



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**

**Efecto del alimento en el desarrollo y sobrevivencia larval  
del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*  
(Echinoidea: Echinodermata)**

**TÉSIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA  
PRESENTA:**

*Verónica Cristina García Hernández*

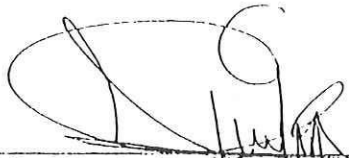
Ensenada, Baja California, 2003.

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS**

**Efecto del alimento en el desarrollo y sobrevivencia larval  
del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*  
(Echinoidea: Echinodermata)**

TÉSIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA  
PRESENTA:

*Verónica Cristina García Hernández*



MC. Alfredo Ernesto Salas Garza  
Director de tesis



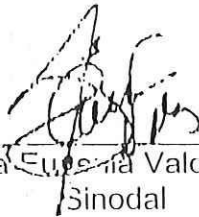
Dr. Eugenio de J. Carpizo Ituarte  
Sinodal



MC. Enrique Valenzuela Espinoza  
Sinodal



DRA. BEATRIZ CORDERO ESQUIVEL  
SINODAL



Dra. María Eugenia Valdez Ramírez  
Sinodal

Ensenada, Baja California, 2003.

***Dedicatoria***

***A Yolotzin***

## RESUMEN

El alimento es uno de los principales factores que producen cambios en la morfología y en la tasa de desarrollo de las larvas y a la fecha, se han realizado investigaciones utilizando diferentes especies de microalgas como fuente de alimento en el desarrollo y sobrevivencia de diferentes especies de erizo. Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios donde se evalúe la calidad del alimento en función de los perfiles de ácidos grasos, aminoácidos y azúcares. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el crecimiento y sobrevivencia larval utilizando tres diferentes microalgas como fuente de alimento estimando la concentración de proteínas, lípidos, carbohidratos y se analizaron los perfiles de aminoácidos; tanto en las larvas de erizo como en las microalgas utilizadas como alimento. Se probaron tres dietas con cuatro repeticiones; una compuesta por *Rhodomonas* sp. (100%), dos mezclas compuestas por: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* y *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* en una proporción 70-30% en función del número de células. Las microalgas utilizadas como fuente de alimento no mostraron diferencia en la concentración de proteínas ni lípidos; pero, se observa que una dieta compuesta por *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* en una proporción 70%-30%, provee una mayor sobrevivencia larval en el erizo rojo (55.2%). Las larvas alimentadas con esta mezcla tienen mayor concentración de proteínas y lípidos; lo cual coincide con el perfil proximal de las microalgas utilizadas como fuente de alimento. Se identificaron 16 aminoácidos. Isoleucina presenta las más altas concentraciones, tanto en los alimentos como en las larvas. Durante el desarrollo larval, se determinó que 10 de los 16 aminoácidos reportados, dominan en concentración en la mezcla de microalgas compuesta por *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*; lo cual puede explicar la relación que existe entre la calidad nutricional del alimento y la tasa de sobrevivencia larval.

## ÍNDICE

	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. OBJETIVO GENERAL</b>	8
2.1. <i>Objetivos particulares</i>	8
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	9
3.1. <i>Colecta de reproductores</i>	9
3.2. <i>Desove y fertilización</i>	9
3.3. <i>Cultivos larvarios</i>	10
3.4. <i>Diseño experimental para alimentación de larvas</i>	11
3.5. <i>Obtención de las microalgas</i>	12
3.6. <i>Sobrevivencia larval</i>	13
3.7. <i>Caracterización del crecimiento larval</i>	13
3.8. <i>Análisis de la composición bioquímica de larvas</i>	14
3.9. <i>Determinación del perfil de aminoácidos</i>	14
3.10. <i>Análisis estadístico</i>	15
<b>4. RESULTADOS</b>	16
4.1. <i>Cultivos de microalgas</i>	16
4.1.1. <i>Densidad</i>	16
4.1.2. <i>Contenido bioquímico de las dietas</i>	17
4.1.2.1. <i>Contenido proteico</i>	17
4.1.2.2. <i>Contenido lipídico</i>	19
4.1.2.3. <i>Contenido en carbohidratos</i>	19
4.2. <i>Cultivos larvarios</i>	22
4.2.1. <i>Condiciones de los cultivos</i>	22
4.2.2. <i>Contenido bioquímico durante el desarrollo larvario</i>	22
4.2.2.1. <i>Contenido Proteico por edad</i>	23
4.2.2.2. <i>Contenido lipídico</i>	25

4.2.2.3. <i>Contenido de carbohidratos</i>	27
4.3. <i>Relaciones dieta-rendimiento larvario</i>	29
4.3.1. <i>Determinación bioquímica</i>	29
4.3.2. <i>Determinación de aminoácidos</i>	31
4.3.1.1. <i>Perfil de aminoácidos en las dietas</i>	31
4.3.1.2. <i>Perfil de aminoácidos en las larvas</i>	39
4.3.2. <i>Crecimiento larval</i>	41
4.3.3. <i>Sobrevivencia larval</i>	42
<b>5. DISCUSIÓN</b>	45
<b>6. CONCLUSIONES</b>	57
<b>7. RECOMENDACIONES</b>	58
<b>8. LITERATURA CITADA</b>	59
<b>APÉNDICE</b>	66

### ***Lista de Tablas***

No. Tabla	Título	Página.
I	Microalgas utilizadas como fuente de alimento en diversas especies de erizo.	6
II	Composición de las dietas y raciones de alimento durante el experimento.	12
III	Análisis proximal promedio (%) en las microalgas utilizadas como alimento y en larvas de erizo rojo <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> .	18
IV	Concentración de aminoácidos ( $\mu\text{m}/\text{ml}$ ) en las microalgas utilizadas como alimento y en las larvas alimentadas con cada tratamiento.	33
V	Biometrías promedio ( $\mu\text{m}$ ) de larvas alimentadas con tres dietas microalgales a los 2, 12 y 22 días de edad. ( <b>Rh:</b> <i>Rhodomonas</i> sp.; <b>Rh-Iso:</b> <i>Rhodomonas</i> sp- <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> y <b>Rh-Chae:</b> <i>Rhodomonas</i> sp- <i>Chaetoceros muelleri</i> ).	41
VI	Resultado del análisis estadístico. (Prueba No Paramétrica de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples con el método de Dunn's).	44

## **Lista de Figuras**

No. Figura.	Título	Página
1	Diseño de la unidad experimental para el cultivo de larvas erizo <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> . Sistema de airación continua en pvc.	11
2	Medidas en larvas de <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> .	13
3	Densidad de microalgas (célx10 <sup>6</sup> /ml <sup>-1</sup> ) en los cultivos de <i>Rhodomonas</i> sp., <i>Chaetoceros muelleri</i> e <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> utilizadas como alimento para larvas de <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> .	20
4	Contenido de proteínas (%) en las dietas, <b>Rh:</b> <i>Rhodomonas</i> sp.; <b>Rh-Iso:</b> <i>Rhodomonas</i> sp- <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> ; <b>Rh-Chae:</b> <i>Rhodomonas</i> sp- <i>Chaetoceros muelleri</i> , utilizadas como alimento durante el desarrollo larvario de <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> .	18
5	Contenido de lípidos (%) en las dietas, <b>Rh:</b> <i>Rhodomonas</i> sp.; <b>Rh-Iso:</b> <i>Rhodomonas</i> sp- <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> ; <b>Rh-Chae:</b> <i>Rhodomonas</i> sp- <i>Chaetoceros muelleri</i> , utilizadas como alimento durante el desarrollo larvario de <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> .	19

- 
- 6 Contenido de carbohidratos (%) en las dietas, **Rh:** 20  
*Rhodomonas* sp.; **Rh-Iso:** *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff.  
*galbana*; **Rh-Chae:** *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*,  
utilizadas como alimento durante el desarrollo larvario de  
*Strongylocentrotus franciscanus*.
- 7 Porcentaje promedio de proteínas, lípidos y carbohidratos en 21  
las dietas suministradas a larvas de *S. franciscanus*: **Rh:**  
*Rhodomonas* sp.; **Rh-Iso:** *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff.  
*galbana*; **Rh-Chae:** *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*.  
Las barras verticales muestran el error estándar.
- 8 Fig. 8. Temperatura registradas en las unidades 22  
experimentales, durante el cultivo de larvas de erizo rojo  
*Strongylocentrotus franciscanus*. **Rh:** *Rhodomonas* sp.; **Rh-**  
**Iso:** *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*; **Rh-Chae:**  
*Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*.
- 9 Contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos en larvas de 23  
erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* en estadio prisma.  
Las barras verticales muestran el error estándar.
- 10 Contenido de proteínas en larvas de 12 días de edad de 24  
*Strongylocentrotus franciscanus* alimentadas con **Rh:**  
*Rhodomonas* sp.; **Rh-Iso:** *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff.  
*galbana*; **Rh-Chae:** *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*.  
Las barras verticales muestran en error estándar. Valores  
establecidos en muestras de 400 larvas.
-

- 
- 11 Contenido de proteínas en larvas de 22 días de edad de *Strongylocentrotus franciscanus* alimentadas con Rh: *Rhodomonas* sp.; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*; **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*. 25
- 12 Contenido de lípidos en larvas de 12 días de edad de *Strongylocentrotus franciscanus* alimentadas con Rh: *Rhodomonas* sp.; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*; **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*. Las barras verticales muestran el error estándar. 26
- 13 Contenido de lípidos en larvas de 22 días de edad de *Strongylocentrotus franciscanus* alimentadas con Rh: *Rhodomonas* sp.; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*; **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*. Las barras verticales muestran el error estándar. 27
- 14 Contenido de carbohidratos en larvas de 12 días de edad de *Strongylocentrotus franciscanus* alimentadas con Rh: *Rhodomonas* sp.; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*; **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*. Las barras verticales muestran el error estándar. 28
- 15 Contenido de carbohidratos en larvas de 22 días de edad de *Strongylocentrotus franciscanus* alimentadas con Rh: *Rhodomonas* sp.; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*; **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*. Las barras verticales muestran el error estándar. 29
-

---

16	Contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos en el desarrollo larval de <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> alimentadas con <b>Rh</b> : <i>Rhodomonas</i> sp.; <b>Rh-Iso</b> : <i>Rhodomonas</i> sp- <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> y <b>Rh-Chae</b> : <i>Rhodomonas</i> sp- <i>Chaetoceros muelleri</i> . Las barras verticales muestran el error estándar.	31
17	Contenido de aminoácidos en el alimento utilizado en el cultivo de larvas de erizo rojo <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> . ( <b>Rh-Iso</b> : <i>Rhodomonas</i> sp- <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> ; <b>Rh</b> : <i>Rhodomonas</i> sp.; <b>Rh-Chae</b> : <i>Rhodomonas</i> sp- <i>Chaetoceros muelleri</i> ).	34
18	Contenido de aminoácidos en larvas de erizo rojo <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> , en estadio prisma.	35
19	Concentración de aminoácidos en larvas de erizo rojo ( <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> ) alimentadas con <i>Rhodomonas</i> sp.	36
20	Contenido de aminoácidos en larvas de erizo rojo ( <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> ) de 12 y 22 días de edad alimentadas con <i>Rhodomonas</i> sp- <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> .	37
21	Contenido de aminoácidos en larvas de erizo rojo ( <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> ) de 12 y 22 días de edad alimentadas con <i>Rhodomonas</i> sp- <i>Chaetoceros muelleri</i> .	38

---

- 
- 22 Sobrevivencia de larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*, alimentado con tres dietas microalgales (**Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*; **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*; **Rh**: *Rhodomonas* sp). Las barras verticales indican el error estándar.
- 

### Apéndices

1	Porcentaje de proteínas, lípidos y carbohidratos en tres géneros de microalgas.	67
2	Temperatura y tiempo de desarrollo larvario del erizo rojo <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> .	68

## 1. INTRODUCCIÓN

Los erizos constituyen importantes pesquerías en varios países del mundo, principalmente en Japón, Chile, Estados Unidos de América, Noruega, Australia, Canadá, Corea, Francia y México (Arredondo-Gómez, 1994). Japón y Francia son los principales consumidores de este recurso (60,000 y 1,000 toneladas de peso bruto por año respectivamente) (Hagen, 1996). La producción mundial de erizo del ambiente natural alcanzó poco más de las 60,000 toneladas de peso vivo por año; estos niveles de producción no han sido sostenibles y las capturas han disminuido en todo el mundo de manera significativa (Hagen, 1996).

En Baja California, México, se inició la pesquería del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) en 1960, debido a su demanda en el mercado internacional (Malagrino-Lumare, 1972); registrándose capturas de 4000 ton de peso bruto por año, equivalente a 320 toneladas de gónada de erizo rojo, lo cual generó divisas por más de cinco millones de dólares (Kato y Schroeter, 1985).

Con el fin de regular la pesquería de este recurso, en 1987 se implementó su regulación (Ramírez, 1987). Se estableció una talla mínima de captura de 80 mm de diámetro de testa, una temporada de veda de febrero a julio y una cuota de extracción dependiendo de la estructura de la población por temporada (SEMARNAP, 1998). A pesar de esto, en 1992 la captura por unidad de esfuerzo disminuyó de 305 a 120 kg/marea/embarcación, lo que representa una reducción del 61% (Arredondo-Gómez 1994), sin poderse recuperar hasta la fecha. A partir

de 1994 se inicia la pesquería del erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*) y en 1998, más del 90% de la captura correspondió a esta especie, debido al bajo rendimiento de las gónadas del erizo rojo, lo que a su vez, produjo una disminución del precio en el mercado internacional (SEMARNAP, 1998).

La acuicultura del erizo es de gran interés y se considera una alternativa para la recuperación de este recurso, mediante actividades de repoblación y la implementación de programas de cultivo en cautiverio; principalmente en áreas donde la población de este organismo ha disminuido significativamente. Para realizar estas actividades, es fundamental contar con una biotecnología para la producción masiva de juveniles de erizo, la cual debe ser planeada y controlada en laboratorio. Sin embargo, el erizo tiene un complejo ciclo de vida, pasa por una serie de etapas embrionarias en forma de blástula ciliada, gástrula ciliada, prisma, equinopluteus 4 brazos, equinopluteus 6 brazos y equinopluteus 8 brazos, posteriormente pasa a su estado post-metamórfico en el sustrato (Colby, 1979; Lawrence *et al.*, 2001); lo cual hace complejo el desarrollo de su cultivo.

Los japoneses iniciaron la biotecnología de producción de juveniles de erizo a principios de los 80's y actualmente se cultivan seis especies con fines de repoblación (*Strongylocentrotus intermedius*, *S. nudus*, *Pseudocentrotus depressus*, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Tripneustes pileolus* y *Anthocardia crassispina* (Saito *et al.*, 1985; Hagen, 1996, Yokota, 2000); mientras que, en Chile se cultiva *Loxechinus albus* (González *et al.*, 1987; Bustos *et al.*, 1991; Bustos y Olave, 2001). En México, también se ha intentado cultivar erizo,

aunque no se ha logrado la producción masiva de juveniles (Salas-Garza *com. per.*).

Se considera que entre los factores más relevantes durante el desarrollo larval, se encuentra el control del fotoperíodo, la temperatura (Hagen, 1996), la densidad de cultivo, la calidad de agua, el manejo de los organismos y el pH (Arredondo-Gómez, 1994). Además, el alimento es uno de los principales factores que modifican la morfología y la tasa de crecimiento de larvas (Boidron-Metairon 1988) y puede ser una importante fuente de mortalidad (Olson y Olson 1989).

Los equinodermos se alimentan principalmente de fitoplancton durante su estadio larval (Strathmann 1975); por lo tanto, la calidad nutricia de las microalgas juega un papel relevante en el desarrollo de las larvas (Volkman *et al.*, 1989). Factores, tales como tamaño, toxicidad, digestibilidad y composición bioquímica de las microalgas; además de raciones adecuadas, pueden marcar la diferencia en su valor alimenticio (Strathmann, 1975; Webb y Chu, 1983).

Al proporcionar alimento en concentración adecuada para el organismo se asegura una mayor sobrevivencia en los estadios larvarios (González *et al.*, 1987; Bustos *et al.*, 1991; Martínez-López, 1994; Metaxas y Young, 1998a). Una escasez de alimento provoca un alargamiento de los brazos de las larvas, como estrategia para tener una mayor superficie de contacto agrandando las bandas ciliadas y de esta manera obtener más alimento (Strathmann, 1987; Hart y Strathmann, 1994; Metaxas y Young, 1998b); y como resultado de lo anterior el

proceso de metamorfosis se ve afectado en un tiempo más prolongado (Fonseca-Madrigal, 2001).

Las microalgas varían en su concentración de proteínas, lípidos y carbohidratos, tanto de una especie a otra, como a través del tiempo en que se desarrolla el cultivo (Volkman *et al.* 1989, Brown *et al.* 1997 y Renaud *et al.* 1999). Conocer la composición proximal es de gran relevancia ya que, el contenido de lípidos y proteínas son importantes reservas energéticas en la mayoría de los invertebrados marinos (George, 1996) y proporciona los elementos necesarios para un crecimiento óptimo, medido en términos de longitud del cuerpo, periodos cortos de desarrollo y grandes cantidades de reservas energéticas; además, las diferencias observadas en la talla larval han sido asociadas con diferencias en la cantidad de proteínas y lípidos en el alimento (Boidron-Métairon 1988). De manera particular, el alimento que requiere la larva planctotrófica del erizo, es utilizado para llevar a cabo satisfactoriamente funciones vitales como sobrevivir, nadar, comer, crecer, asentarse en una área favorable, metamorfizarse y finalmente, convertirse en juvenil (Strathmann, 1971).

La duración del estadio larvario está influenciado por la calidad del alimento (Fenaux, 1982; Boidron-Métairon, 1995), y su calidad puede ser evaluado determinando las características proximales (proteínas, lípidos y carbohidratos) y mediante un análisis detallado de perfiles de ácidos grasos, azúcares y aminoácidos.

A la fecha, se han realizado investigaciones utilizando diferentes especies de microalgas como fuente de alimento en el desarrollo y sobrevivencia de diferentes especies de erizo (Tabla I). Jong-Wetman *et al.* (1985) evaluaron el nivel proteico y otros aditivos en la calidad del huevo, morfometría y sobrevivencia larval de *Strongylocentrotus droebachiensis*. Saito *et al.* (1985) utilizaron *Chaetoceros gracilis* para alimentar larvas de *Strongylocentrotus intermedius*. González *et al.* (1987) evaluaron el efecto de la dieta y la temperatura durante el desarrollo larval y juvenil de *Lixechinus albus*; Boidron-Metairon (1995) midió la plasticidad morfológica larval de *Lytechinus variegatus* en respuesta a la concentración de alimento, mientras que George *et al.* (1990) determinaron la diferencia en la calidad de los huevos y desarrollo larval de *Arbacia lixula*. Se estimó el tiempo de desarrollo en larvas de *Strongylocentrotus purpuratus* (Cameron y Schroeter, 1980) y en larvas de *Strongylocentrotus franciscanus* (Martínez-López, 1994) alimentadas con *Rhodomonas* sp. Ecker (1998) estudió el desarrollo, crecimiento y morfología de *Diadema antillarum* utilizando como alimento *Rhodomonas lens* e *Isochrysis galbana*. Maeve *et al.* (2000) describieron la morfología y sobrevivencia larval en respuesta a una variación en la cantidad y calidad del alimento y Fonseca-Madrugal (2000) estimó el desarrollo y sobrevivencia larval y postmetamorfica por efecto del alimento en *Strongylocentrotus purpuratus*. Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios donde se evalúe la calidad del alimento en función de los perfiles de ácidos grasos, aminoácidos y azúcares. En esencia, este tipo de análisis puede revelar las características respecto a los requerimientos nutricionales de los organismos.

Tabla I. Microalgas utilizadas como fuente de alimento en diversas especies de erizo.

Fuente	Especie (erizo)	Especie (microalgas)
González <i>et al.</i> , 1987	<i>Lixechinus albus</i>	<i>Isochrysis aff. galbana</i> <i>Dunaliella tertiolecta</i>
Boidron-Metairon, 1995	<i>Lytechinus variegatus</i>	<i>Rhodomonas lens</i>
George <i>et al.</i> , 1990	<i>Arbacia lixula</i>	<i>Isochrysis galbana</i> <i>Hymenononas elongata</i>
Pedroti y Fenaux, 1993	<i>Paracentrotus lividus</i>	<i>Nannochloris sp.</i> <i>Isochrysis galbana</i> <i>Cricosphaera elongata</i> <i>Prorocentrum micans</i>
Jong-Westman <i>et al.</i> , 1995	<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	<i>Chaetoceros gracilis</i> <i>Nannochloropsis sp.</i>
Eckert, 1998	<i>Diadema antillarum</i>	<i>Rhodomonas lens</i> <i>Isochrysis galbana</i>
	<i>Paracentrotus lividus</i> <i>Arbacia lixula</i>	<i>Nannochloris sp.</i> <i>Isochrysis galbana</i> <i>Cricosphaera elongata</i> <i>Prorocentrum micans</i>
	<i>Paracentrotus lividus</i>	<i>Posidonia oceanica</i>
Maeve <i>et al.</i> , 2000	<i>Psammechinus miliaris</i>	<i>Pleurocysis elongata</i> <i>Dunaliella tertiolecta</i>
Fonseca-Madrigal, 2000	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	<i>Rhodomonas sp.</i> <i>Isochrysis aff. galbana</i> <i>Chaetoceros muelleri</i>

El proporcionar una alimentación adecuada a larvas de erizo permitirá obtener larvas competentes para la metamorfosis y así, incrementar la sobrevivencia. Esto, representará un avance importante en el desarrollo biotecnológico de la producción de juveniles (Fonseca-Madrigal, 2001).

*Rhodomonas* sp. se ha recomendado como alimento para erizos durante el desarrollo larval (Hinegardner, 1969; Cameron y Hinegardner 1974, Martínez-López 1994; Emler, 2000) y se ha reportado que contiene una alta concentración de proteína (Fonseca-Madrigal, 2001). Sin embargo, las microalgas pueden ser limitantes en uno o más de los nutrientes claves, la mezcla algal, como fuente de alimento, provee un mejor balance nutricional (Brown *et al.*, 1997). Con base en lo anterior, el presente estudio fue diseñado para evaluar la concentración de proteína, lípidos, carbohidratos y el aporte nutricional de los aminoácidos, utilizando tres dietas microalgales; analizando la concentración proximal y el perfil de aminoácidos tanto en larvas como en las microalgas utilizadas como fuente de alimento.

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del alimento, en función de la concentración de proteína, lípidos, carbohidratos y el perfil de aminoácidos, en el desarrollo y sobrevivencia de las larvas del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

Determinar la relación en la concentración de proteína, lípidos y carbohidratos entre las larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* y las microalgas utilizadas como fuente de alimento.

Determinar la relación, en función el perfil de aminoácidos, entre las larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* y las microalgas utilizadas como fuente de alimento.

Evaluar el crecimiento y sobrevivencia larval utilizando tres diferentes microalgas como fuente de alimento.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Colecta de reproductores**

Durante el periodo reproductivo de 2001, se colectaron 15 erizos adultos de *Strongylocentrotus franciscanus* en Campo Kennedy, Baja California. En el momento de su extracción, los organismos fueron colocados dentro de hieleras de plástico y cubiertos con macroalgas (*Macrocystis pyrifera*), para evitar la deshidratación durante su traslado en seco al Laboratorio de Embriología de Organismos Marinos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). A su llegada a este laboratorio, fueron distribuidos en diferentes recipientes de fibra de vidrio con capacidad de 360 L, con flujo continuo de agua de mar y *Macrocystis pyrifera* como alimento.

#### **3.2. Desove y fertilización**

Un día después de su llegada al laboratorio, se realizó la inducción al desove y fertilización de acuerdo al método propuesto por Strathmann (1987), el cual se basa en la aplicación de 3 mililitros de una solución 0.5 M de cloruro de potasio, a través de la membrana bucal, hacia la cavidad celómica. Se eligieron gametos de cuatro hembras y dos machos; en función de sus características morfológicas (Salas-Garza, com. per.). Los gametos femeninos y masculinos fueron colocados por separado en recipientes con 5 L y 500 mL respectivamente, con agua de mar filtrada a 1  $\mu\text{m}$  e irradiada con luz ultravioleta (UV); esta calidad de agua fue utilizada durante todo el experimento.

Para la fecundación, 100 mL de la suspensión de espermatozoides fue agregada a la solución de óvulos. La mezcla se homogenizó para inducir un mayor porcentaje de gametos fecundados. Después de 15 minutos de la fertilización, se realizó el conteo de tres alícuotas de 1 mL en observación directa en microscopio. La media de estos conteos permitió establecer tanto el número total de gametos como el cálculo de la tasa de fecundación. Los óvulos asentados se colectaron en un filtro de 48  $\mu\text{m}$  y se lavaron con agua de mar con el fin de eliminar el exceso de esperma. Concluido el lavado, los huevos se concentraron en un volumen 5 L.

### ***3.3. Cultivos larvarios***

Una vez fecundados, los cigotos fueron colocados en recipientes de 18 litros sin aireación durante 48 horas, tiempo durante el cual la utilización de las reservas vitelinas es máxima dando origen al estadio prisma con capacidad propia para alimentarse. Al concluir 48 horas, las larvas se concentraron en un recipiente de 5 L y se tomaron 15 muestras independientes de 1 mL con el propósito de calcular el número total de larvas. En este estadio, las larvas fueron distribuidas en tanques de 45 L, a razón de 2.5 larvas por mL ( $\pm 114,000$  en cada tanque) manteniéndose con aireación continua (Fig. 1); para realizar la limpieza se utilizaron mangueras de 1/8" con el objetivo de evitar la destrucción de las larvas.

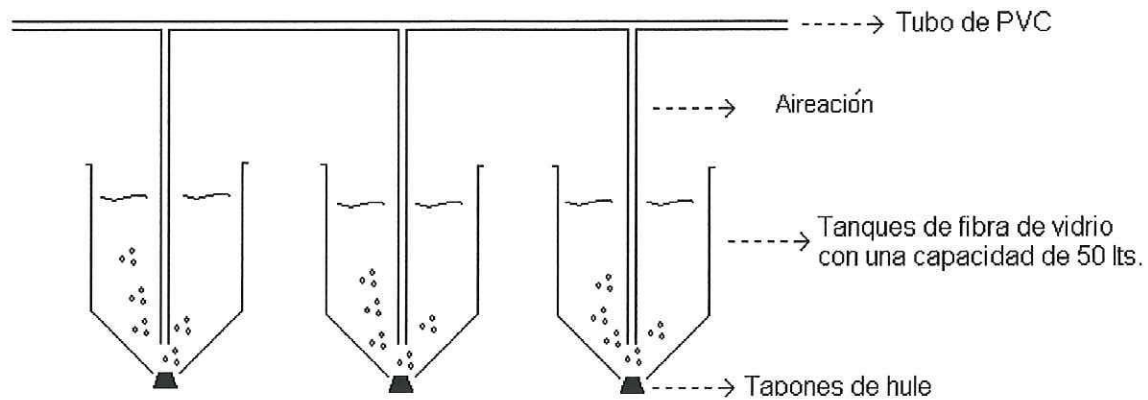


Fig. 1. Diseño de la unidad experimental para el cultivo de larvas de erizo *Strongylocentrotus franciscanus*. Sistema de aireación continua en pvc.

El desarrollo larval tuvo una duración de 26 días, tiempo en que se inició la metamorfosis y posteriormente el asentamiento de la larva.

El mantenimiento de las unidades experimentales consistió en recambios del 50% de agua cada 48h y del 100% cada siete días. Estos recambios fueron realizados con ayuda de diferentes tamices de distinta apertura de malla ascendente de 50, 90, 108, 160 y 215  $\mu\text{m}$  de acuerdo al crecimiento de las larvas en laboratorio. El suministro diario de alimento se realizó en una dosis única al 100% o al 50% de acuerdo al número de células por mililitro y con el tipo de recambio previamente especificados (tabla II). En forma complementaria, la temperatura ( $\pm 1$  °C de precisión) y la concentración de oxígeno disuelto (oxímetro YSI modelo 51B) fueron registradas diariamente.

### **3.4. Diseño experimental para alimentación de larvas**

Se llevó a cabo un diseño aleatorio simple con cuatro repeticiones por cada tratamiento. Con el propósito de evaluar la calidad nutricia de las

microalgas, se escogieron tres dietas (Tabla II), la efectividad de las dietas pretende ser verificada en términos de sobrevivencia y crecimiento larvario.

Tabla II. Composición de las dietas y raciones de alimento durante el experimento.

Alimento	Ración %	Semana 1 Cél mL <sup>-1</sup>	Semana 2 Cél mL <sup>-1</sup>	Semana 3 Cél mL <sup>-1</sup>
<i>Rhodomonas</i> sp	100	10 000	15 000	15 000
<i>Rhodomonas</i> sp + <i>Chaetoceros muelleri</i>	70-30	7 000 + 3 000	10 500 + 4 500	10 500 + 4 500
<i>Rhodomonas</i> sp + <i>Isochrysis aff. galbana</i>	70-30	7 000 + 3 000	10 500 + 4 500	10 500 + 4 500

### 3.5. Obtención de las microalgas

La cosecha de las microalgas se realizó durante la fase de crecimiento exponencial (entre el 7 y el 11 día de cultivo). El medio de cultivo fue el "f/2" de Guillard (1975), con adición de silicatos en el caso de *Chaetoceros muelleri*. Los cultivos se mantuvieron en sistema semicontinuo, con tasas de renovación diaria del 25%. Las microalgas fueron cultivadas y proporcionadas por el Laboratorio de Microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC.

### 3.6. *Sobrevivencia larval*

La sobrevivencia larval por cada tanque fue calculada con una periodicidad de 10 días. Para este propósito, los cultivos fueron concentrados individualmente, con ayuda de un tamiz con luz de malla de 50, 90, 108, 160 y 215  $\mu\text{m}$  dependiendo de la talla larval, en un volumen de 5 L de agua de mar, a partir del cual se tomaron de 8 a 10 muestras de 1 mL., las larvas contenidas en cada muestra fueron contadas. La sobrevivencia se calculó de acuerdo a la concentración inicial de larvas.

### 3.7. *Caracterización del crecimiento larval*

Una biometría realizada para 15 organismos obtenidos al azar permitió el monitoreo del crecimiento de las larvas de cada tratamiento. La primera medición se realizó a los 3 días posteriores a la fertilización; la segunda a los 11 días y la tercera a los 22 días. Con este fin, las larvas se colocaron en una cámara de conteo, se midió largo y ancho, de acuerdo con la figura 5, con un micrómetro y la ayuda de un microscopio compuesto.

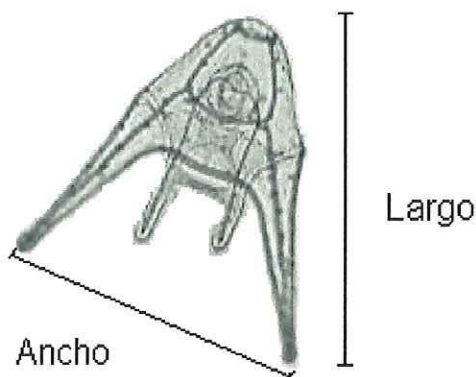


Fig. 2. Medidas en larvas de *Strongylocentrotus franciscanus*.

### **3.8. Análisis de la composición bioquímica de larvas**

Los días 3, 11 y 22 del cultivo, se tomaron muestras de 400 larvas por triplicado para la determinación de proteínas, lípidos, carbohidratos y aminoácidos. Para la caracterización proximal y de aminoácidos de las microalgas, muestras de 20 mL, fueron filtrados cada 6 días por cada tratamiento (por triplicado), en filtros Whatman GF/C de 25 mm de diámetro. Para determinar el peso seco muestras de 50 mL fueron filtradas con la misma frecuencia y características. Los resultados obtenidos fueron expresados en porcentaje de materia húmeda.

Para la cuantificación de proteínas totales se utilizó el método de Lowry *et al.* (1951), el cual implica la utilización de un estándar a base de albúmina de bovino. Los carbohidratos se analizaron de acuerdo al método colorimétrico de fenol-sulfúrico de Dubois *et al.* (1956), utilizando un estándar de glucosa anhidra. La concentración de lípidos se determinó por el método de Bligh y Dyer (1959), implementando una curva de calibración a base de tripalmitina.

### **3.9. Determinación del perfil de aminoácidos**

Las muestras fueron secadas y lavadas para la eliminación de grasas siguiendo el método de Soxhlet como lo recomienda la AOAC (1990). Para determinar el perfil de aminoácidos, las muestras fueron hidrolizadas. A una muestra de 25 mg se le adicionó 2 mL de HCl 6N con 0.06% de fenol, se calentó a 110°C durante 24 h. Posteriormente, las muestras fueron secadas con nitrógeno y rehidratadas con 50 ml de agua. Para la determinación de aminoácidos libres, se llevó a cabo la extracción con etanol, se adicionó 1.5 ml

de etanol al 70% a 25 mg de tejido, se homogenizó y después de 4 h se centrifugó a 1600 g y 10°C durante 5 min, el sobrenadante fue refrigerado para su posterior análisis. Se utilizó HPLC para estimar los perfiles usando un sistema AccQ•Tag™. Se utilizó una columna de fase reversa 4mm Nova Pak™C<sub>18</sub> de 3.9 x 150 mm en un amortiguador de acetonitrilo, se utilizó un detector de fluorescencia (Waters 474), y como estándar interno  $\alpha$ -aminobutírico más tirosina debido al alto contenido en moluscos. Se utilizaron tres diferentes concentraciones de estándar de 12.5 a 75 pmol y de estándar interno 2.5 nM.

La cuantificación de los aminoácidos fue registrada y graficada automáticamente para cada muestra.

### ***3.10. Análisis estadísticos***

Debido a que los datos obtenidos no presentaron normalidad ni homogeneidad de varianzas las comparaciones estadísticas fueron basadas en la aplicación del análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. Cuando se encontraron diferencias significativas la prueba de comparación múltiple de Dunn's fue utilizada con el propósito de detectar las diferencias para cada tratamiento.

## **4. RESULTADOS**

Con el propósito de hacer más comprensible la presentación de los resultados, en la primera parte se expondrá lo concerniente a la calidad de las dietas, en la segunda parte los que corresponden a los parámetros de rendimiento larvario y finalmente la relación entre este rendimiento y la calidad de las dietas.

### **4.1. Cultivos de microalgas**

#### **4.1.1. Densidad**

La densidad celular en los cultivos de microalgas varió de 818,500 a  $1.6 \times 10^5$  cél/mL para *Rhodomonas* sp.; en el cultivo de *Chaetoceros muelleri* la variación fue de  $1.9 \times 10^5$  a  $3.6 \times 10^5$  cél/mL; mientras que, en el cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* se cuantificó una concentración entre  $4.6 \times 10^5$  y  $7.6 \times 10^5$  cél/mL, mostrando más alta variación durante los primero 12 días del experimento (Fig. 3).

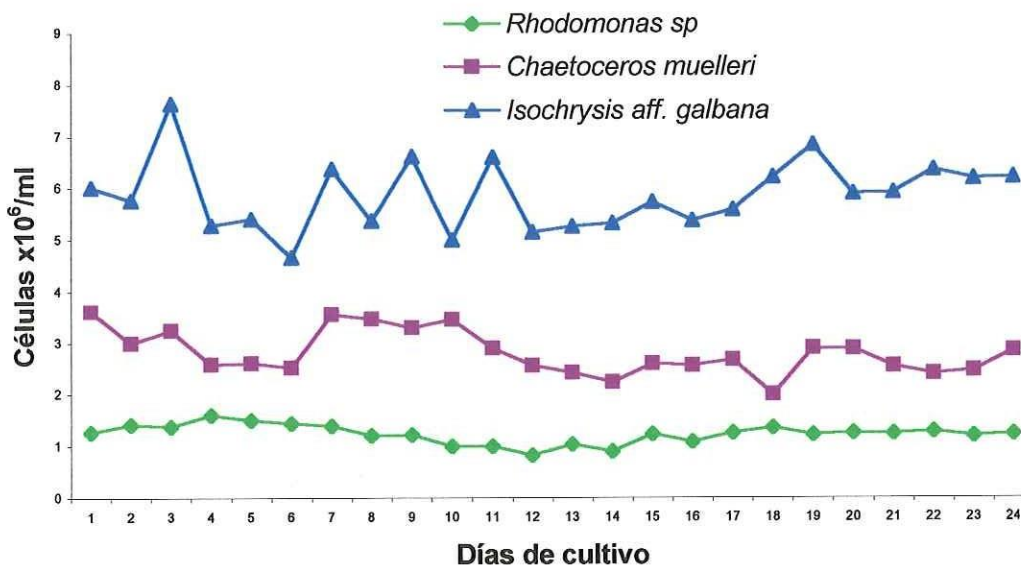


Fig. 3. Densidad de microalgas (célx10<sup>6</sup>/ml<sup>-1</sup>) en los cultivos de *Rhodomonas sp.*, *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis aff. galbana* utilizadas como alimento para larvas de *Strongylocentrotus franciscanus*.

#### 4.1.2. Contenido bioquímico de las dietas

Durante el desarrollo del experimento se determinó la variación en la proporción de proteínas, lípidos y carbohidratos en cada una de los tratamientos, con el objetivo de comparar y evaluar su efecto en las larvas.

##### 4.1.2.1. Contenido proteico

En *Rhodomonas sp.* la concentración de proteínas varió entre 25.5% y 43.3%; en la mezcla compuesta por *Rhodomonas sp-Isochrysis aff galbana* osciló entre 31.2 y 40.32% y en *Rhodomonas sp-Chaetoceros muelleri* se determinaron proporciones entre 37.0 y 42.0% (Tabla III, Fig. 4).

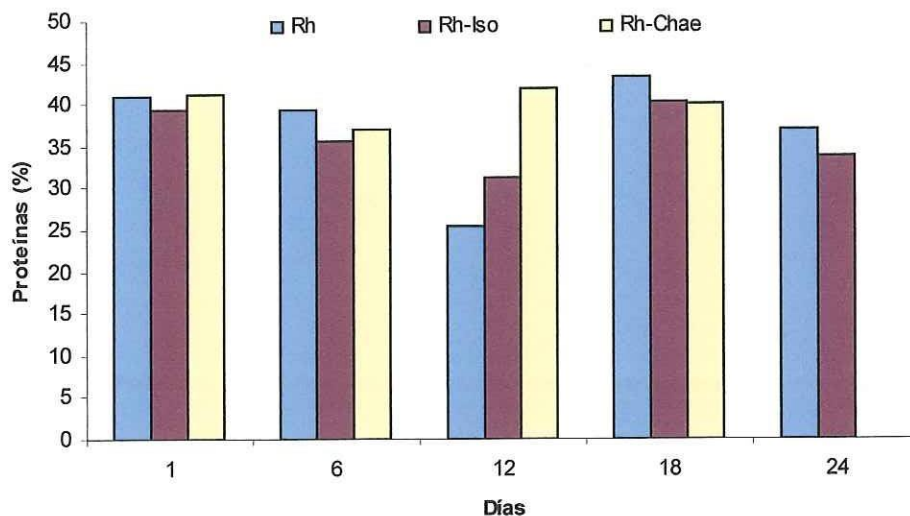


Fig. 4. Contenido de proteínas (%) en las dietas, **Rh**: *Rhodomonas* sp; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*; **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*, utilizadas como alimento durante el desarrollo larvario de *Strongylocentrotus franciscanus*.

Tabla III. Análisis proximal promedio en (%) en las microalgas utilizadas como alimento y en larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*.

Tratamientos	Proteína (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)	Peso seco pg
Microalgas	(%)	(%)	(%)	
Rh	36.72	12.82	6.04	208.1
Rh-Iso	36.09	13.05	4.10	205.6
Rh-Chae	40.08	20.44	4.75	228.5
Larvas de 2 días de edad	43.36	19.60	5.34	875.0
Larvas de 12 días de edad				
Rh	47.98	45.36	3.30	4351.8
Rh-Iso	48.25	38.43	4.55	4805.5
Rh-Chae	58.26	49.30	2.81	3407.4
Larvas de 22 días de edad				
Rh	15.98	41.76	3.22	5333.3
Rh-Iso	20.24	43.22	4.41	5111.1
Rh-Chae	20.22	41.33	5.75	4778.7

RH: *Rhodomonas* sp. (100%)

RI: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* (70%-30%)

RC: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* (70%-30%)

#### 4.1.2.2. Contenido lipídico

En *Rhodomonas* sp. se estimó entre 9.1% y 18.6%; en la mezcla compuesta por *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff *galbana* osciló entre 12.4 y 14.8% y en *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* se determinaron proporciones entre 7.7 y 18.9% (Tabla III, Fig. 5).

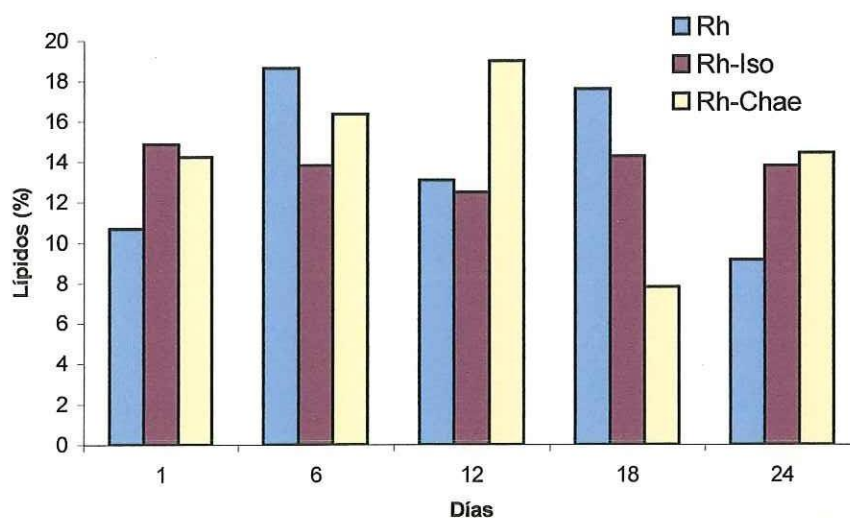


Fig. 5. Contenido de lípidos (%) en las dietas: **Rh**: *Rhodomonas* sp.; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*; **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* utilizadas como alimento durante el desarrollo larvario de *Strongylocentrotus franciscanus*.

#### 4.1.2.3. Contenido de carbohidratos

En *Rhodomonas* sp. se estimó entre 4.5 y 6.8%; en la mezcla compuesta por *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff *galbana* osciló entre 3.0 y 4.6% y en *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* se determinaron proporciones entre 3.5 y 5.7% (Tabla III, Fig. 6).

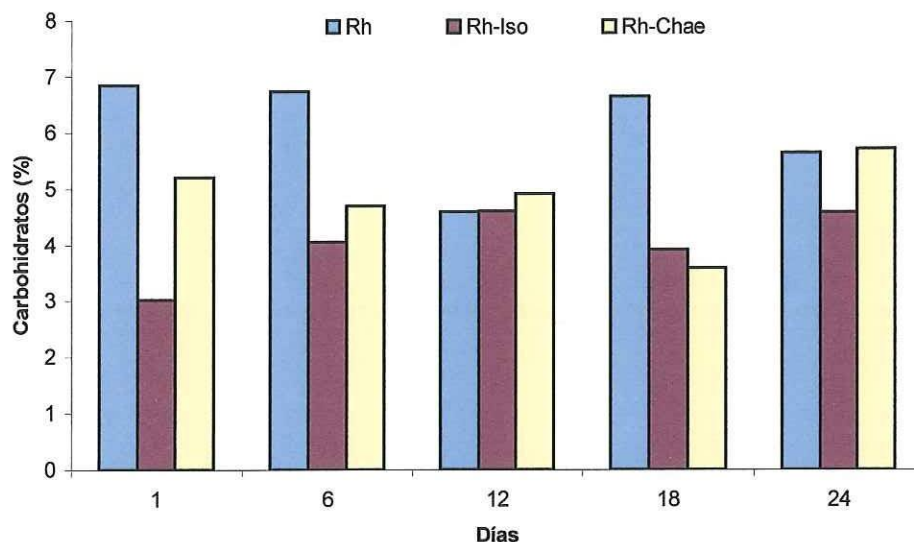


Fig. 6. Contenido de carbohidratos en las dietas, **Rh**: *Rhodomonas* sp.; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*; **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*, utilizadas como alimento durante el desarrollo larvario de *Strongylocentrotus franciscanus*.

El promedio de proteínas en *Rhodomonas* sp fue 36.7% en peso húmedo. En la mezcla compuesta por *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff *galbana* se obtuvo 36% y en la mezcla de *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* la proporción fue de 40% (Tabla III, Figura 7). No se encontraron diferencias en el porcentaje de proteína entre las microalgas mencionadas ( $P > 0.05$ ) (Tabla VI).

Mayores valores de lípidos se encontraron en la mezcla de microalgas compuesta por *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* con 20%; el menor porcentaje se obtuvo en *Rhodomonas* sp., con 12.8%. La proporción de lípidos en *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff *galbana* fue de 13% (Fig. 7). No se observaron diferencias significativas entre estos contenidos ( $P > 0.05$ ) (Tabla VI).

El contenido de carbohidratos en *Rhodomonas* sp. fué 6.0%, mientras que para *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff *galbana* el 4.1%. En la dieta constituida por *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* se cuantificó 4.7%. Las diferencias entre el contenido de carbohidratos en los tratamientos fueron significativas al 95% de confianza (Fig. 7). El tratamiento *Rhodomonas* sp. fue significativamente mas rico en carbohidratos que *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* y *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* ( $P=0.008$ ) (Tabla VI).

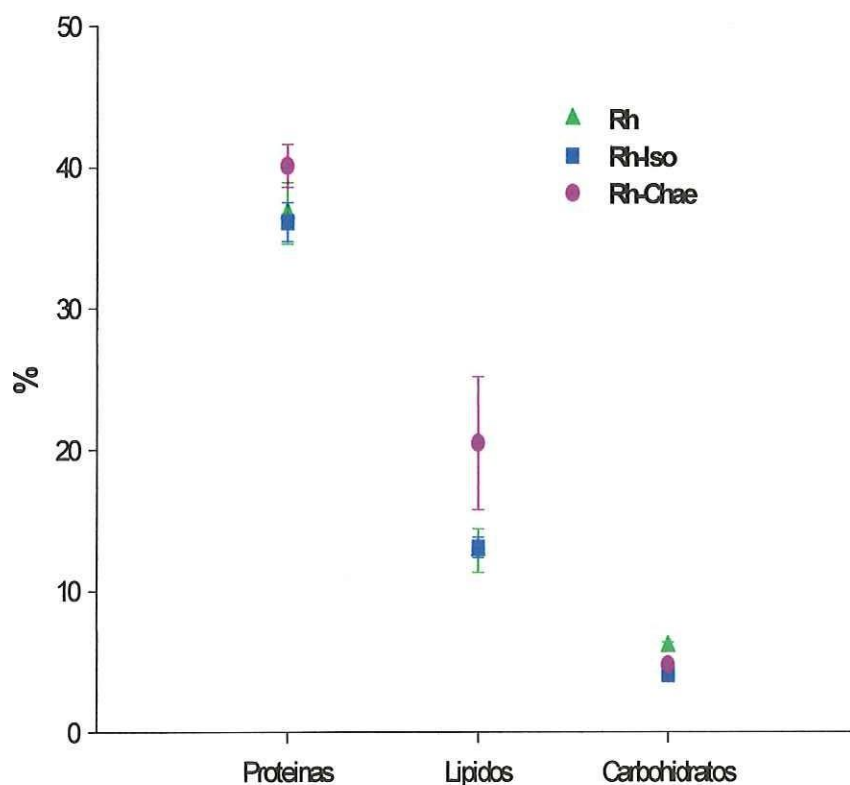


Fig. 7. Porcentaje promedio de proteínas, lípidos y carbohidratos en las dietas suministradas a larvas de *S. franciscanus*: **Rh**: *Rhodomonas* sp.; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*; **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*. Las barras verticales indican el error estándar.

## 4.2. Cultivos larvarios

### 4.2.1. Condiciones de los cultivos

La temperatura registrada durante el experimento varió en un intervalo de 13 °C a 17.6 °C en todas las unidades experimentales (Fig. 8); la concentración de oxígeno fue de 8 mg/l sin mostrar variaciones.

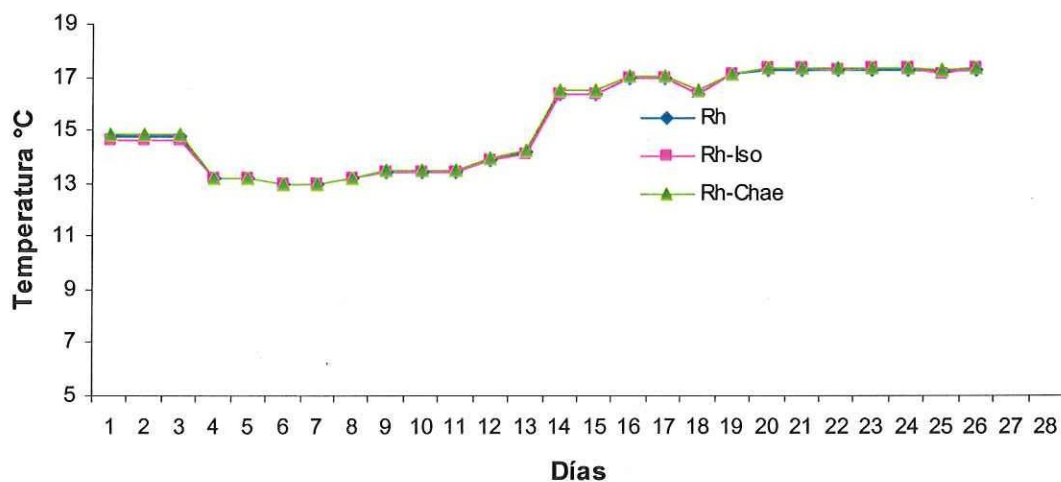


Fig. 8. Temperaturas registradas en las unidades experimentales, durante el cultivo de larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*. **Rh**: *Rhodomonas* sp; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*; **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*.

### 4.2.2. Contenido bioquímico durante el desarrollo larvario

En larvas de 2 días de edad el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos fué de 43.36%, 19.60% y 5.34% respectivamente (Fig. 9; Tabla III).

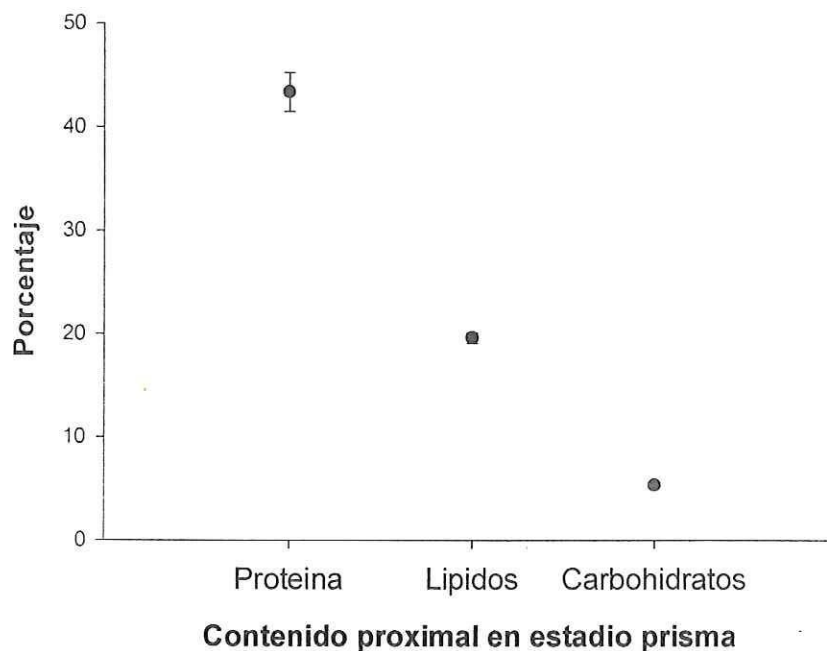


Fig. 9. Contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos en larvas de *Strongylocentrotus franciscanus* en estadio prisma. Las barras verticales muestran el error estándar.

#### 4.2.2.1. Valores proteicos por edad

Los valores de proteínas en larvas con 12 días de edad y alimentadas con *Rhodomonas* sp. fue de 47.98%; mientras que, en las larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* fue 48.25% y en aquellas alimentadas con *Rhodomanas* sp-*Chaetoceros muelleri* fue 58.26% (Fig. 10; Tabla III) sin mostrar diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) (Tabla VI).

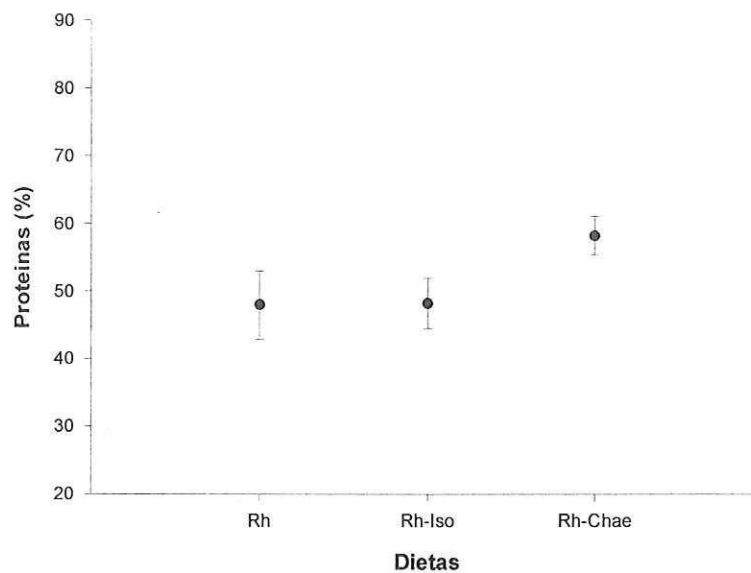


Fig. 10. Contenido de proteínas en larvas de 12 días de edad de *Strongylocentrotus franciscanus* alimentadas con **Rh**: *Rhodomonas* sp; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* y **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*. Las barras verticales muestran el error estándar. Valores establecidos en muestras de 400 larvas

En larvas con 22 días de edad y alimentadas con *Rhodomonas* sp., la cantidad de proteínas fue 15.98%; en larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* fue 20.2%, al igual que en las larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* con 20.2% (Fig. 11; Tabla III); no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) (Tabla VI).

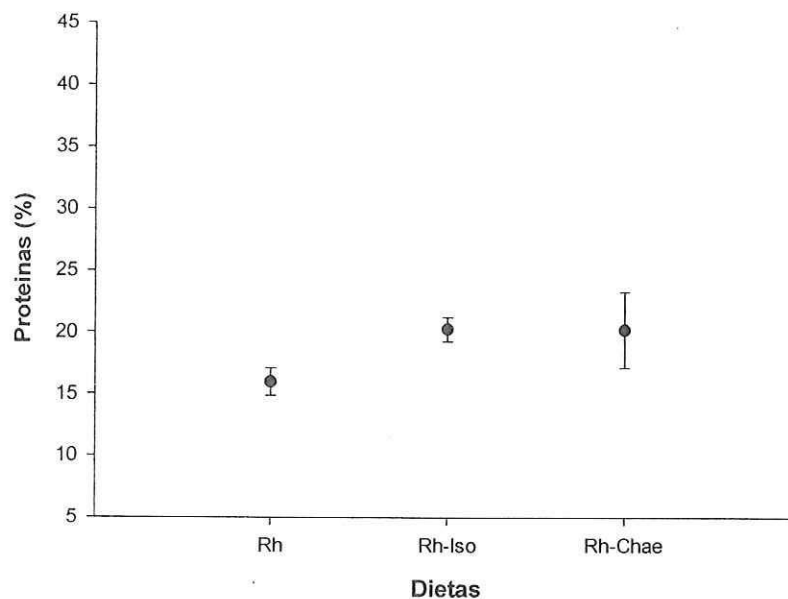


Fig. 11. Contenido de proteínas en larvas de 22 días de edad de *Strongylocentrotus franciscanus* alimentadas con **Rh**: *Rhodomonas* sp; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* y **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*. Las barras verticales muestran el error estándar.

#### 4.2.2.2. Contenido lipídico

La contenido de lípidos en larvas con 12 días de edad, alimentadas con *Rhodomonas* sp. fue 45.36%; mientras que, las larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* fue 38.4% y en las larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* fue 49.3% (Fig. 12; Tabla III). Los análisis mostraron diferencias significativas. El contenido de lípidos en *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* fue más elevado que en *Rhodomonas* sp. y *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* ( $P < 0.05$ ).

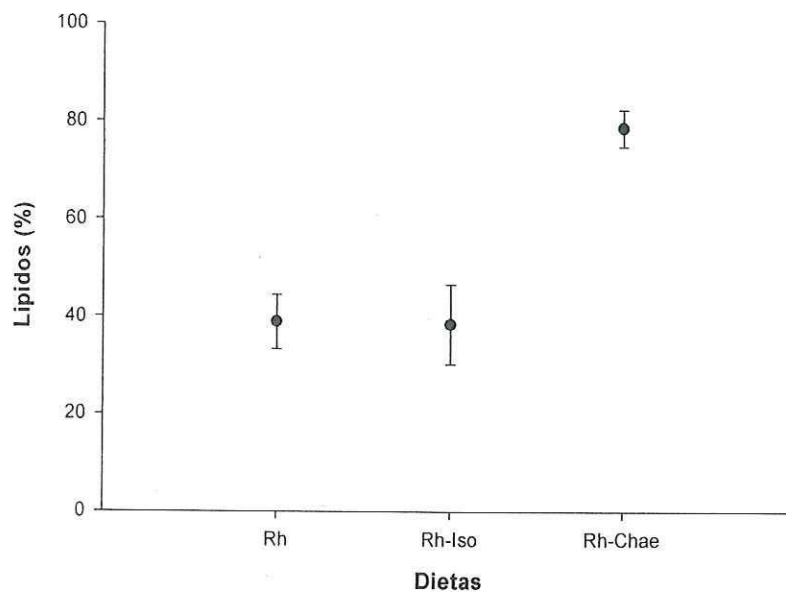


Fig. 12. Contenido de lípidos en larvas de 12 días de edad de *Strongylocentrotus franciscanus* alimentadas con **Rh**: *Rhodomonas* sp; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* y **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*. Las barras verticales muestran el error estándar.

En larvas con 22 días de edad alimentadas con *Rhodomonas* sp., el contenido de lípidos fue de 42.0%, mientras que, en las larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* fue 43.2% y en larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* la concentración de lípidos fue de 41.3% (Fig. 13; Tabla III). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ) (Tabla VI).

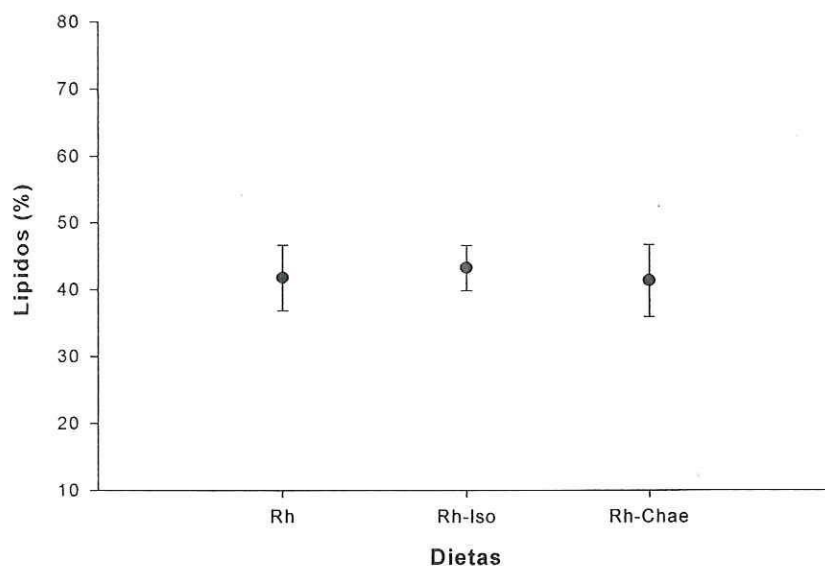


Fig. 13. Contenido de lípidos en larvas de 22 días de edad de *Strongylocentrotus franciscanus* alimentadas con **Rh**: *Rhodomonas* sp; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* y **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*. Las barras verticales muestran el error estándar.

#### 4.2.2.3. Contenido de carbohidratos

La cantidad de carbohidratos en larvas con 12 días de edad y alimentadas con *Rhodomonas* sp. fue 3.3%. En las larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* fue 4.5% y en larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* fue 2.8% (Fig. 14; Tabla III). No se detectaron diferencias entre estos tratamientos ( $P > 0.05$ ).

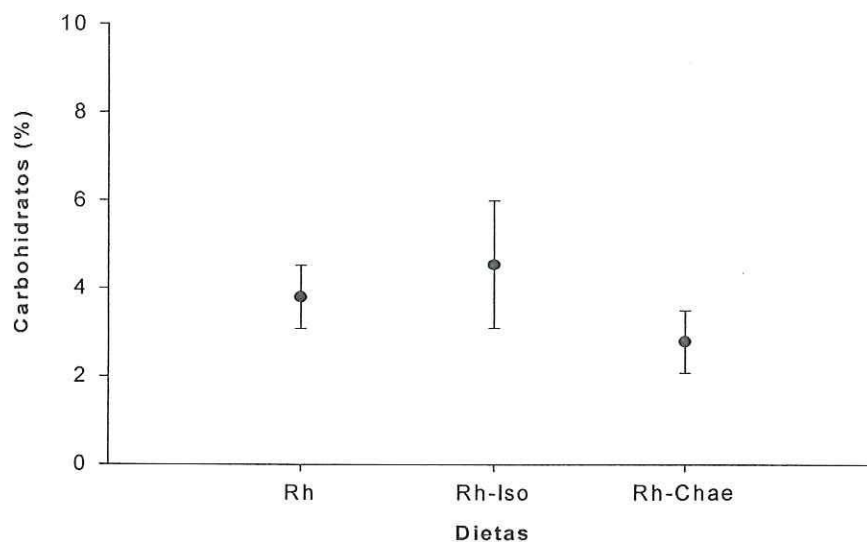


Fig. 14. Contenido de carbohidratos en larvas de 12 días de edad de *Strongylocentrotus franciscanus* alimentadas con **Rh**: *Rhodomonas* sp; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* y **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*. Las barras verticales muestran el error estándar.

En larvas con 22 días de edad y alimentadas con *Rhodomonas* sp. el contenido de carbohidratos fue 3.2%, en larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* fue 4.4%, mientras que en larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* fue 5.7% (Fig. 15; Tabla III). No hubo diferencias significativas entre tratamientos ( $P > 0.05$ ).

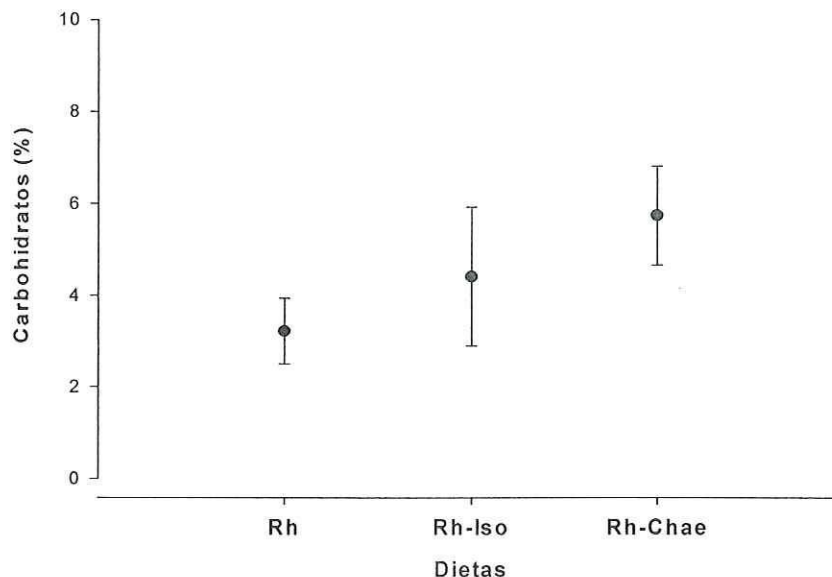


Fig. 15. Contenido de carbohidratos en larvas de 22 días de edad de *Strongylocentrotus franciscanus* alimentadas con **Rh**: *Rhodomonas* sp; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* y **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*. Las barras verticales muestran el error estándar.

### 4.3. Relació dieta-rendimiento larvario

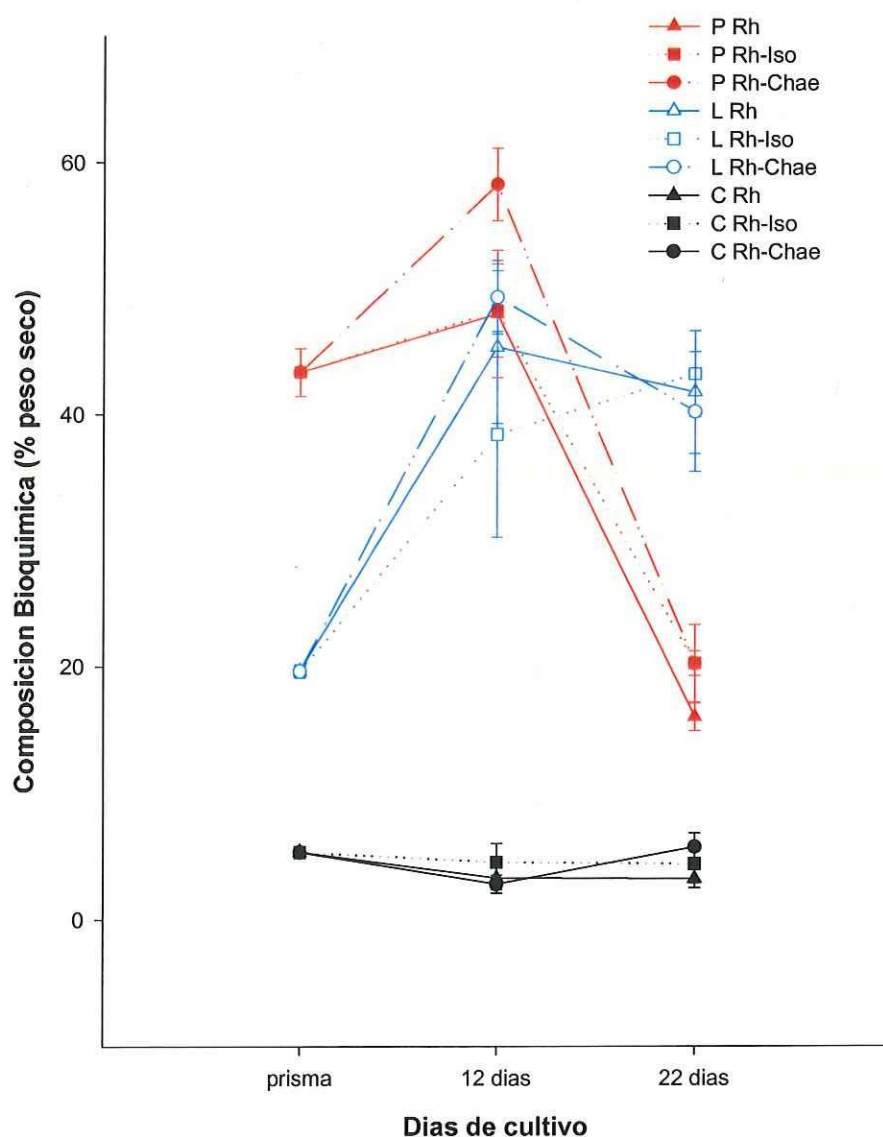
#### 4.3.1. Determinación bioquímica

Los organismos de 2 días de edad contenían 43% de proteína, la cual aumentó hasta el 58%, a la mitad del tiempo de desarrollo, en larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* y 48% en larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp y *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* en el día 12; posteriormente estos valores disminuyeron hasta el 15% en larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp y 20% con las otras dietas en el día 22 (Fig. 16).

El contenido de lípidos en larvas de tres días de edad fue 20%, y se incrementó hasta el 44% en el día 12 en larvas alimentadas con *Rhodomonas*

*sp-Chaetoceros muelleri*. Valores de 42 y 38% fueron obtenidos para larvas alimentadas con *Rhodomonas sp* y *Rhodomonas sp-Isochrysis aff. galbana* respectivamente. Para el día 22 se encontraron resultados similares (42%) para larvas alimentadas con las distintas mezclas (Fig. 16).

Con respecto a carbohidratos, se observó mínima variación en su contenido durante el desarrollo larval; la cual osciló entre 2.8 y 5.7% (Fig. 16).



### **4.3.2. Determinación de Aminoácidos**

Se identificaron 16 aminoácidos; asparagina, serina, glutamina, glicina, histidina, arginina, treonina, alanina, prolina, tirosina, valina, metionina, lisina, isoleucina, leucina y fenilalanina. Isoleucina presentó el mayor concentración, tanto en las dietas microalgales como en las larvas (Tabla IV y Figuras 18, 19, 20 y 21).

#### **4.3.1.1. Perfiles de aminoácidos en las dietas**

En el alimento compuesto por *Rhodomonas* sp. fueron cuantificados 22.9  $\mu\text{g/ml}$  de isoleucina, 7.9  $\mu\text{g/ml}$  de lisina y 7.5  $\mu\text{g/ml}$  de glutamina; el resto de los aminoácidos se agruparon en una concentración entre 0.4  $\mu\text{g/ml}$  y 7.1  $\mu\text{g/ml}$  a lo largo del experimento. Histidina (2.36  $\mu\text{g/ml}$ ), lisina (7.92  $\mu\text{g/ml}$ ), isoleucina (22.95  $\mu\text{g/ml}$ ) y fenilalanina (6.63  $\mu\text{g/ml}$ ) mostraron mayor concentración para este tratamiento, con respecto a los otros dos.

En el alimento compuesto por *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* isoleucina también se encontró en mayor proporción (19.89  $\mu\text{g/ml}$ ), seguido por glutamina y treonina, 7.54  $\mu\text{g/ml}$  y 6.77  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. El intervalo de los aminoácidos restantes varió entre 0.23  $\mu\text{g/ml}$  y 6.58  $\mu\text{g/ml}$ . Para este tratamiento, glicina (3.72  $\mu\text{g/ml}$ ), tirosina (2.77  $\mu\text{g/ml}$ ), valina (1.54  $\mu\text{g/ml}$ ) y leucina (2.31  $\mu\text{g/ml}$ ), mostraron mayor concentración, con respecto a los otros dos.

En la mezcla de *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* isoleucina presentó una concentración de 21.69 µg/ml, seguido por glutamina con un valor de 7.91 µg/ml y treonina con 7.24 µg/ml; la suma del resto de los aminoácidos fluctuó entre 0.45 µg/ml y 6.97 µg/ml.

Asparagina (6.97 µg/ml), serina (0.45 µg/ml), glutamina (7.91µg/ml), arginina (6.34 µg/ml), treonina (7.24 µg/ml), alanina (4.86 µg/ml), prolina (3.85 µg/ml) y metionina (0.76 µg/ml) mostraron la más elevada concentración con respecto a los otros dos tratamientos.

Tabla IV. Concentración de aminoácidos ( $\mu\text{m}/\text{ml}$ ) en las microalgas utilizadas como fuente de alimento y en las larvas alimentadas con cada tratamiento.

	Tratamientos			Larvas:	Larvas: 12 días			Larvas: 22 días		
	Rh	Rh-Iso	Rh-Chae	2 días	Rh	Rh-Iso	Rh-Chae	Rh	Rh-Iso	Rh-Chae
Asparagina	6.44	6.19	6.97	6.99	6.86	7.83	3.14	9.58	8.00	11.59
Serina	0.41	0.43	0.45	0.53	0.53	0.63	0.32	0.64	0.79	0.73
Glutamina	7.47	7.54	7.91	9.06	9.20	10.40	3.74	12.48	8.81	14.51
Glicina	3.50	3.72	3.68	3.33	9.87	5.45	4.61	7.37	4.35	6.61
Histidina	2.36	2.23	2.34	3.92	3.35		2.82	4.55		5.12
Arginina	5.18	5.32	6.34	6.46	6.18	8.87	3.49	8.29	8.21	9.55
Treonina	7.07	6.77	7.24	12.43	9.66	14.46	8.22	13.67	14.47	15.41
Alanina	4.73	4.01	4.86	10.04	2.02	10.43	0.61	14.95	2.16	16.09
Prolina	3.74	3.77	3.85	7.90	4.25	9.03	2.52	6.32		7.78
Tirosina	2.73	2.77	2.44	0.18		11.24	1.40	0.88	0.06	3.23
Valina	0.89	1.54	1.50	5.76	1.22	5.61	5.06	3.58	6.22	3.04
Metionina	0.64	0.23	0.76	4.38	3.57	5.12		4.20	4.92	4.04
Lisina	7.92	6.58	4.66	16.84	5.70	20.93		19.15	6.29	18.89
Isoleucina	22.95	19.89	21.69	59.80	40.08	40.08	40.08	40.08	40.08	40.08
Leusina	1.10	2.31	2.11	14.87	6.97	16.83	12.95	10.26	16.98	9.98
Fenilalanina	6.63	4.11	5.38	29.32	18.08	29.14	22.77	28.64	32.98	27.12
<b>Suma</b>	<b>83.74</b>	<b>77.39</b>	<b>82.17</b>	<b>191.80</b>	<b>127.54</b>	<b>196.05</b>	<b>111.72</b>	<b>184.63</b>	<b>154.32</b>	<b>193.78</b>

Rh: *Rhodomonas* sp., Rh-Iso: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*, Rh-Chae: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*

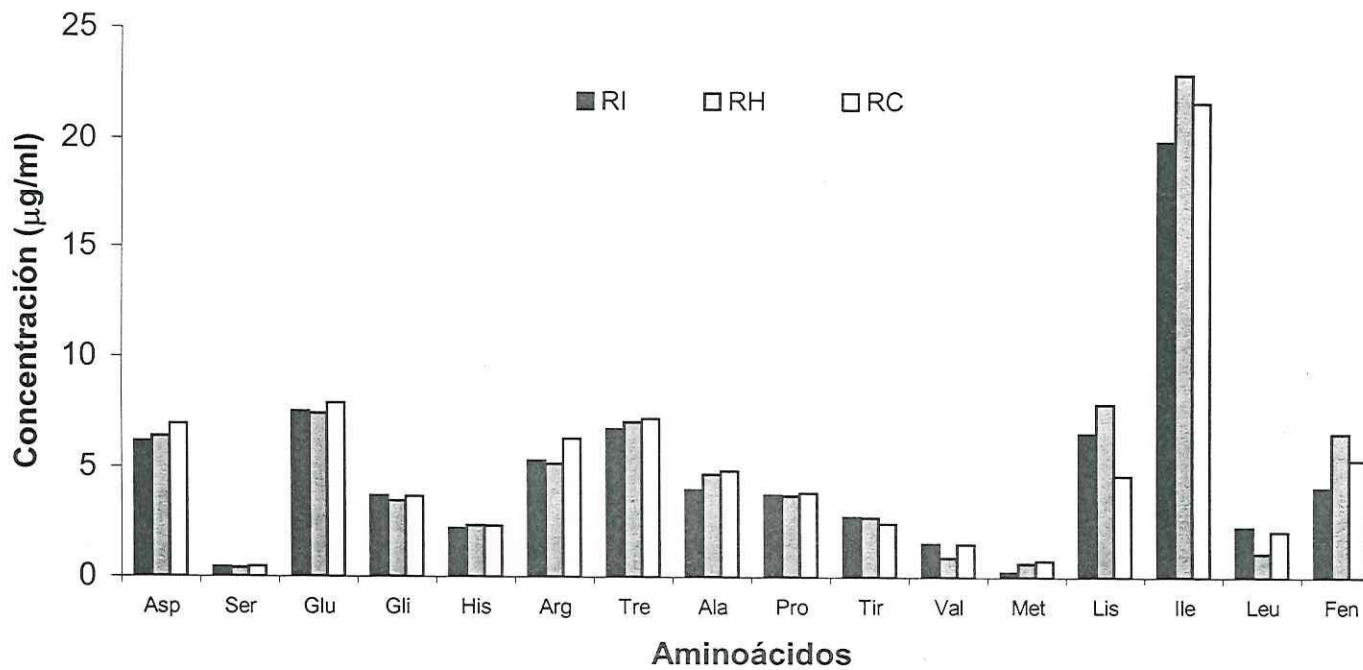


Fig. 17. Concentración de aminoácidos en el alimento utilizado en el cultivo de larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*. (RI: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*; RH: *Rhodomonas* sp., RC: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*).

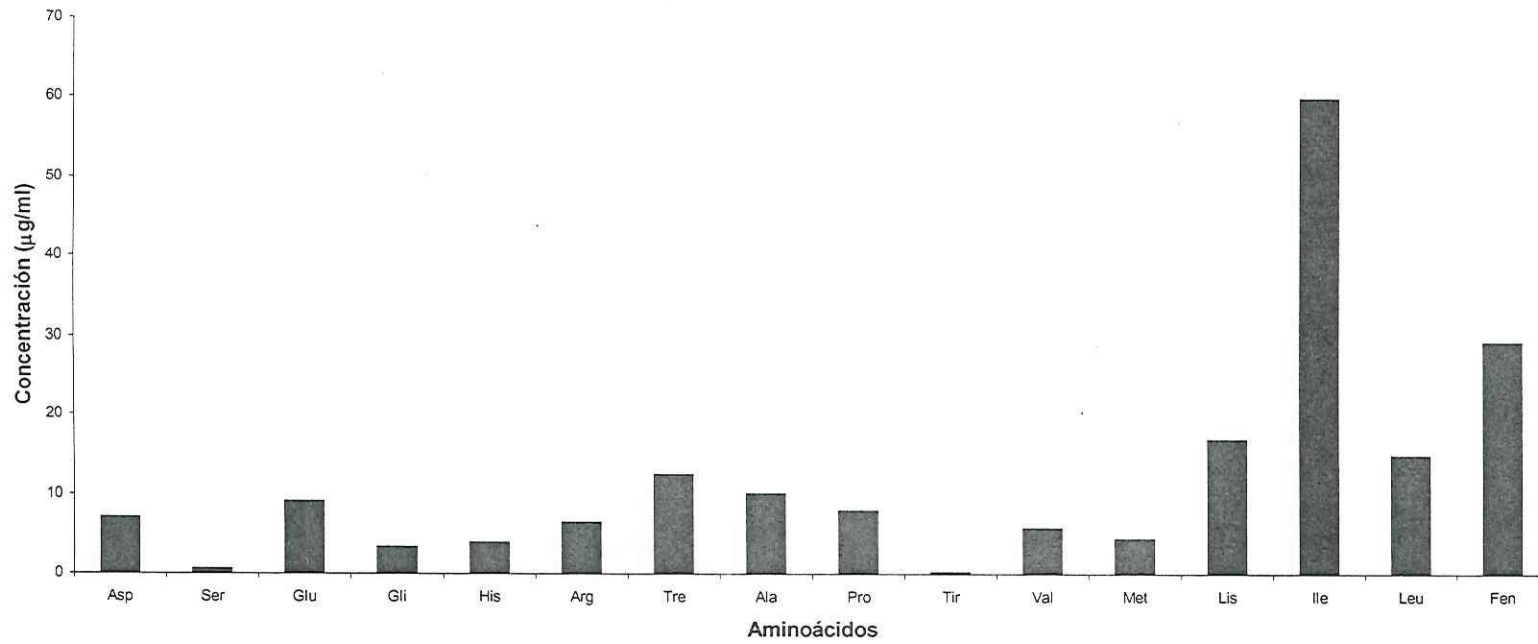


Fig. 18. Concentración de aminoácidos en larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*, en estadio prisma.

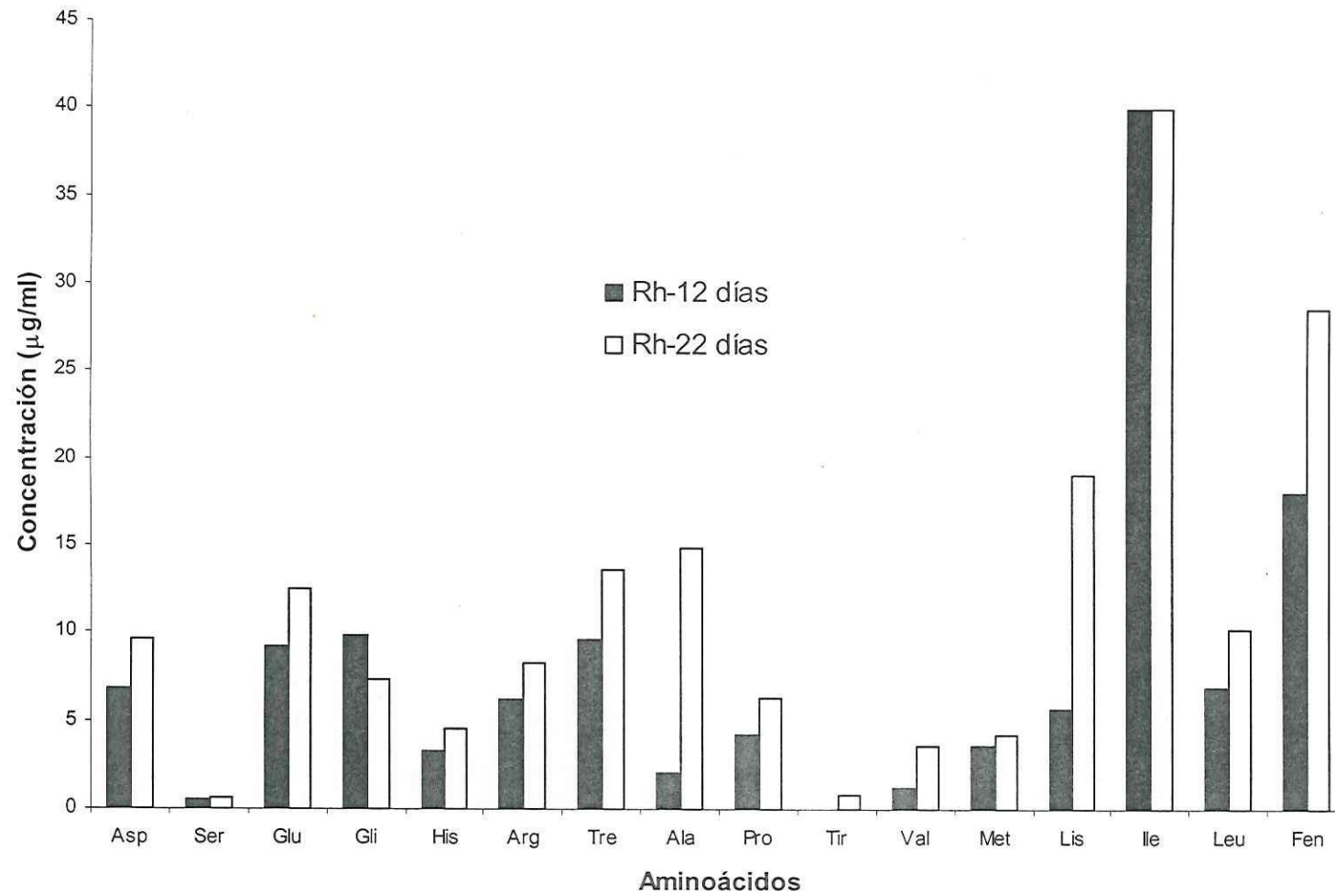


Fig. 19. Contenido de aminoácidos en larvas de erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) de 12 y 22 días de edad alimentadas con *Rhodomonas* sp.

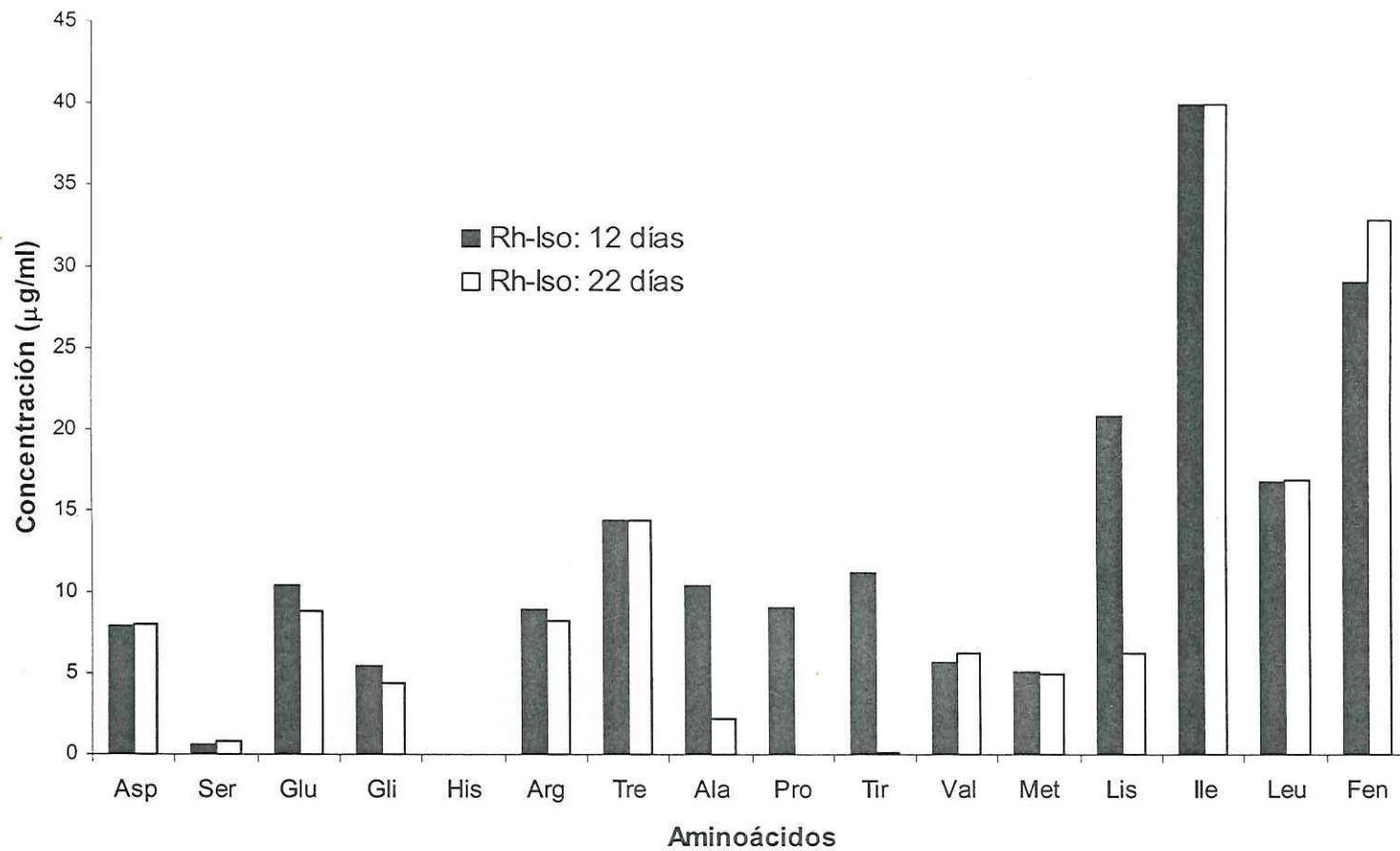


Fig. 20. Contenido de aminoácidos en larvas de erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) de 12 y 22 días de edad alimentadas con la dieta compuesta por *Rhodomonas sp-Isochrysis aff. galbana*.

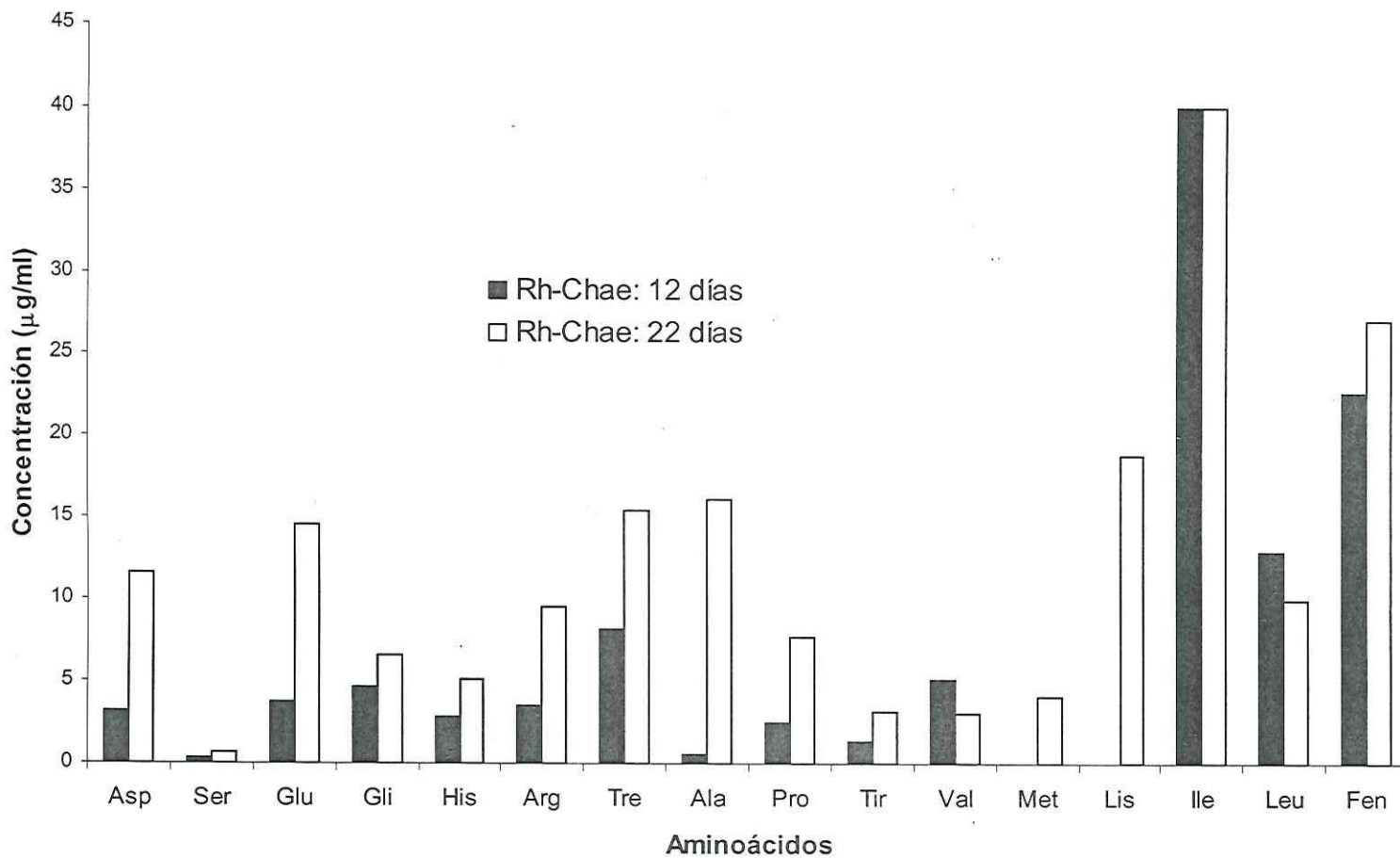


Fig. 21. Contenido de aminoácidos en larvas de erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) de 12 y 22 días de edad alimentadas con la dieta compuesta por *Rhodomonas sp.-Chaetoceros muelleri*.

#### 4.3.1.2. Perfiles de aminoácidos en larvas

En las larvas en estadio prisma, isoleucina sobresale con una proporción de 59.8  $\mu\text{g/ml}$ , seguido por fenilalanina con 29.3  $\mu\text{g/ml}$  y leucina con 14.8  $\mu\text{g/ml}$ . El resto de los aminoácidos varió entre 0.17  $\mu\text{g/ml}$  y 12.42  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 18, Tabla IV)

A los 12 días de edad las larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp. isoleucina predomina con una concentración de 40.08  $\mu\text{g/ml}$ , seguido por fenilalanina (18.08  $\mu\text{g/ml}$ ) y leucina (6.96  $\mu\text{g/ml}$ ). Glicina (9.86  $\mu\text{g/ml}$ ) e histidina (3.35  $\mu\text{g/ml}$ ) mostraron mayor concentración con respecto al primer muestreo de los otros dos tratamientos. No se encontró tirosina.

En las larvas de 22 días de edad, alimentadas con *Rhodomonas* sp, isoleucina dominó con una concentración 40.08  $\mu\text{g/ml}$ ; seguido por fenilalanina (28.6  $\mu\text{g/ml}$ ) y lisina (19.1  $\mu\text{g/ml}$ ). Para este tratamiento, lisina (19.15  $\mu\text{g/ml}$ ) y glicina (7.4  $\mu\text{g/ml}$ ) mostraron una concentración más elevada con respecto al segundo muestreo de los otros dos tratamientos. En este perfil se encontró tirosina.

En las larvas de 12 días de edad, alimentadas con *Rhodomonas* sp.-*Isochrysis* aff. *galbana*, isoleucina mostró una concentración de 40.1  $\mu\text{g/ml}$ , seguido por fenilalanina con 29.1  $\mu\text{g/ml}$  y lisina con 20.9  $\mu\text{g/ml}$ . Se encontró mayor concentración en 13 de los 16 aminoácidos reportados, con respecto al primer muestreo de los otros dos tratamientos. No se identificó histidina.

En las larvas de 22 días de edad, alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*, isoleucina mostró una concentración de 40.1 µg/ml. Serina (0.79 µg/ml), valina (6.22 µg/ml), metionina (4.92 µg/ml), leucina (16.98 µg/ml) y fenilalanina (32.98 µg/ml) mostraron mayor concentración, con respecto al tercer muestreo de los otros dos tratamientos. A esta edad, tampoco se identificó histidina.

Las larvas de 12 días de edad, alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* mostraron una concentración de 40.1 µg/ml de isoleucina, seguido por fenilalanina con 22.7µg/ml y leusina con 12.9 µg/ml. No domina en concentración ninguno de los aminoácidos reportados durante el primer muestreo. Metionina y lisina no fueron identificadas.

En las larvas de 22 días de edad, alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* siguió dominando la concentración de isoleucina con 40.1 µg/ml, seguido por fenilalanina con 27.1 µg/ml y lisina con 18.9 µg/ml. Se registró una mayor concentración en asparagina, glutamina, histidina, arginina, treonina, alanina, prolina, y tirosina, con respecto al segundo muestreo de larvas alimentadas con los otros dos tratamientos. A esta edad se identificaron los 16 aminoácidos reportados.

#### 4.3.2. Crecimiento larval

Las larvas en estadio equinopluteus 4 brazos alimentadas con *Rhodomonas* sp. presentaron tamaño promedio de 250  $\mu\text{m}$  de largo y 220  $\mu\text{m}$  de ancho. A los 12 días estas se incrementaron hasta 335  $\mu\text{m}$  de largo y 316  $\mu\text{m}$  de ancho. Finalmente, a los 22 días las larvas alcanzaron en promedio 500  $\mu\text{m}$  de largo y 450  $\mu\text{m}$  de ancho. Las larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* alcanzaron, a los 12 días de edad, 329  $\mu\text{m}$  y 309  $\mu\text{m}$  de largo y ancho respectivamente; a los 22 se registró en promedio 524  $\mu\text{m}$  de largo y 475  $\mu\text{m}$  de ancho. Las larvas de 12 días de edad, alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*, en promedio midieron 332  $\mu\text{m}$  de largo y 323  $\mu\text{m}$  de ancho; a los 22 días alcanzaron 516  $\mu\text{m}$  de largo y 481  $\mu\text{m}$  de ancho (Tabla V). De acuerdo con el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tamaños y tratamientos.

Tabla V. Biometrías promedio ( $\mu\text{m}$ ) de larvas alimentadas con tres dietas microalgales a los 2, 12 y 22 días de edad. (**Rh**: *Rhodomonas* sp.; **Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* y **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*).

Edad (Días)	Tratamientos					
	Rh		Rh-Iso		Rh-Chae	
	Largo $\mu\text{m}$	Ancho $\mu\text{m}$	Largo $\mu\text{m}$	Ancho $\mu\text{m}$	Largo $\mu\text{m}$	Ancho $\mu\text{m}$
<b>2</b>	250 ( $\pm 30$ )	220 ( $\pm 20$ )	250 ( $\pm 30$ )	220 ( $\pm 20$ )	250 ( $\pm 30$ )	220 ( $\pm 20$ )
<b>12</b>	335 ( $\pm 15$ )	316 ( $\pm 28$ )	329 ( $\pm 21$ )	309 ( $\pm 38$ )	332 ( $\pm 18$ )	323 ( $\pm 32$ )
<b>22</b>	502 ( $\pm 64$ )	448 ( $\pm 46$ )	524 ( $\pm 17$ )	475 ( $\pm 62$ )	516 ( $\pm 39$ )	481 ( $\pm 74$ )

#### 4.3.3. *Sobrevivencia larval*

Al inicio del experimento cada unidad experimental contenía 114,000 larvas; al día 12 el valor de sobrevivencia promedio para las larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp. fue 74.8%, para las larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* fue 62.6% y para las alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* se obtuvo un valor de 91.7%. Para el día 22 se registró un valor promedio de 53.4%, en larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp., en las larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* fue 45.6% y para las larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* fue 77.8%. Al día 26, que marca el final del experimento, la mayor sobrevivencia larval fue 55% y se obtuvo con el tratamiento compuesto por *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*; la más baja de 45% se presentó en las larvas alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*; mientras que, con el tratamiento monoalgal de *Rhodomonas* sp sobrevivieron el 50% de las larvas. Esta tendencia se mantuvo a lo largo del experimento (Fig. 19) y no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ) (Tabla VI).

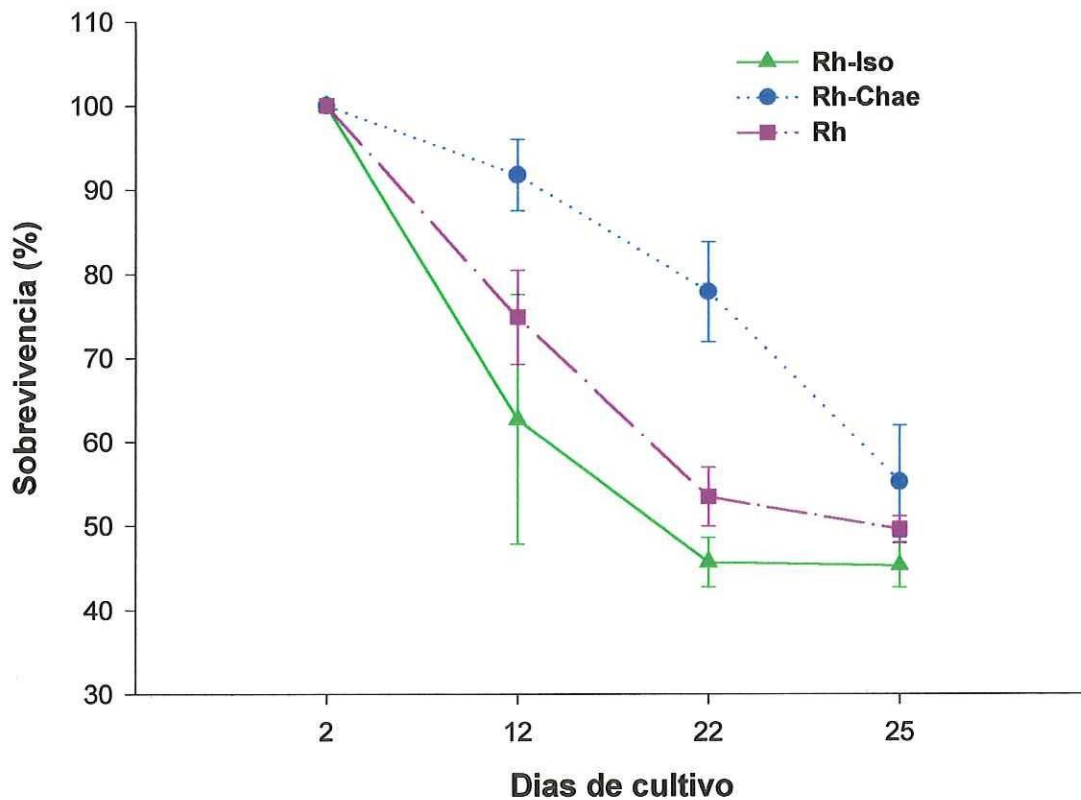


Fig. 22. Sobrevivencia de larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*, alimentado con tres dietas microalgales (**Rh-Iso**: *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana*; **Rh-Chae**: *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*; **Rh**: *Rhodomonas* sp). Las barras verticales indican el error estándar.

Tabla VI. Resultados de los análisis estadísticos. (Pruebas de No paramétricas de Kruskal-Waslis y comparaciones múltiples con el método de Dunn's).

	H	p		
Sobrevivencia	1.683	0.480		
Tratamientos				
Proteínas	2.554	0.297		
Lípidos	2.854	0.240		
Carbohidratos	9.579	0.008		
<b>*Comparación múltiple de Dunn's</b>	<b>Comparación</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Q</b>	<b>P&lt;0.05</b>
RI vs RH	57	3	3.082	
RC vs RH	33	2	2.642	
Larvas (Primer muestreo)				
Proteínas	3.898	0.142		
Lípidos	12.485	0.002		
<b>*Comparación múltiple de Dunn's</b>	<b>Comparación</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Q</b>	<b>P&lt;0.05</b>
	RC vs RI	11.443	3.151	Si
	RC vs RH	9.143	2.925	Si
Carbohidratos	0.753	0.686		
Larvas (Segundo muestreo)				
Proteínas	4.941	0.085		
Lípidos	0.0797	0.961		
Carbohidratos	2.950	0.229		

## **DISCUSION**

### ***Cultivos de microalgas***

La variación en la densidad de las microalgas en nuestro estudio puede ser explicada, principalmente, por las características específicas de cada especie, en función de su capacidad para dividirse, ya que se procuró cosechar cada 24 horas ( $\pm 2$  hrs.) y el volumen extraído fue siempre del 25% de cada cultivo. Las condiciones de cultivo (luz, temperatura, nutrientes, cosecha) fueron las mismas para cada especie.

### ***Contenido Bioquímico de las dietas***

En este estudio *Rhodomonas* sp. fue la especie dominante en los tres tratamientos, por lo tanto fue la que aportó más y tuvo mayor influencia en los contenidos bioquímicos en las dietas; mientras que *Isochrysis* aff. *galbana* y *Chaetoceros muelleri* solo conformaron el 30% de las dietas. Es muy probable que el no haber encontrado diferencias estadísticas, entre dietas, con respecto a la concentración de proteínas y lípidos se debiera principalmente a la mayor influencia de *Rhodomonas* sp. El aporte bioquímico de las microlagas *Isochrysis* aff. *galbana* y *Chaetoceros muelleri* en las dietas, no fue suficiente para afectar de una manera significativa las concentraciones encontradas en las larvas durante su desarrollo. Además, factores tales como: el número de repeticiones, las características propias de cada técnica para la determinación bioquímica, así como la variabilidad natural de cada especie, pudo haber influido en los resultados obtenidos de manera que se tuviera una dispersión amplia de las estimaciones y no fuera posible determinar diferencias estadísticas.

De acuerdo con lo reportado en la literatura, las microalgas varían en su composición bioquímica, tanto de una especie a otra, como durante el tiempo en que se desarrolla el cultivo, aún cuando crecen en condiciones estándar (Volkman *et al.* 1989, Brown *et al.* 1997 y Renaud *et al.* 1999).

En general, las proteínas fueron el mayor constituyente en las mezclas de microalgas, seguido por los lípidos y en concentración más baja y constante los carbohidratos. Esto tiene una importancia fundamental ya que, la calidad de sus proteínas y lípidos contribuyen directamente como reservas energéticas en los invertebrados marinos con hábitos alimenticios fitoplanctónicos.

### *Proteína*

Los altos valores de proteínas encontrados correspondieron en todos los casos con las dietas conformadas principalmente por *Rhodomonas*, la cual a su vez fue la microalga con un mayor contenido de proteínas. Estos resultados nos sugieren una fuerte influencia del contenido de la dieta en el contenido de las larvas. Fonseca-Madriral (2001) reportó la concentración de proteína en diferentes mezclas de microalgas, incluyendo las utilizadas en este estudio. Las proporciones también fueron de 70-30%, pero, se estimaron en función del peso seco, lo cual generó una mayor proporción en cuanto al número de células de *Isochrysis aff. galbana* y *Chaetoceros muelleri* en las mezclas. A este respecto, el autor obtiene 42.5% en una mezcla de *Rhodomonas sp-Isochrysis aff. galbana*, 42.0% para la mezcla de *Rhodomonas sp-Chaetoceros muelleri* y 45% en *Rhodomonas sp.* En este estudio se obtuvo 36.09%, 40.08% y 36.72%

respectivamente; probablemente esta ligera disminución puede ser explicada por las proporciones menores en el número de células de *Isochrysis* aff. *galbana* y *Chaetoceros muelleri* en cada mezcla.

Diversos estudios muestran variaciones importantes en la concentración de estas sustancias de reserva en las especies de microalgas mayormente utilizadas con fines acuícolas. Ferreiro y colaboradores (1990) registraron 4.1% de proteína en *Rhodomonas* sp; por otro lado, en *Rhodomonas salina* McCausland, (1999) cuantificó hasta un 59%. En *Isochrysis* las concentraciones de proteína fueron estimadas entre 23.7% (Cerón, 2000) y 39.9% (Fernández-Reiriz, et al., 1989). En *Chaetoceros* variaron entre 2.6% (Fernandez-Reiriz, et al., 1989) y 47% (MacCausland, 1999).

### **Lípidos**

En este estudio el valor mas elevado en el contenido de lípidos fue estimado en la dieta compuesta por *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri*, lo cual coincide con lo reportado por Fonseca-Madrigal (2001), quien señala que la concentración de lípidos en las mezclas de *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* fue del 20%; para *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* de 18.8% y para *Rhodomonas* sp. la proporción fue de 17.7%. Esta misma relación fue establecida de manera más clara por ese autor, el cual evaluó más dietas, incluyendo una dieta monoalgal con *Chaetoceros muelleri* para larvas de erizo de *S. purpuratus*.

La variabilidad del contenido bioquímico en las microalgas y en particular de los lípidos es evidente al comparar los diferentes estudios realizados y referentes a las microalgas utilizadas en este estudio. Se observa al igual que en las proteínas que la variación es superior al 100%. En *Rhodomonas* sp se han registrado proporciones entre 11.9% (Ferreiro *et al.*, 1990) y 27.8% (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989); de acuerdo con algunos autores, las estimaciones en *Isochrysis* sp. fueron entre 11.6% (Cerón, 2000) y 28.6% en *Isochrysis galbana* (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989); finalmente, en *Chaetoceros calcitrans* se reporta una concentración de 11.7% (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989) y de 22.6% en *Chaetoceros muelleri*. Esta fluctuación en su contenido, afecta al valor nutritivo de las microalgas, ya que está directamente relacionado con su composición orgánica, principalmente en lípidos y ácidos grasos (Pedrotti y Fenaux, 1993; Brown *et al.*, 1997).

### ***Carbohidratos***

En este estudio, la concentración de carbohidratos fue relativamente constante durante el desarrollo larval, los valores estimados coinciden con los reportados en la literatura; estos se encuentran en el intervalo entre 5 y 23%. En *Rhodomonas* sp la estimación de carbohidratos va desde 1.42% (Ferreiro *et al.*, 1990) hasta 18.30% (Lafarga, 2000). En *Isochrysis* sp es de 10.0% (Cerón, 2000) a 30.0% (McCausland, 1999). En *Chaetoceros* sp. las variaciones se

encuentran entre 2.42 (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989) y 23% (McCausland, 1999).

En estudios previos se ha comparado la composición bioquímica de las microalgas (Brown *et al.*, 1989; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Volkman *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1997; McCausland *et al.*, 1999) y se ha reportado que los carbohidratos se encuentran en menor proporción (5-23%) en función de la concentración de proteínas (6-34%) y lípidos (7-23%) del total del peso seco de los invertebrados marinos (Brown *et al.*, 1997).

La composición de azúcares en las microalgas es variable y puede, en algunos casos, afectar el valor nutricional (Brown *et al.*, 1997).

### ***Cultivo de larvas***

El cultivo de larvas se llevó a cabo en condiciones favorables de temperatura, lo cual pudo tener un efecto positivo en el menor tiempo de desarrollo comparado con lo reportado en la literatura ya que las larvas iniciaron su proceso de metamorfosis a los 22 días. De acuerdo a lo reportado por Strathmann (1978) el tiempo de desarrollo para esta especie demanda hasta los 131 días a una temperatura entre 7 y 13°C, mientras que, Martínez-López (1994) señala que la misma fase se alcanza a los 23 y 28 días con una temperatura entre 16 y 19°C. Zimmerman y Pechenik (1991) señalan que el tiempo de desarrollo larvario se acorta con el aumento de la temperatura; aunque, en un estudio piloto se intentó cultivar larvas de erizo rojo bajo condiciones de temperatura por arriba de los 18°C, registrando mortalidades masivas a los tres

días de cultivo; lo cual indica que las condiciones óptimas de temperatura para el cultivo de larvas de erizo rojo se encuentra entre 13 y 17°C.

La concentración de oxígeno encontrada coincidió con lo reportado por Fonseca-Madrigal, (2001) y Preciado, (2000). Estudios previos con los mismos sistemas de cultivo y concentración larval se han registrado concentraciones de amonio entre 0.02 y 0.05 mg/L<sup>-1</sup>, en el presente estudio no se determinó la concentración de amonio. Preciado (2000) reportó que no existen variaciones importantes de salinidad y de pH, debido a los continuos recambios de agua.

El método de aireación utilizado en las unidades de cultivo, mantiene a las larvas en suspensión y con un suministro de oxígeno constante. Ninguna anomalía en el crecimiento fue observada durante el desarrollo larval. Sin embargo, se constató, que la ausencia de aireación provoca el asentamiento precipitado de las larvas en el fondo de los contenedores, impidiendo la circulación del oxígeno a proximidad y provocando un alto porcentaje de mortalidad. Strathmann, (1971) señala que un sistema de aireación inadecuado puede provocar deformaciones en las larvas.

### ***Reservas Bioquímicas durante el desarrollo larvario***

En las larvas, la concentración de proteínas se incrementó desde el inicio hasta la mitad de su desarrollo, lo cual puede deberse a que las proteínas juegan un papel relevante, en el crecimiento, y particularmente, durante la primera etapa de desarrollo, ya que las actividades fisiológicas del organismo

están encaminadas básicamente al crecimiento y formación de tejido. La disminución en el crecimiento, durante sus últimos estadios de desarrollo larval esta asociado a valores proteicos también más bajos, y quizás relacionados con un cambio metabólico que indica el almacenaje de reservas energéticas para iniciar el proceso de metamorfosis.

La cantidad más elevada de proteínas coincide con el valor más alto de sobrevivencia larval, lo cual sugiere una estrecha relación entre estos dos parámetros para las larvas de esta especie. Particularmente, para erizo rojo no se ha reportado la composición bioquímica durante el desarrollo larval; pero para larvas de erizo morado Fonseca-Madrugal (2001) encontró que, con una dieta alta en proteína se obtiene mayor crecimiento y sobrevivencia larval; este mismo autor propone que el contenido bioquímico (principalmente proteínas) encontrado en larvas de erizo, puede servir como un indicativo de la calidad de las mismas.

Con respecto a los lípidos, la concentración inicial aumenta hasta en un 26% al día 12 y se observa una relación directa entre los valores encontrados de estos y la sobrevivencia; posteriormente, se registra una ligera disminución en estos valores del orden del 6% al día 22, sin embargo son proporciones suficientes que favorecerán el desarrollo durante la metamorfosis el cual es un proceso que puede durar hasta más de 15 o 20 días (Miller y Emler, 1999, y Preciado, 2000), haciendo uso de sus reservas energéticas (principalmente lípidos). En comparación con otros desarrollos larvales de invertebrados (Strathmann, 1987) el periodo de metamorfosis es muy prolongado, lo cual

significa que el éxito de las larvas para alcanzar el estadio juvenil dependerá de su capacidad para almacenar energía durante la etapa larval planctónica. Los lípidos son importantes reservas de energía durante el desarrollo larval para una gran variedad de invertebrados marinos, en particular en los erizos de mar juegan igualmente un papel relevante durante el desarrollo larval (Fonseca-Madrigal, 2001) en los bivalvos, se reporta que los lípidos son especialmente necesarios durante los estadios de inanición y durante los periodos donde la actividad alimenticia se reduce durante el desarrollo embrionario y metamorfosis (Millar y Scott, 1967 y Gallager y Mann, 1986).

Con respecto a los carbohidratos, no se observa una relación entre estos y la sobrevivencia; sin embargo, al final del desarrollo larval el valor más elevado coincide con el valor más alto de sobrevivencia. Los carbohidratos aunque representan menos del 5% del contenido total orgánico no son menos importantes funcionalmente ya que de este porcentaje en el caso de moluscos, depende la etapa inicial de segmentación luego de la fecundación (García-Ezquivel, 2001, Valdez-Ramírez *et. al.*, 2002).

### ***Sobrevivencia larval***

Los valores de sobrevivencia obtenidos y la variabilidad en las repeticiones no permitieron obtener diferencias entre los tres tratamientos experimentales. Sin embargo los datos muestran que las larvas alimentadas con *Rhodomonas sp-Chaetoceros muelleri* presentaron el contenido más elevado de

proteínas y carbohidratos al final del experimento; estando asociado con el valor más grande en la sobrevivencia larval. Mientras que los organismos alimentados con *Rhodomonas* sp-*Isochrysis* aff. *galbana* presentaron el valor más elevado en la concentración de lípidos, pero el más bajo en la sobrevivencia.

La dieta monoalgal *Rhodomonas* sp. coincidió con la mas alta sobrevivencia y ha sido recomendada ampliamente como alimento para erizo en varios estudios, (Hinegardner, 1969; Cameron y Hinegardner, 1974; Martínez-López, 1994 y Emllet, 2000. Sin embargo, las dietas monoalgales pueden ser deficientes en uno o más de los componentes esenciales; por lo tanto, una mezcla algal se considera como una mejor opción para proveer un balance nutricional adecuado (Brown *et al.*, 1997).

La microalga *Isochrysis* aff. *galbana*, parece no proveer los requerimientos nutricionales que demanda la larva de erizo, ya que mezclada con *Rhodomonas* sp. se obtuvo el valor más bajo de sobrevivencia. En la literatura señalan que el valor nutricional de *Isochrysis galbana* es bajo si se usa como alimento único para larvas equinopluteus de *Loxechinus albus*, *Paracentrotus lividus* y *Arbacia lixula* (Bustos *et al.*, 1991; Pedrotti y Fenaeux, 1993); no obstante, esta microalga presenta un contenido rico de ácidos grasos y aminoácidos que la vuelven recomendable como alimento complementario en acuicultura (Hinegardner, 1969; Cary, 1981; González *et al.*, 1987; Whyte, 1987; Volkman *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1998).

Con la mezcla de *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* se obtuvo el valor más elevado de sobrevivencia, lo cual, nos permite inferir que la microalga

*Chaetoceros muelleri* como dieta complementaria cubre satisfactoriamente parte de los requerimientos nutricionales durante el desarrollo larval del erizo rojo; ya que, en erizo morado (*S. purpuratus*) se ha probado como una dieta monoalgal sin obtener resultados positivos (Fonseca-Madrigal, 2001). Sin embargo, la microalga *Chaetoceros* sp. ha sido considerada un alimento adecuado en ostras, ya que se ha establecido que promueve su crecimiento (Brown *et al.*, 1997).

En este estudio se calcularon sobrevivencias larvales entre 45 y 55%; en la literatura, se reportan sobrevivencias de 47 y 39% para *S. franciscanus* (Salas-Garza y Parés-Sierra, 2000), 23.7% para *S. purpuratus* (Fonseca-Madrigal, 2001), 94% para *Loxechinus albus* (González *et al.*, 1987) y de 95% para *Paracentrotus lividus* (Pedrotti y Lemée, 1999). Estas diferencias, podrían explicarse por la calidad y cantidad de las raciones alimenticias, no obstante, es importante considerar los métodos de cultivo; variables tales como la temperatura, la densidad, el volumen, la calidad de agua y en particular el manejo, pueden provocar bajo rendimiento en la sobrevivencia.

En este estudio, no se encontraron diferencias morfológicas durante el desarrollo larval entre tratamientos. Esto puede deberse a la gran heterogeneidad de tallas durante el desarrollo larval, lo cual, de acuerdo con Nocillato *et al.* (2000), puede observarse aún cuando se trate de organismos que provienen de un mismo desove. Esencialmente, los parámetros registrados que describen la morfología larval en este estudio, son criterios establecidos para evaluar la influencia de una ración o tipo de dieta sobre el desarrollo de la larva (Maeve *et al.*, 2000).

### ***Determinación de los Aminoácidos***

Tanto en las microalgas como en las larvas de erizo se identificaron 16 aminoácidos; entre los cuales se encuentran los 10 aminoácidos considerados esenciales para los animales marinos cultivados: treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, lisina, histidina, arginina y triptofano (Harrison, 1975; Kanazawa y Teshima, 1981; Cowey y Tacon, 1983).

Aunque el tipo de aminoácidos encontrados fue el mismo, la concentración fue variable de un tratamiento a otro. En la literatura se ha reportado que, en 16 especies de microalgas utilizadas comúnmente en acuicultura, existen ciertas similitudes en la composición de aminoácidos; esto puede sugerir que la especificidad de las proteínas puede ser común a las diferentes especies de microalgas (Brown, 1991). Poco se conoce sobre la influencia específica de los aminoácidos en la alimentación de los invertebrados marinos, no obstante, se sabe de su contribución al valor nutricional de las microalgas (Brown, 1991). La composición de estos en huevos o tejido puede ser usado para predecir los requerimientos nutricionales de los organismos (Das *et al.*, 1996), pues se sabe que el elemento estructural principal de una dieta es la proteína y el valor biológico de la dieta proteica es la composición de aminoácidos esenciales (Van der Meer y Verdegem 1996).

Durante el desarrollo larval se identificaron ligeras variaciones en la composición de aminoácidos, probablemente estas variaciones pueden ser explicadas por las dietas utilizadas como alimento. En las larvas de 12 días de edad, alimentadas con *Rhodomonas sp-Isochrysis aff. galbana*, se encontró que

dominaban en concentración 13 de los 16 aminoácidos reportados, mostrando al final, el valor más bajo de sobrevivencia larval. En las larvas de 22 días de edad, alimentadas con *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* ocho de los aminoácidos encontrados son más abundantes que en las larvas alimentadas con los otros dos tratamientos; aún cuando a los 12 días de edad no dominó en concentración ninguno de los aminoácidos reportados.

Finalmente, con base en los resultados obtenidos, podemos inferir que la mezcla *Rhodomonas* sp-*Chaetoceros muelleri* provee un mejor balance nutricional durante el desarrollo larval del erizo rojo *S. franciscanus*.

## 6. CONCLUSIONES

- La mezcla de microalgas compuesta por *Rhodomonas* sp. y *Chaetoceros muelleri* en una proporción 70%-30% generan tasas de sobrevivencia larval por arriba del 50%.
- Un mayor suministro de proteínas durante la primera mitad del desarrollo larval puede asegurar los requerimientos energéticos crecer y formar tejido.
- Un aumento de lípidos durante la segunda mitad del desarrollo larval puede generar un mayor y mejor almacenamiento de energía para resistir el proceso de inanición durante la metamorfosis.
- La mayor sobrevivencia está relacionada con la similitud en los perfiles de aminoácidos de la dieta y de las larvas de erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*).

## **7. RECOMENDACIONES**

- Establecer regimenes variados con respecto a la composición proximal durante el desarrollo larval para evaluar los procesos fisiológicos como el crecimiento y la preparación para llevar a cabo el proceso de metamorfosis.
- Evaluar los perfiles de ácidos grasos y azúcares, para determinar con mayor precisión las demandas nutricionales para obtener un mayor porcentaje de organismos en estadio juvenil.

## 8. LITERATURA CITADA

- Arredondo-Gómez F.** 1994. La microempresa pesquera en Baja California. *Paradigmas* 2(5):33-42
- Bligh EG y WJ Dyer.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. Biochem. Physiol.* 37:911-917
- Boidron-Metairon IF.** 1988. Morphological plasticity in laboratory-reared echinoplutei of *Dendraster excentricus* (Eschscholtz) and *Lytechinus variegatus* (Lamarck) in response to food conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 119:31-41
- Brown MR.** 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 145:79-99
- Brown MR, SW Jeffrey y CD Garland.** 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. CSIRO Marine Laboratories Report 205, 44 pp.
- Brown MR, SW Jeffrey, JK Volkman y GA Dunstan.** 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151:315-331
- Bustos R, C Godoy, S Olave y R Troncoso.** 1991. Desarrollo de técnicas de producción de semillas y repoblamiento de recursos bentónicos, parte I. Investigaciones en el erizo chileno *Loxechinus albus* (Molina, 1782). Instituto de fomento Pesquero. Chile, PMUD. Impresos XIMPAUSER. 1-60
- Cameron RA y RT Hinegardner.** 1974. Initiation of metamorphosis in laboratory cultured sea urchins. *Biol. Bull.* 146:335-342

- Cary SC, DL Leighton y CF Phleger. 1981.** Food and feeding strategies in culture of larval early juvenile purplehige rock scallops. *Hinnies multirugosus* (Gale). J. World Maricul. Soc. 12(1):156-169
- Cerón-Ortíz AN. 2000.** Evaluación de tres mezclas de microalgas sobre el crecimiento de la almeja mano de león *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus*. Tesis de Maestría. CICESE. 86 pp.
- Colby J. 1979.** Larvas development in the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* and the sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*. Report of Bodega Marine Laboratory and Santa Cruz University. No Publicado.
- Cowey CB y AGJ Tacon. 1983.** Fish nutrition – relevance to invertebrates. In, Proc. 2nd Int. Conf. Aquaculture Nutrition, edited by GD Pruder *et al.*, World Mariculture Soc. Spec. Publ., No. 2, Louisiana State University, Louisiana. 13-30 pp
- Das NN, CR Saad, KJ Ang, AT Law y SA Harmin., 1996.** Diet formulation for *Macrobrachium rosenbergii* (de Mann) broodstock based on essential amino acid profile of its eggs. Aquaculture Research 27:543-555
- Dubois M, KA Gilles, JK Hamilton, PA Rebers y F Smith. 1956.** Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Analytical Chemistry 28:350-356
- Eckert GL. 1998.** Larval development, growth and morphology of the sea urchin *Diadema antillarum*. Bull. Mar. Sci. 63(2):443-451
- Enright CT, GF Newkirk, JS Craigie y JD Castell. 1986.** Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. Fed *Chaetoceros calcitrans* Schutt of varied chemical composition. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 96:1526

- Fenaux L.** 1982. Larval nutrition. In: Echinoderm nutrition, Jangoux M. y Lawrence JM. Eds. AA Balkema Rotterdam, 479-489
- Fonseca-Madrigal J.** 2001. Efecto de seis dietas microalgales en el desarrollo larvario, metamorfosis y obtención de juveniles del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas-Instituto de Investigaciones Oceanológicas. 83 pp.
- Gallager SM y R Mann.** 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture*, 56:105-121
- García-Ezquivel Z, VM Bricelj y MA González-Gómez.** 2001. Physiological basis for energy demands and early postlarval mortality in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 263:77-103
- George SB.** 1996. Echinoderm egg and larval quality as a function of adult nutritional state. *Oceanologica acta*. 19(3-4), 297-308
- González LP, JC Castilla y C Guisado.** 1987. Effect on the larval diet and rearing temperature on metamorphosis and juvenile survival of the edible sea urchin *Lixechinus albus* (Molina, 1782) (Echinoidea: Echinodae). *J. Shellfish. Research*. 6(2):109-115
- Hagen NT.** 1996. Echinoculture: From fishery enhancement to closed cycle cultivation. *World Aquaculture* 27(4):6-19
- Hard MW y RR Strathmann.** 1994. Functional consequences of phenotypic plasticity in Echinoid larvae. *Biol. Bull.* 186:291-299

- Harrison C.** 1975. The essential amino acids of *Mytilus californianus*. Veliger 18:189-193
- Hinegardner RT.** 1969. Growth and development of the laboratory culture sea urchin. Biol. Bull. 137:465-475
- Johnson MW.** 1930. Notes on the larval development of *Strongylocentrotus franciscanus*. Pub. Puget Sound Biol. Sta. 7:401-411
- Jong-Westman M, PY Qian, BE March y TH Carefoot.** 1995. Artificial diet in sea urchin culture: Effects of dietary protein level and other additives on eggs quality, larval morphometrics and larval survival and the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). Can. J. Zool. 73:2080-2090
- Kanazawa A. y S. Teshima.** 1981. Essential amino acids of the prawn. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 47:1375-1377
- Kato S y Schroeter SC.** 1985. Biology of the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*, and its fishery in California. Mar. Fish. Rev. US dept. Comm. Natl. Ocean. Atmosph. Adm. Natl. Mar. Fish. Ser. 47:1-20
- Kreeger DA y CJ Langdon.** 1993. Effect of dietary protein content on growth of juvenile mussels, *Mytilus trossulus* (Gould, 1850). Biol. Bull. 185:123-139
- Lawrence JM, AL Lawrence, SC McBride, SB George, SA Watts y LR Plank.** 2001. Developments in the use of prepared feeds in sea-urchin aquaculture. World Aquaculture 35:34-39

- Lohrenz SE y CD Taylor.** 1987. Inorganic  $^{14}\text{C}$  as a probe of growth rate-dependent variation in intracellular free amino acid and protein composition of  $\text{NH}_4^+$ -limited continuous cultures of *Nannochloris atomis* (Butcher). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 106:31-55
- Lowry HO, NJ Rosebrough, AL Farr y RJ Randall.** 1951. Protein measurement with the phenol reagent. *Biological Chemistry.* 193:265-275
- Maeve SK, AJ Hunter, CL Scholfield y JD McKenzie.** 2000. Morphology and survivorship of larval *Psamechinus miliaris* (Gmelin) (Echinodermata: Echinoidea) in response to varying food quantity and quality. *Aquaculture* 183:223-240
- Malagrino-Lumare G.** 1972. Extracción y preservación de las gónadas de erizo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada de Baja California, México. 19 pp
- Martínez-López RE.** 1994. Descripción del desarrollo larvario en el erizo *Strongylocentrotus franciscanus* (Echinoidea: Echinodermata), y efectos de la densidad, ración alimenticia y cambios de agua. Tesis Licenciatura UABC. 52 pp
- Metaxas A y CM Young.** 1998<sup>a</sup>. Responses of echinoid larvae to food patches of different algal densities. *Mar. Biol.* 130:433-445
- Metaxas A y CM Young.** 1998<sup>b</sup>. Behaviour of echinoid larvae around sharp haloclines: Effects of the salinity gradient and dietary conditioning. *Mar. Biol.* 131:443-459
- Millar RH y JM Scott.** 1967. The larva of the oyster *Ostrea edulis* during starvation. *J. Mar. Biol. Assoc. UK,* 47:475-484

- Miller BA y RB Emler.** 1999. Development of newly metamorphosed juvenile sea urchin (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. purpuratus*): morphology, the effects of temperature and larval food ration, and a method for determining age. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 235:67-90
- Olson RR y MH Olson.** 1989. Food limitations of planktotrophic marine invertebrate larvae: Does it control recruitment success. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 20:225-247
- Palleiro-Nayar JS.** 1994. Pesquería de erizo rojo en Baja California, temporada 1992-1993. En memorias del X Simposium Internacional de Biología Marina. 13 al 17 Junio de 1994; Ensenada, Baja California; México. Universidad Autónoma de Baja California, Southern California Marine Institute y Universidad Autónoma de Baja California Sur. 161 pp
- Palleiro-Nayar JS, AL Lelevier-Grijalva, M Navarrete-Gutierrez y JM Romero-Martínez.** 1988. Biología del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* y su pesquería en Baja California. Centro Regional de Invetigaciones Pesqueras. Ensenada, B.C., México. 53-73
- Pedrotti M, L Fenaux .** 1993. Effects of food diet on the survival, development and growth rates of two cultured echinoplutei (*Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*). *Inv. Reprod. & Dev.* 24(1):59-70
- Preciado M.** 2000. KCl, GABA y L-Glutamina como inductores a la metamorfosis en larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*. Tesis Maestría. FCM. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California. México. 51 pp.
- Renaud SM, T Luong-Van y DL Parry.** 1999. The gross chemical composition and fatty acids composition of 18 species of tropical australian microalgae of possible use in mariculture. *Aquaculture* 170:147-159

- Rodríguez JL, FJ Sedano, LO García-Martin, A Pérez-Camacho y JL Sanchez.** 1990. Energy metabolism of newly settled *Ostrea edulis* spat during metamorphosis. *Mar. Biol.* 106:109-111
- Saito K, K Yamashita, K Tajima, A Obara, Y Nishihama, M Sawasaki, K Kawamata y K Kawamura.** 1985. Manual of artificial seed production of sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius*. Hokkaido Inst. Maricult. 22 pp
- Salas-Garza A y Parés-Sierra.** 2000. Dietary treatments in the development of purple sea urchin larvae *Strongylocentrotus purpuratus* and their impact on metamorphosis. Larval 2000 program. Larval Biology Meetings. University of California Santa Cruz.
- SEMARNAP, 1998.** Capturas de erizo morado por zona de pesca. Periodo 1994-1995 a 1997-1998. Centro Regional de Investigaciones Pesqueras de Ensenada.
- Sorgeloos P y P Léger.** 1992. Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. *J. World Aquac. Soc.* 23:251-264
- Strathmann MF.** 1987. "Phylum Echinodermata, Class Echinoidea", En: *Reproduction and Development of Marine Invertebrates of Northern Pacific Coast.* University of Washington. Press, Seattle, Washington. 670 pp
- Strathmann RR.** 1971. The feeding behaviour of planktotrophic larvae: mechanisms, regulation and rates of suspension-feeding. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 6:109-160
- Strathmann RR.** 1975. Larval feeding in Echinoderms. *Amer. Zool.* 15:717-730

- Van der Meer MB y MCJ Verdegem.** 1996. Comparison of amino acid profiles of feeds and fish as a quick method for selection of feed ingredients: a case study for *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research* 27:487-495
- Videla JA, OR Chaparro y RJ Thompson.** 1998. Role of biochemical energy reserves in the metamorphosis and early development of the oyster *Ostrea chilensis*. *Mar. Biol.* 132:635-640
- Volkman JK, SW Jeffrey, PD Nichols, GI Rogers y CD Garland.** 1989. Fatty acids and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128:219-240
- Webb KL y FE Chu.** 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In, *Proc. 2nd Int. Conf. Aquaculture Nutrition*, edited by G.D. Pruder et al., *World Amriculture Soc. Spec. Publ.*, No. 2, Louisiana State University, Louisiana, pp. 272-291
- Yocota Y.** 2000. Sea urchin fishery in Japan. Sea urchin Aquaculture Workshop. Text book. International Marine Centre. Torregrande, Cerdeña, Italia.
- Zimmerman KM y JA Pechenik.** 1991. How do temperature and salinity affect relative rates of growth, morphological differentiation, and time to metamorphic competence in larvae of the marine gastropod *Crepidula plana*. *Biol. Bull.* 180:372-386

Apéndice 1. Porcentaje de proteínas, lípidos y carbohidratos en tres géneros de microalgas.

Autor/Componente	Proteínas (%)			Lípidos (%)			Carbohidratos (%)		
	Rh	Iso	Chae	Rh	Iso	Chae	Rh	Iso	Chae
Ferreiro <i>et al.</i> , 1990	4.1			11.9			1.4		
Fernández-Reiriz <i>et al.</i> , 1989	16.5	39.9	2.6	27.8	28.6	11.7	12.6	15.2	2.4
Lafarga, 2000	21.0			12.7			18.3		
Fonseca-Madrigal, 2001	45.4	35.8	33.8	17.7	21.3	22.6	13.1	10.6	7.5
McCausland, 1999	59.0	34.0	47.0	19.0	24.0	19.0	19.0	30.0	23.0
Cerón, 2000		23.7	23.3		11.6	14.3		10.0	9.0
Whyte, 1987		33.4			25.0				
Este estudio	36.72			12.82			6.04		

Rh: *Rhodomonas* spp., Iso: *Isochrysis* spp., Chae: *Chaetoceros* spp.

## ***Agradecimientos***

Agradecimientos a: CONACYT, FCM e IIO de la UABC y de manera especial a Eugenio Carpizo, Beatriz Cordero, Enrique Valenzuela, Gema Valdez, Cesar Blas, Claudia Moreno, Agustín Hernández, Griselda Parés y a todos aquellos que colaboraron, de alguna manera, en la realización de este sencillo trabajo.