.8 mg/L).

Tabla 3. Raciones experimentales usadas para cada tratamiento en la botella (M=microalga: A=alimento inerte) de alimentación en *C. gigas*.

Tratamiento (M:A)	Microalga (cél/ml x 10 <sup>3</sup> )	Alimento inerte (mg/L)
100:0	280	0
75:25	210	4.18
50:50	140	8.4
25:75	70	12.6
0:100	0	16.8
100:0 CERR	280	0
0:100 CERR	0	16.8

#### 4.6. Evaluación del crecimiento de poslarvas de *Crassostrea gigas*.

##### 4.6.1 Crecimiento y mortalidad de poslarvas de *C. gigas*.

Cada siete días (1, 7, 14 y 21), se tomaron muestras de cada botella con la finalidad de determinar la longitud de la concha, peso seco total (incluyendo concha y tejido) y peso seco del tejido (o peso orgánico). Para determinar la longitud, se tomaron entre 28 y 30 organismos con ayuda de una pipeta Pasteur, los organismos se preservaron en formol y se midieron directamente bajo el microscopio con ayuda de una rejilla calibrada e integrada al ocular. Para el análisis de peso y cenizas se usaron solamente organismos vivos, las muestras tomadas fueron entre 20 y 145 organismos con un peso seco entre 2.99 mg y 0.54 mg, dependiendo este último de la talla. Previo a la

determinación del peso las poslarvas fueron enjuagadas en agua destilada para eliminar sales.

El peso seco total (PS) y el peso orgánico (PO) se determinó de acuerdo a la metodología de García-Esquivel *et al.* (2001) donde se utilizaron navecillas de aluminio previamente incineradas en una mufla a 450 °C (marca Thermolyne , modelo FB1415M) y pesadas en una micro-balanza (Mettler Toledo, modelo UMX2, con  $\pm 1.0 \mu\text{g}$ ). Se colocó la muestra en las navecillas y se secaron en una estufa de convección (VWR, modelo 1370 FM) a 90 °C, durante 24 horas. Se pesaron en una la micro-balanza para obtener el peso seco. Posteriormente, se calcinaron a 450 °C durante 24 horas en una mufla. El peso orgánico, se obtuvo con la diferencia del peso seco total (PS) y el peso de las cenizas (PC)

La tasa de crecimiento específico (TCE), se calculó en base a la longitud y peso seco del tejido, mediante la expresión de (Hopkins,1992):

$$\text{TCE\% día}^{-1} = [(\ln F - \ln I)/t] * 100$$

Donde:

F= peso o talla final

I= peso o talla inicial

t= período experimental, en días.

La mortalidad presente en cada botella se evaluó en submuestras de 200 a 300  $\mu\text{l}$  correspondientes al día 28 de cultivo, donde los organismos vivos y muertos fueron contabilizados.

El porcentaje de mortalidad (%M) de las poslarvas de ostión para el experimento se evaluó por medio de la relación:

$$\% M = [(N_1/N_0)] 100$$

Donde:

$N_1$  = Número de poslarvas muertas en una réplica

$N_0$  = Total de poslarvas de ostión presentes en una réplica.

#### 4.7. Carbono orgánico, Nitrógeno orgánico y Proteínas totales

Se utilizaron dos tipos de muestra, liofilizados de organismos completos y organismos pre-calcinados a 450 °C (fracción inorgánica, o concha), correspondientes al día 21. El porcentaje de C y N orgánico se determinó en muestras de 2 mg de aproximadamente, en un autoanalizador orgánico elemental (LECO CHNS-932). Los valores absolutos de C y N por individuo ( $\mu\text{g}/\text{org}$ ) se calcularon multiplicando el porcentaje de cada elemento por el peso correspondiente a la concha o el peso seco, mientras que el contenido absoluto de C y N en el tejido ( $\mu\text{g}/\text{org}$ ) se calculó de la siguiente manera:

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

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

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Alimento inerte

La distribución de tamaños de las micropartículas de alimento se muestra en la Fig. 2. El tamaño promedio de partícula fue de  $2.91 \mu\text{m}$  y  $58.58 \mu\text{m}^3$  de volumen. La moda dominante fue de  $1.074 \mu\text{m}$ .

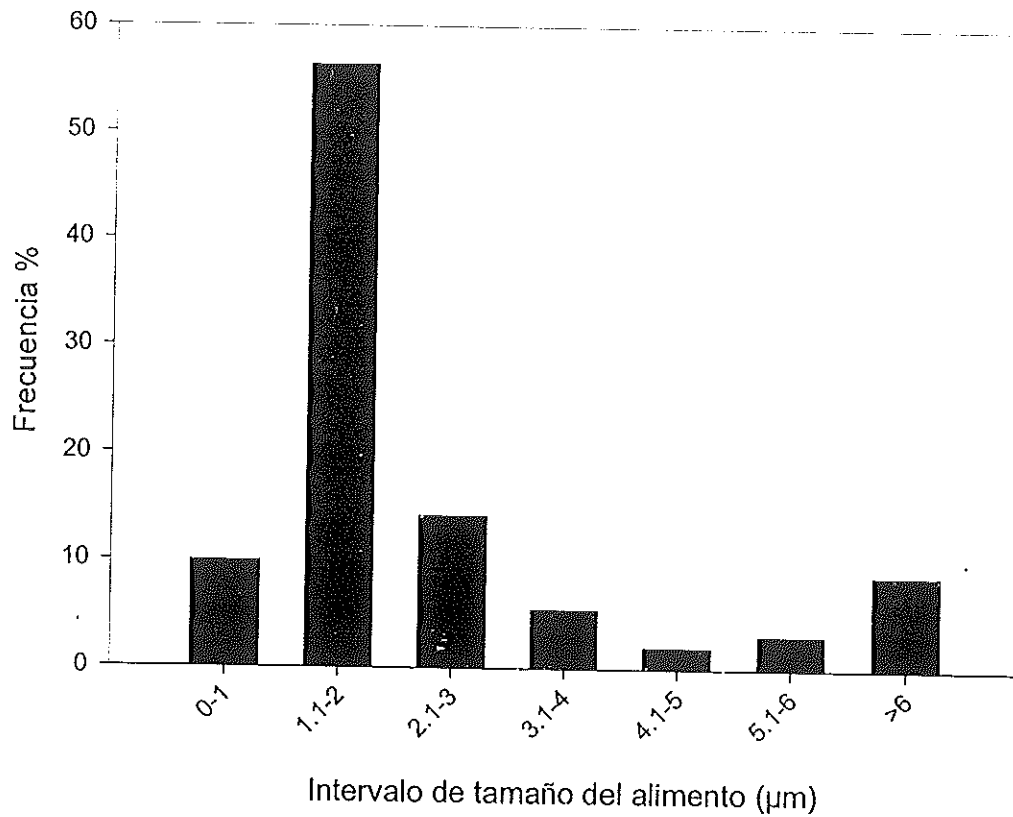


Fig. 2. Distribución del tamaño de partícula de alimento inerte ( $\mu\text{m}$ ) utilizado en los experimentos de alimentación de poslarvas de *Crassostrea gigas*.

## 5.2. Crecimiento de poslarvas de *C. gigas*

### 5.2.1. Sistema Cerrado

En el sistema CERR, el mayor crecimiento ( $83.5 \mu\text{m día}^{-1}$ ) se obtuvo en los organismos alimentados con la dieta 100:0 M (microalga) en la cual los organismos alcanzaron una talla promedio de  $3.8 \pm 0.06$  mm al final del experimento. Dentro del mismo sistema el menor crecimiento ( $22.8 \mu\text{m día}^{-1}$ ) se obtuvo con la dieta 0:100 de alimento inerte, donde la talla final fue  $2.5 \pm 0.06$  mm. (Tablas 4 y 5). Se encontraron diferencias significativas. (t-student=13.87, gl=5,  $P < 0.001$ ). Asimismo los tratamientos comparados con el control, mediante una prueba simple t, también muestran diferencia significativa ( $P < 0.001$ ) con un 95% de confianza.

Con relación al peso seco y peso orgánico, el mayor crecimiento se presentó en los organismos alimentados con la dieta 100:0 M, donde la tasa de crecimiento fue de  $100 \mu\text{g día}^{-1}$  PS y  $12.9 \mu\text{g día}^{-1}$  PO con un PS de  $2.99 \text{ mg} \pm 0.17$  y un PO de  $357.78 \pm 3.15 \mu\text{g}$ . El menor crecimiento se registró en los organismos alimentados con la dieta 0:100 microalga (Tabla 5), donde el PS fue  $1.15 \pm 0.07 \text{ mg}$ , y el PO de  $105.65 \pm 6.17 \mu\text{g}$ . (Tabla 4). Se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos para peso seco (t-student=8.44, gl=5,  $P < 0.001$ ) y peso orgánico (t-student=6.68, gl=5,  $P < 0.001$ ). Igualmente se realizó una prueba simple t para comprobar la diferencia de peso seco y peso orgánico entre los tratamientos y el control, la cual resultó significativamente diferente.

Tabla 4. Talla y pesos finales de poslarvas de *C. gigas* alimentadas con las dietas de 100% microalga (100:0 M) y 100% dieta inerte (0:100 A), del sistema CERR, subíndice a y b indican la diferencia significativa entre los tratamientos.

Variable	Microalga 100:0 M:A	Inerte 0:100 M:A	Control 0:0 M:A
Longitud (mm)	3.8 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.80
Peso seco (mg)	2.99 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.46
Peso orgánico (µg)	357.78 ± 3.15 <sup>a</sup>	105.65 ± 6.17 <sup>b</sup>	23.38

Tabla 5. Ecuaciones de ajuste lineal de tallas ( $\mu\text{m día}^{-1}$ ), peso seco ( $\mu\text{g día}^{-1}$  PS) y peso orgánico ( $\mu\text{g día}^{-1}$  PO) vs tiempo (t). La pendiente representa la tasa de crecimiento ( $\mu\text{g día}^{-1}$ ) de poslarvas de *C. gigas* alimentadas con las dietas de 100% microalga (100:0 M) y 100% dieta inerte (0:100 A), del sistema CERR.

Tratamiento	Ecuación (Talla $\mu\text{m}$ )	R <sup>2</sup>	Ecuación (PS $\mu\text{g}$ )	R <sup>2</sup>	Ecuación (PO $\mu\text{g}$ )	R <sup>2</sup>
100: 0 M	83.5t + 1291	0.89	100t - 410	0.97	12.9t + 61.28	0.79
0:100 A	22.8t + 1876	0.93	30t + 350	0.97	2.9t + 26.49	0.97
CONTROL	6.2t - 2030	0.94	4.2t + 36	0.69	0.29	0.42

### 5.2.2 Sistema Pulsos

Respecto al sistema de alimentación en pulsos (PUL), los organismos alimentados con la proporción 50:50 M:A registran una tendencia a aumentar ( $44.36 \mu\text{m día}^{-1}$ , con talla final de  $2.96 \pm 0.17 \text{ mm}$ ), seguida de la dieta 25:75 M:A y 75:25 M:A (Tabla 6 y Fig. 3 (a)). El menor crecimiento en las poslarvas se obtuvo con las dietas 0:100 M:A y 100:0 M:A (Tabla 6), donde se alcanzó una talla de  $2.4 \pm 0.06 \text{ mm}$  para 0:100 M:A y  $2.4 \pm 0.13 \text{ mm}$  en 100:0 M:A, (Fig. 3 (a)). Los organismos expuestos a inanición (control negativo) alcanzaron una talla final de  $1.8 \pm 0.05 \text{ mm}$  y una tasa de crecimiento de  $6.28 \mu\text{m día}^{-1}$  (Fig. 3 (a) y Tabla 6). Las pruebas estadísticas mostraron que no hay diferencias significativas entre los tratamientos con distintas proporciones de alimento (ANOVA,  $F=2.194$ ,  $P=0.123$ ). No obstante al comparar con pruebas simples *t* para muestras individuales contra el valor único del control negativo se encontró que todos los tratamientos (100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100), fueron significativamente distintos al control. El mayor crecimiento en peso seco y peso orgánico se presentó en los organismos alimentados con la proporción 50:50 M:A (Tabla 7), donde registraron un PS final de  $2.011 \pm 0.28 \text{ mg}$  y un PO de  $166.39 \pm 29.23 \mu\text{g}$ . (Fig. 3 (b) y (c)). Por el contrario el menor peso seco y orgánico se registraron en los organismos expuestos a los tratamientos 0:100 M:A y 100:0 M:A (Tabla 7) y Fig 3 (b) y (c). La dieta 75:25 y 25:75 M:A muestran tasas de crecimiento de  $51 \mu\text{g día}^{-1}$  PS y  $64 \mu\text{g día}^{-1}$  PS respectivamente, mientras que los valores en la tasa de crecimiento de PO son similares en

ambos tratamientos (Tabla 7). El peso seco para estos tratamientos fue de  $1.58 \pm 0.40$  mg PS en la dieta 75:25 M:A y  $1.86 \pm 0.27$  mg PS en 25:75 M:A. La tendencia a aumentar en peso orgánico de estos tratamientos es similar (Figura 3 (c)). Los organismos expuestos a inanición (control negativo) mostraron el menor peso seco y peso orgánico con respecto a los tratamientos (100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100) (Fig. 3 (a) y (b)), así como la menor tasa de crecimiento (Tabla 7). No hay diferencias significativas para el peso seco y peso orgánico, entre los tratamientos con alimento M:A del sistema de PUL (peso seco, ANOVA,  $F=0.869$ ,  $P=0.513$  y peso orgánico ANOVA,  $F=1.787$ ,  $P=0.202$ ).

Se realizó un análisis estadístico mediante una prueba simple t y resultó que hubo diferencias significativas contra el valor único del control negativo en las muestras individuales para peso seco en todos los tratamientos (100:0, 75:25 50:50, 25:75 y 0:100). Para el peso orgánico también se realizó un prueba simple t de los tratamientos contra el valor único del control negativo, la cual resultó con diferencias significativas en las proporciones 50:50 75:25 y 25:75, 100:0 mientras que en la proporción 0:100 no hubo diferencias significativas ( $t=3.57$ ,  $gl=1$ ,  $P=>0.001$ ).

Tabla 6. Ecuaciones de ajuste lineal de tallas ( $\mu\text{m}$ ). La pendiente representa la tasa de crecimiento ( $\mu\text{m día}^{-1}$ ) de poslarvas de *C. gigas* alimentadas con pulsos (PUL) de 3 horas diarias, con diferentes proporciones de microalga *Thalassiosira pseudonana* y alimento microparticulado.

Tratamiento		Ecuación (longitud $\mu\text{m}$ )	R <sup>2</sup>
100:0	M:A	23.47t + 1829	0.95
75:25	M:A	35.53t + 1750	0.97
50:50	M:A	44.36t + 1702	0.98
25:75	M:A	34.10t + 1851	0.99
0:100	M:A	19.92t + 1855	0.92
0:0 (CONTROL NEGATIVO)		6.28t - 2030	0.94

Tabla 7. Ecuaciones de ajuste lineal del peso seco (ps) y peso orgánico (po) vs tiempo. La pendiente representa la tasa de crecimiento ( $\mu\text{g día}^{-1}$ ) de poslarvas de *C. gigas* alimentadas con pulsos (PUL) de 3 horas diarias, con diferentes proporciones de microalga *Thalassiosira pseudonana* y alimento microparticulado

Tratamiento		Ecuación ps $\mu\text{g}$	R <sup>2</sup>	Ecuación po $\mu\text{g}$	R <sup>2</sup>
100:0	M:A	45t + 138	0.97	2.5t + 21.53	0.99
75:25	M:A	51t + 120	0.98	5.0t + 10.44	0.98
50:50	M:A	69t - 45	0.98	5.7t - 0.79	0.97
25:75	M:A	64t + 40	0.98	5.0t + 10.44	0.98
0:100	M:A	30t + 312	0.96	2.1t + 31.81	0.91
CONTROL NEGATIVO	0:0	4.2t + 36	0.69	0.29	0.42

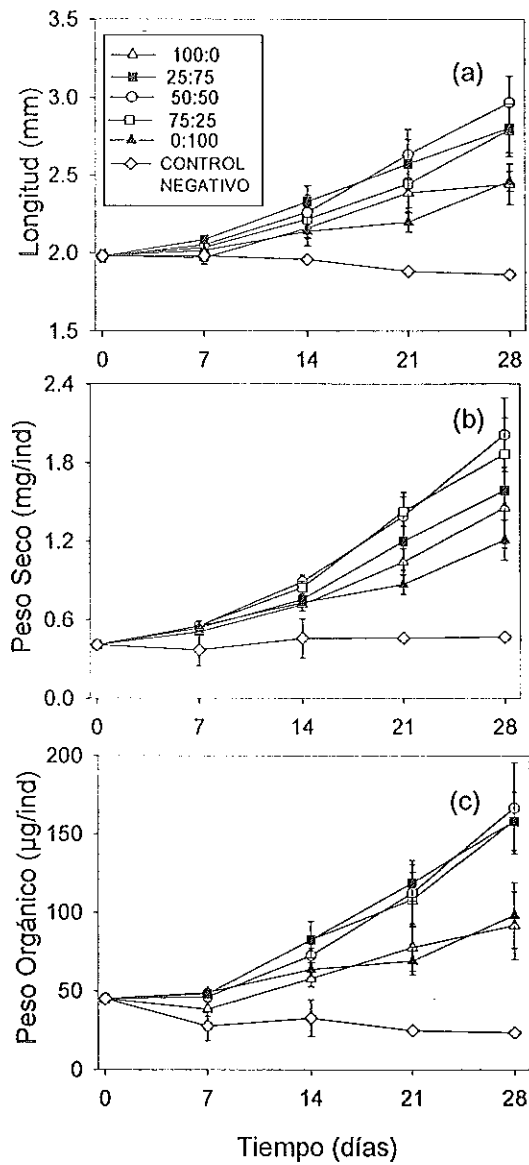


Fig. 3. Cambios temporales promedio de la longitud (mm) (a), peso seco (mg ps) (b) y peso orgánico ( $\mu\text{g po}$ ) (c) de poslarvas de *C. gigas* alimentadas con pulsos (PUL) de 3 horas diarias, con diferentes proporciones de microalga *Thalassiosira pseudonana* y alimento microparticulado, las barras verticales indican el error estándar.

### 5.3. Mortalidad

La mortalidad de *C. gigas* se evaluó al día 28 de cultivo en el sistema cerrado (CERR) y en el sistema de pulsos (PUL) (Tabla 8). En el sistema cerrado no hay diferencias significativas entre los tratamientos con las proporciones de alimento 100:0 y 0:100 M:A ( $t$ -student= 0.332,  $gl$ = 4,  $P$ = 0.757). Se realizó una prueba simple  $t$  entre los tratamientos contra el valor único del control negativo, el resultado fue que existe diferencia significativa entre éste y los tratamientos.

En lo que respecta al sistema de pulsos la menor mortalidad se obtuvo con el tratamiento 50:50 M:A (5.24 %) (Tabla 8). Al comparar el porcentaje de mortalidad entre los tratamientos (100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100), se obtuvo que no existen diferencias significativas (ANOVA,  $F$ =2.493,  $P$ =0.104). Los tratamientos se compararon contra el valor único del control negativo mediante una prueba simple  $t$ , donde se encontraron diferencias significativas entre éstos y el control.

Tabla 8. Porcentaje de mortalidad en poslarvas de *C. gigas* alimentadas con las dietas de 100% microalga (100:0 M:A) y 100% dieta inerte (0:100 M:A), del sistema CERR y sistema PUL de 3 horas diarias, con diferentes proporciones de microalga *Thalassiosira pseudonana* y alimento microparticulado.

Sistema CERR	
Tratamiento	% de mortalidad
100: 0 M:A	16.3 ± 7.6
0:100 M:A	13.5 ± 3.5
CONTROL NEGATIVO	43.75
Sistema PUL	
100:0 M:A	17.8 ± 5.6
75:25 M:A	6.6 ± 2.2
50:50 M:A	5.2 ± 1.8
25:75 M:A	7.6 ± 1.5
0:100 M:A	4.0 ± 2.4
CONTROL NEGATIVO	43.75

#### 5.4. Carbono Orgánico, Nitrógeno Orgánico.

Los resultados de C:N al día 21 de cultivo indican que hubo poca variación entre tratamientos, por lo que no se realizaron comparaciones estadísticas entre éstos. Las proporciones 75:25, 25:75 y 0:100 del sistema PUL no muestran desviación estándar, ya que solo se contó con una replica para su análisis (Tabla 9). No obstante los valores obtenidos son similares a los tratamientos 100:0 y 50:50 M:A.

Tabla 9. Contenido absoluto de C y N ( $\mu\text{g}/\text{ind}$ ) en organismos completos, tejido y concha de *C. gigas*, para tratamientos del sistema PUL, con diferentes proporciones de microalga *Thalassiosira pseudonana* y alimento microparticulado

Tratamiento		C:N	C:N concha	C:N tejido
100:0	M:A	12.38 $\pm$ 0.69	46.66 $\pm$ 6.77	3.79 $\pm$ 0.06
75:25	M:A	12.46	61.53	3.79
50:50	M:A	12.35 $\pm$ 0.40	36.60 $\pm$ 8.3	4.05 $\pm$ 0.23
25:75	M:A	12.43	51.35	3.74
0:100	M:A	12.66	36.87	5.23

## 6. DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de este experimento, el crecimiento de las poslarvas de *C. gigas* mantenidas en el sistema cerrado (CERR) fue mayor comparado con el sistema de pulsos (PUL), debido a que en el sistema (CERR) el tiempo de residencia del alimento fue mayor que en el sistema de pulsos (PUL). Lo que sugiere que la tasa de dilución del alimento en el sistema CERR es menor.

### 6.1. Alimento

En el presente estudio el tamaño promedio de partícula del alimento inerte y el de la microalga utilizada *Thalassiosira pseudonana*, (2.98  $\mu\text{m}$ , y 2.6  $\mu\text{m}$  respectivamente), se consideran adecuados para alimentación de las poslarvas de *C. gigas*, debido a que se encuentran dentro del intervalo (2-30  $\mu\text{m}$ ) reportado para esta especie por (Mackie, 1969), ya que se sabe que la cavidad oral es de 30  $\mu\text{m}$  (Strathmann y Leise, 1979).

El alimento inerte, se preparó con los ingredientes y las proporciones descritas en la Tabla 2, ya que se ha demostrado que la combinación de varios ingredientes produce mayores tasas de crecimiento, en los bivalvos los cuales se alimentan normalmente de varias especies en el ambiente natural, lo que podría asegurar un balance de compuestos esenciales, en particular de ácidos grasos poliinsaturados que conducen a mayores tasas de crecimiento y sobrevivencia (Ponis *et al.* 2003).

En el sistema de pulsos (PUL), se lograron mejores resultados al complementar el alimento inerte con una proporción de la microalga *Thalassiosira pseudonana*, la cual tiene una composición proximal promedio de 29% de proteína y 10% de lípidos (Brown *et al.* 1989; Becker, 1994). Debido a que se conoce poco a cerca de los nutrientes específicos requeridos en cada fase del desarrollo de los moluscos bivalvos, las cantidades en la proporción 50:50 M:A posiblemente cubrieron los requerimientos para *C. gigas* en esta etapa poslarval, lo cual coincide con lo referenciado por Enright *et al.* (1986) quienes mencionan que los carbohidratos y lípidos son los componentes bioquímicos más importantes en la dieta de los moluscos. Otros autores como Webb y Chu (1992) reportan que la importancia del alimento suministrado a las larvas juveniles de bivalvos requieren nutrientes como ácidos grasos, aminoácidos, monosacáridos, minerales y vitaminas.

Se ha demostrado que la composición bioquímica de las microalgas puede variar su calidad debido a las condiciones de cultivo y a las diferentes fases de crecimiento. Sin embargo, Loosanoff y Davis (1963); Malouf y Breese (1977), indican que una sobrealimentación o una mala calidad de alimento en el cultivo retrasan la tasa de crecimiento de las larvas ya que produce pseudoheces.

## 6.2. Efecto de los sistemas y dietas en el crecimiento de poslarvas de *C. gigas*

### 6.2.1. Sistema cerrado (CERR)

En el sistema CERR, se evaluó la microalga *Thalassiosira pseudonana* contra alimento inerte. Los resultados de longitud y peso en los organismos alimentados con microalga en relación a los alimentados con alimento formulado probablemente pueden ser explicados por los diferentes contenidos nutricionales de las mismas. La dieta de *Thalassiosira pseudonana* aportó la mayor longitud, peso seco y peso orgánico, así como las mayores tasas de crecimiento de los mismos (Tablas 4 y 5). Se puede observar que la tasa de crecimiento en talla con la porción 100:0 M:A es 3 veces mayor con respecto a la porción 0:100 A ( $83.5 \mu\text{m día}^{-1}$  y  $22.8 \mu\text{m día}^{-1}$ ). Esto concuerda con lo citado por autores como Brown y McCausland, (2000), quienes encontraron que las tasas de crecimiento instantáneo en poslarvas de *C. gigas* alimentadas con *Isochrysis sp.* fueron hasta dos veces mayores que al alimentarlas con alimento comercial Algamac 2000 ( $0.054$  y  $0.024 \text{ día}^{-1}$ ). Asimismo (Langdon, 1983) indica que al alimentar larvas de *C. gigas* con una dieta no tradicional conformada por productos artificiales y una adición de productos naturales se encontró que estas pueden digerir la fracción soluble, pero el crecimiento sigue siendo menor que el obtenido con las microalgas

Los resultados en el sistema cerrado, son mayores al alimentar con la microalga *T. pseudonana* ( $3.8 \pm 0.06 \text{ mm}$ ,  $83.5 \mu\text{m día}^{-1}$ , peso seco  $100 \mu\text{g día}^{-1}$

y peso orgánico  $12.9 \mu\text{g día}^{-1}$ ) en comparación con alimento microparticulado, lo cual concuerda con lo reportado por Hernández-Luna (2005), quién alimento poslarvas de *C. gigas* en un periodo de 22 días con las microalgas *Thalassiosira pseudonana* e *Isochrysis sp.* y comparó con alimento inerte Algamac-2000. Los alimentados con *T. pseudonana* alcanzaron un talla de de 1.6 mm, la tasa de crecimiento fue de  $67.43 \mu\text{m día}^{-1}$ , un peso seco de  $17.40 \mu\text{g día}^{-1}$  y  $1.91 \mu\text{g día}^{-1}$  de peso orgánico. Asimismo en el sistema CERR, en el tratamiento de 0:100 M:A, se encontró presencia de vorticela en 10% durante el último muestreo, de acuerdo con Urban y Langdon (1984), este hecho se debe a que las dietas inertes pueden estimular el desarrollo de bacterias en los sistemas de cultivo.

### **6.2.2. Sistema de pulsos (PUL)**

En el presente experimento a pesar de que en el sistema de PUL estadísticamente no hay diferencias significativas entre las tasas de crecimiento con las proporciones de M:A, los organismos comenzaron a reflejar los efectos de las dietas en las variables de medición a partir de los 14 días y se acentuaron en los restantes 14 días del experimento. Así, la tasa de crecimiento en talla de *C. gigas* sometidas a la dieta 50:50 M:A fue 2 veces mayor que en las proporciones 100:0 y 0:100 M:A y 7 veces mayor respecto al control. Lo anterior coincide con Knauer y Southgate (1997) quienes obtuvieron mayores

tasas de crecimiento en poslarvas de *C. gigas* al mezclar 80% de *I. galbana*, T-ISO con 20 % de cápsulas de gelatina y acacia con aceite de calamar.

Por otra parte, con la dieta 50:50 se obtuvieron los mejores resultados en talla, peso seco y peso orgánico (Figura 3 (a), (b) y (c)), mientras que los organismos alimentados con las dietas 0:100 y 100:0 M:A presentaron la menor talla, peso seco y peso orgánico.

Los datos obtenidos en este trabajo son similares con lo citado por autores como, Salinas-Ordaz, 1999; quien obtuvo mejores resultados con la dieta ensilaje-microalga en proporción 100:50 respectivamente. De la misma manera, Namaguchi (2002), alimentó poslarvas de ostra *Pinctada fucata martensi* con una mezcla de microcápsulas de Gelatina-Acacia y microalga, obteniendo mayores resultados (talla final  $4.73 \pm 0.33$  mm.) con la mezcla que con microalga.

Por lo tanto los resultados de este estudio, indican que la dieta formulada del presente experimento en conjunto con microalgas, ofrece una alternativa viable para la alimentación de poslarvas de *C. gigas*, ya que al combinar estos dos alimentos, es probable que exista un balance en los nutrientes lo que favorece el crecimiento de los organismos.

### 6.3. Mortalidad.

Es importante mencionar que la mortalidad, se estimó en base al porcentaje acumulativo del último muestreo (día 28), debido a que durante el

experimento la fluctuación en la mortalidad de los organismos estuvo presente desde la primera semana de tratamiento.

Tanto en el sistema CERR como en el sistema PUL, no hubo diferencia entre los tratamientos (Tabla 8). Los resultados de este estudio son similares a los reportados por Utting (1986) quién reporta una mortalidad de 3 a 11% para poslarvas de *C. gigas*. Por su parte Osman *et al.* (1989) observan un 20%, lo cual es mayor a lo encontrado en este estudio al igual que lo reportado por Chu *et al.* (1987) donde señalan un 50% de mortalidad.

Cabe mencionar que se recomienda tener cuidado al momento de contar poslarvas muertas, ya que se puede generar confusión en contar una sola balva considerándolo como un solo individuo y con ello sobreestimar el número de individuos muertos.

#### **6.4. Carbono Orgánico, Nitrógeno Orgánico.**

Aunque la razón de C:N, es una alternativa que ayuda a cuantificar proteínas, hasta ahora solo se ha reportado un estudio en la especie *Crassostrea gigas* (Hernández-Luna, 2005) para determinar la condición nutricional en poslarvas de esta especie.

Los valores más altos de C:N obtenidos en este experimento para tejido (Tabla 9), sugieren que el contenido de proteína es menor en los organismos alimentados con alimento microparticulado, comparado con el valor obtenido con los organismos alimentados con microalga en el tratamiento 100:0 M:A.

Estos valores coinciden con los obtenidos para esta especie por Hernández-Luna (2005), quien obtuvo una razón C:N en tejido de 5.4 para tratamiento con alimento inerte Algamac-2000 y 4.4 para *T. pseudonana*. Asimismo estos valores están dentro del intervalo considerado para peces (4.03-4.23 Pfeiler *et al.* 1998), así como en copepodos *Acartia sp.* con una razón C:N de 4.5 (Walve y Larsson, 1999).

La razón C:N en la concha obtenida en este experimento (Tabla 9), es superior a lo encontrado por Hernández-Luna (2005), quién obtuvo una razón C:N en concha de (31.9-23.2)

Es importante destacar que la razón C:N es un indicador confiable de la condición nutricional en estadios tempranos de moluscos, por lo tanto, la razón C:N, podría ser usada para establecer valores generales de referencia para estos y otros grupos de organismos.

Finalmente, mediante el presente estudio se demostró que el alimento microparticulado balanceado es una opción para suplementar el alimento vivo en estadios tempranos de poslarvas de ostión. No obstante son necesarios más estudios para definir, la ración más apropiada del alimento inerte, así como el tiempo de residencia en el cultivo y la frecuencia del pulso, éste último con el fin de optimizar el aprovechamiento del alimento inerte y al mismo tiempo impedir la generación de bacterias en el cultivo.

## 7. CONCLUSIONES.

- El alimento microparticulado generó mayor tasa de crecimiento, peso seco y peso orgánico en el sistema de pulsos comparado con el sistema cerrado en el cual se generó contaminación por protozoarios.
- En el sistema de pulsos la mayor tasa de crecimiento en las poslarvas de *C. gigas* se obtuvo con la proporción 50:50 M:A ( $69 \mu\text{m día}^{-1}$ ).
- La razón C:N en el sistema cerrado y pulso con las diferentes raciones de alimento no mostró diferencias significativas.
- El porcentaje de mortalidad fue menor en el sistema de pulsos comparado con el sistema cerrado. Sin embargo las proporciones de alimento no influyeron en la mortalidad en ambos sistemas.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Albentosa-Verdú, M. 1994. Evaluación de dietas vivas e inertes para el cultivo de la almeja fina, *Ruditapes decussatus*, mediante parámetros fisiológicos y bioquímicos. Tesis doctoral, Universidad de Compostela, Facultad de Biología. 242 pp.
- Albentosa-Verdú, M., A. Perez-Camacho, U. Labarta, M.J.Fernández-Reiriz 1997. Evaluation of freeze-dried microalgal diets for the seed culture of, *Ruditapes decussatus*, using physiological y biochemical parameters. *Aquaculture*, 154: 305-321.
- Araya, P., A. Pozo, M. Avedaño y R. Escribano. 1993. dinámica de alimentación de individuos *Argopecten purpuratus* L. en condiciones de laboratorio. *Rev. Biol. Mar.* 28(2): 313-329.
- AOAC, 1990. Official Methods of analysis, 15<sup>th</sup> edn., vol. 1. Association of Official Analytical Chemist, Arlington, VA, USA.
- Bailey, T.G. y B.H. Robinson. 1986. Food availability as a selective factor on the chemical compositions of mid-water fishes in the eastern North Pacific. *Marine Biology* 91: 131-141.
- Bayne, B., Newell, R.C. 1983. Physiological energetics of marine mollusks. En: Wilbur, K.M. y Saleuddin, A.S.M. (eds.), *The Mollusca*, vol. 4, Academic Press, N.Y., 523 pp.
- Becker, E. W. 1994. *Microalgae biotechnology y microbiology*. Cambridge:Cambridge University Press. USA. 290 pp.
- Bligh, E.G. y W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction an purification *Can. J. Biochem. Physiol*, 37: 911-917.
- Brown, M. R., S.W. Jeffrey y C.D. Garly. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture., a Literature review. Commonwealth Scientific y Industrial Research Organization, Marine Laboratories, Report. 205.
- Brown, M. R. y McCausland, M.A. 2000. Increasing the growth of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* by supplementary feeding with microalgal y dried diets. *Aquaculture Research*, 31: 671-682.

- Brown, M. R., 2002. Nutritional value of microalgae for aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Chu, F.L., Webb, K.L., Hepworth, D.A. y B.B. Casey. 1987. Metamorphosis of larvae of *Crassostrea virginica* fed microencapsuled diets. *Aquaculture*. 64: 185-197.
- Cordero-Esquivel, B. y Voltolina, D. 1994. Growth of *Mytilus galloprovincialis* fed with four microalgae y two feedeng regimes. *J. World Aquac. Soc.*, 25(3): 471-475.
- Coutteau, P. y Sorgeloos. 1992. The use of algal substitutes y the requirement for live algae in the hatchery y nursery rearing of bivalve molluscs:an international survey. *J. Shellfish Res.* 11: 467-476.
- Davis, H.C. y R.R. Guillard. 1958. Relative value of ten genera of microorganisms as food for oyster y clam larvae. U.S. Fish Wildlife Serv., Fish. Bull. 58: 293-304.
- Dhugal, J. Lindsay. 2002. Carbon y Nitrogen contents of mesopelagic organism: Results from Sagami Bay, Japan. Marine Ecosystems Research Department, Japan Marine Science y Technology Center, 2-15 Natsushima-cho, Yokosuka, Japan. 237-0016.
- Donnelly, J., D. G. Stickney y J.J. Torres. 1993. Proximate y elemental composition y energy content of mesopelagic crustaceans from the eastern Gulf of Mexico. *Marine Biology* 115: 469-480.
- Enright, C. T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S. y Castell, J.D. 1986. Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 96: 1-13.
- FAO. 2000. The state of world fisheries y aquaculture (SOFIA). [http://www.fao.org/sof/sofia/index\\_en.htm](http://www.fao.org/sof/sofia/index_en.htm).
- FAO, 2004. Assesing quality y safety of animal feeds. Paper 160. Food y Agriculture Organization of the United Nations. Rome,47 pp.

- Fernández-García, M.P. 1984. Crecimiento y sobrevivencia de las larvas de *Crassostrea gigas* alimentadas con la microalga *Pseudoisochrysis paradoxa* y suplementos de almidón de maíz y miel de abeja. Tesis Maestría. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (C.I.C.E.S.E.). 91 pp.
- García-Esquivel Z., Bricelj V.M. y González-Gómez, M.A. 2001. Physiological basis for energy demersal and early postlarval mortality in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 263: 77-103.
- Gerdes, D. 1983. The Pacific oyster *Crassostrea gigas* part. I. Feeding behavior of larvae and adults. *Aquaculture*, 31: 195-219.
- Gnaiger, E. y Bitterlich, B. 1984. Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. *Oecologia* 62: 289-298.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate animals. En: *Culture of Marine invertebrate animals*. Smith, W. L. y Chanley (eds). Plenum Publishing Corp., New York, 338 pp.
- Hernández-Luna, M.I. 2005. Cambios en la composición bioquímica de larvas fijadoras y poslarvas de ostión japonés (*Crassostrea gigas*) en presencia de alimento vivo e inerte. Tesis de oceanología. F.C.M. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C. México. 46 pp.
- Hopkins, K.D. 1992. Reporting fish growth: A review of the basics. *J. World Aquac. Soc.*, 23(3): 173-179.
- Iguchi, N., y T. Ikeda. 1998. Elemental composition (C, H, N) of the euphausiid *Euphausia pacifica* in Toyama Bay, southern Japan Sea. *Plankton Biology and Ecology*, 45: 79-84.
- Jørgensen, C.B. 1990. Bivalve Filter Feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology. Olsen & Olsen eds. Denmark. 140 pp.
- Knauer, J. y Southgate, P.C. 1997. Evaluation of microencapsulated squid oil as a substitute for live microalgae fed to Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *J. Shellfish Res.*, 16(2): 137-141.
- Knauer, J., y Southgate, P.C. 1999. A review of the nutritional requirements of bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve aquaculture. *Rev. Fish. Sci.* 7: 241-280.

- Labarta-Fernández, E. 1997. Desarrollo larvario de *Ostrea edulis* L. Nutrición y reservas energéticas. Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Biología. 258 pp.
- Laing, I., Millican, F. 1986. Relative growth y growth efficiency of *Ostrea edulis* L. spat fed various algal diets. *Aquaculture*, 54: 245– 262.
- Laing, I y Millican, P.F. 1992. Indoor nursery cultivation of juvenile mollusks using diets of dried algae. *Aquaculture*, 102: 231-143.
- Langdon, C.J. y M.J. Waldock. 1981. The effect of algal y artificial diets on the growth y fatty acid composition of *Crassostrea gigas* Spat. *J. Mar. Biol.Assoc. U.K.* 61:431-448.
- Langdon, C. J. 1983. Growth Studies with Bacteria-Free Oyster *Crassostrea gigas* Larvae Feed on Semi-Defined Artificial Diets. *Biol. Bull.* 164: 227-235.
- Langdon, C. J. 2003. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. *Aquaculture*, 227: 259-276.
- Lee, C.S. 2003. Biotechnological advances in finfish hatchery production: a review. *Aquaculture* 227: 439-458.
- Lora-Vilchis, M.C. 1997. Ingestion y digestion index of catarina scallop *Argopecten ventricosus* (circularis, Sowerby II, 1842), veliger larvae with ten microalgae species. *Aquaculture Research*. 28: 905-910.
- Loosanoff, V.L. y H. C. Davis, 1963. Rearing of bivalve mollusks. *Advances in Marine Biology* 1:136 pp.
- Mackie, G. 1969. Quantitative studies of feeding in the oyster *Crassostrea virginica* Proc. Natl. Shellfish. Ass. 59: 6-7.
- Malouf, R.E. y W.P. Bresse, 1977. Food consumption y growth of larvae of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in a constant flor rearing system. *Proc. Nat. Shellfish Ass.* 67:7-16.
- Montes-Macias, R. A. 2004. Cultivo de *Navícula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*, utilizyo medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Tesis de Licenciatura, C.U.C.B.A, U de G. Guadalajara, Jalisco. 70 pp.

- Namaguchi , K. 2002. Effect of an artificial diet on early spat growth of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. Fisheries Science, 68: 694-696.
- Navarro, J.M. y J.E. Winter. 1982. Ingestión rate, asimilación efficiency y energy balance in *Mytilus edulis* L. larvae. Aquaculture 182:301-315.
- Nikos, L. y I.A.N. Lucas. 2000. The use of larval fatty acid as an index of growth in *Mytilus edulis* L. larvae. Aquaculture 184:155- 166.
- Osman, R.W., R.B. Whitlatch & R.N. Zajac. 1989. Effects of resident species on recruitment into a community larval settlement versus post-settlement mortality in the oyster *Crassostrea virginica*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 5: 61-73.
- Pfeiler, E., Lindley, A.V., Elser, J.J. 1998. Elemental (C, N y P) analysis of metamorphosing bonefish (*Albula sp.*) leptocephali: relationship to catabolism of endogenous organic compounds, tissue remodeling y feeding ecology. Marine Biology 132: 21-28.
- Ponis, E., Robert, R. y Parisi, G. 2003. Nutritional value of fresh y concentrated algal diets for larval y juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Aquaculture, 221: 491-505.
- Pruder, G.D. y E.T. Bolton. 1978. System configuration y performance Bivalve Molluscan Mariculture. Proceeding of the Annual Meeting World Mariculture Society. 749-759.
- Riisgard, H.U. y A. Rylov. 1991. Energy budget, growth y filtration rates in *Mytilus edulis* at different algal concentrations. Marine Biology, 61:227-234.
- Robert, R., Trintignac, P. 1997. Substitutes for live microalgae in mariculture: a review. Aquat. Living Resour, 10: 315-327.
- Salinas-Ordaz, D. 1999. Utilización de ensilaje ácido de pescado como alimento para poslarvas de ostión. Tesis Maestría., Facultad de Ciencias Marinas, UABC. 79 pp.
- Soudant, P., Sanles, M.V, Quere, C., Le Coz, J.R, Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., Sorgeloos, P. 2000. The use of lipid emulsions for sterol supplementation of spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture, 184: 315–326.

- Sprung, M. y U. Rose. 1988. Influence of food size y quantity on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha*. *Oecologia*, 77:526-532.
- Stott, A., Takeuchi, T., Koike, Y., Yamakawa, H. y Imada, O. 2002. Using micro particle diets to replace diatoms for feeding postlarval abalone *Haliotis discus discus* (Reeve.). *Fisheries Science*, 68: 1088-1093.
- Strathmann, R., y Leise, E. 1979. On feeding mechanisms y clearance rates of molluscan veligers. *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.)* 157, 524-535.
- Teshima S., M. Ishikawa, y S. Koshio. 2000. Nutritional assessment y feed intake of microparticulate diets in crustaceans y fish. *Aquaculture Research*, 31: 691-702.
- Urban, E.R., Langdon, C.J., 1984. Reduction in cost of diets for the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), by the use of non-algal supplements. *Aquaculture* 38, 277-291.
- Utting, S.D. 1986. A preliminary study on growth of *Crassostrea gigas* larvae y spat in relation to dietary protein. *Aquaculture*, 56: 123-138.
- Walve, J. y Larsson, U., 1999 Carbon, nitrogen y phosphorus stoichiometry of crustacean zooplankton in the Baltic Sea: implications for nutrient recycling. *Journal of Plankton Research*. 21 (12), 2309-2321.
- Webb, K.L. y F.L. Chu. 1982. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In G.D. Pruder, C. Langdon y D. Conklin (Eds.), *Biochemical y physiological Approaches to Shellfish Nutrition*. Wld. Mari. Soc. Spec. Publ. 2, Baton Rouse, Louisiana. 272-291.
- Wilson, J.H. 1980. Particle retention y selection by larvae y spat of *Ostrea edulis* in algal suspensions *Mar. Biol. (Berlin)* 57: 135-145.