

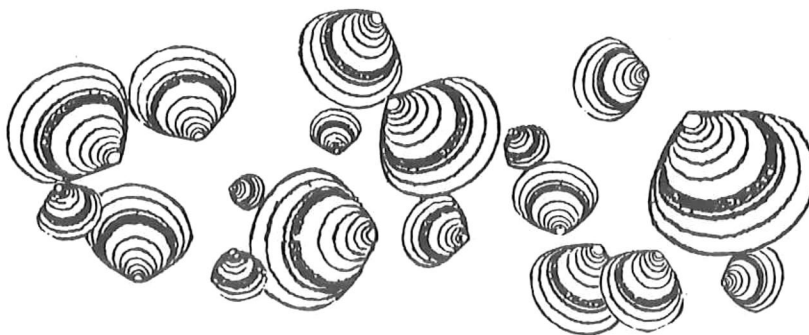


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

EFFECTO COMBINADO DE LA DENSIDAD LARVAL Y RACION
ALIMENTICIA EN EL CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE LAS
LARVAS DE LA ALMEJA *Chione cortezi* (Carpenter, 1864)



TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

OCEANOLOGO

PRESENTA


ALEXANDRA GUTIERREZ GARCIA

Ensenada B.C. Julio de 1991

EFFECTO COMBINADO DE LA DENSIDAD LARVAL Y RACION
ALIMENTICIA EN EL CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE LAS LARVAS
DE LA ALMEJA Chione cortezi (Carpenter, 1864).

T E S I S
QUE PRESENTA:
ALEXANDRA GUTIERREZ GARCIA

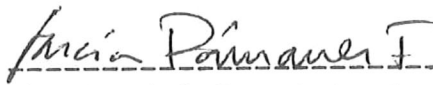
APROBADA POR:



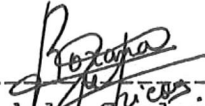
Presidente del Jurado
Oc. Lewis S. McAnally Salas




Sinodal Propietario
MC. Guillermo Torres Moya



Sinodal Propietario
Oc. Fernando García Pámanes



Sinodal Suplente
MC. Roxana Rico Mora

○


Sinodal Suplente
Oc. Eugenio Carpizo Ituarte

RESUMEN

Se analizó el efecto combinado de las variables densidad larval y ración alimenticia sobre el crecimiento y sobrevivencia de la almeja Chione cortezi durante 26 días. Mediante un modelo central compuesto de precisión uniforme el cual constó de cinco niveles por variable. Las densidades de larvas experimentadas estuvieron en un rango de 3.3 a 16.5 larvas/ml y se realizaron ajustes de densidad semanales. Las raciones de alimento fueron determinadas como células por larva, en un rango de 1,000 a 150,000 cel/larva. En base a la significancia de las regresiones múltiples realizadas para cada día, se obtuvieron superficies de respuesta para crecimiento los días 5, 8, 14, y 17, mientras que para las superficies de respuesta en sobrevivencia, solamente en los días 8 y 23. Para los días no analizados de éste modo, se realizaron curvas de ambas variables dependientes. Se encontró que para el crecimiento, la variable más importante fue la densidad larval; mientras que en la sobrevivencia ambas variables interactuaron de manera más clara. Para fines prácticos se establecieron las mejores condiciones de cultivo por semana.

DEDICATORIA

A mis padres:

Miguel Gutiérrez Vertti y
Carmen García Landavazo

Mi apoyo y ejemplo a seguir

A mis hermanos:

Arsinoe, Antonio, Víctor y Tábata

Mi mayor tesoro

A Edgar Gil Villarello

Mi gran amor

"Ser libre es volar con alas propias,
despegar dejando el puerto mirando siempre
adelante, pero siempre recordando la costa
que te ve partir."

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas, por el apoyo brindado en instalaciones, material y equipo, que hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Dirección de Investigación y Posgrado, por la beca que me fue otorgada.

A la Secretaría de Educación Pública, por el apoyo brindado al programa DELTA-CAMARON, convenio N^o C89-01-0358, al que pertenece este estudio.

Al Oc. Lewis McAnally Salas, por su amistad, así como su tiempo y apoyo dedicado a la dirección de esta tesis.

Al Oc. Fernando García Pámanes, a la M.C. Roxana Rico Mora, al Oc. Eugenio Carpizo Ituarte y al M.C. Guillermo Torres Moya, por sus acertadas críticas y comentarios para el mejoramiento de este escrito.

A investigadores y tesistas del Laboratorio de Acuicultura del IIO, por la ayuda brindada de una u otra forma, durante el experimento.

Al Oc. Edgar Gil Villarello, por su amor y por su apoyo durante la realización de éste trabajo.

A mis padres, a Arsi, Abuelita Carmen, Tía Consuelo, Víctor y toda mi familia, por el apoyo y comprensión.

A la familia Gil Villarello, por su cariño y apoyo.

A Alejandra, Lupita, Tony, Martha y Mercedes, por su amistad.

A mis compañeros de la Generación XXIX, por todos los momentos compartidos.

A maestros y alumnos de la Facultad de Ciencias Marinas, por permitirme ser parte de su mundo.

A mi alma mater, UABC, por mi formación académica.

A este bello puerto de Ensenada y a su gente, por su hospitalidad.

Al mar... que me trajo hasta aquí.

CONTENIDO

| | PAG. |
|--|------|
| INTRODUCCION..... | 1 |
| ANTECEDENTES..... | 4 |
| OBJETIVO..... | 11 |
| MATERIALES Y METODOS..... | 12 |
| RESULTADOS..... | 21 |
| -Superficie de respuesta en crecimiento..... | 21 |
| -Curvas de crecimiento..... | 34 |
| -Superficie de respuesta en sobrevivencia..... | 39 |
| -Curvas de sobrevivencia..... | 45 |
| DISCUSION..... | 50 |
| -Crecimiento..... | 50 |
| -Sobrevivencia..... | 56 |
| CONCLUSIONES..... | 62 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 63 |

LISTA DE FIGURAS

PAG.

- Fig. 1.-Representación gráfica del diseño central compuesto.....15
- Fig. 2.-Superficie de respuesta del crecimiento obtenido en el 5^o día.....23
- Fig. 3.-Superficie de respuesta del crecimiento obtenido en el 8^o día.....27
- Fig. 4.-Superficie de respuesta del crecimiento obtenido en el 14^o día.....30
- Fig. 5.-Superficie de respuesta del crecimiento obtenido en el 17^o día.....33
- Fig. 6.-Efecto de la densidad larval, ajustada semanalmente, sobre el crecimiento de larvas de Chione cortezi alimentadas con 75,000 cel/larva.....35
- Fig. 7.-Efecto de la ración alimenticia sobre el crecimiento de larvas de Chione cortezi cultivadas a una misma densidad;10 larvas/ml para la 1^a semana; 6.6 larvas/ml para la 2^a y 4.4 larvas para la 3^a semana....36
- Fig. 8.-Efecto de la densidad larval, ajustada semanalmente, sobre el crecimiento de larvas de Chione cortezi38
- Fig. 9.-Superficie de respuesta en sobrevivencia obtenida para el 8^o día.....41
- Fig.10.-Superficie de respuesta de sobrevivencia obtenida para el 23^o día.....43
- Fig.11.-Efecto de la densidad larval, ajustada semanalmente, sobre la sobrevivencia de larvas de Chione cortezi alimentadas con 75,000 cel/larva.....46

Fig. 12.-Efecto de la ración alimenticia sobre la sobrevivencia de larvas de Chione cortezi cultivadas a una misma densidad; 10 larvas/ml para la 1ª semana, 6.6 larvas/ml para la 2ª y 4.4 larvas/ml para la 3ª semana.....47

Fig. 13.-Efecto de la ración alimenticia y densidad larval sobre la sobrevivencia de larvas de Chione cortezi.....48

LISTA DE TABLAS

| | PAG. |
|--|------|
| Tabla I.-Condiciones experimentales aplicadas a las larvas de <u>Chione cortezi</u> ; se indica la densidad larval para la 1 ^a , 2 ^a y 3 ^a semana. La matriz se expresa en combinación de valores codificados para el diseño central compuesto..... | 16 |
| Tabla II.-Valores para el 5 ^o día de los coeficientes de la regresión obtenidos para cada variable, sus niveles de significancia y el análisis de varianza..... | 22 |
| Tabla III.-Valores para el 8 ^o día de los coeficientes de la regresión obtenidos para cada variable, sus niveles de significancia y el análisis de varianza..... | 25 |
| Tabla IV.-Valores para el 14 ^o día de los coeficientes de la regresión obtenidos para cada variable, sus niveles de significancia y el análisis de varianza..... | 28 |
| Tabla V.-Valores para el 17 ^o día de los coeficientes de la regresión obtenidos para cada variable, sus niveles de significancia y el análisis de varianza..... | 31 |
| Tabla VI.-Valores para el 8 ^o día de los coeficientes de la regresión obtenidos para cada variable, sus niveles de significancia y el análisis de varianza..... | 39 |
| Tabla VII.-Valores para el 23 ^o día de los coeficientes de la regresión obtenidos para cada variable, sus niveles de significancia y el análisis de varianza..... | 42 |

INTRODUCCION

A una década del siglo XXI, y ante la interrogante sobre la alimentación del futuro, el océano, con todos sus recursos, y la acuicultura, como una herramienta del hombre, se contemplan como una respuesta a la escasez de alimento. Entre los recursos con potencial acuacultural con que cuenta el medio marino se destacan los moluscos bivalvos, que por su naturaleza filtradora al lograr una posición privilegiada en la cadena trófica, constituyen una fuente de alimento con alto contenido proteico.

La comercialización de mariscos en la zona Noroccidental de México se ha incrementado en los últimos años; existe una gran variedad de especies que cuentan con la aceptación del consumidor. Entre éstas se encuentra la almeja "roñosa" Chione cortezi, perteneciente a la familia de las Venerideas, que tiene concha dura y carne de buen sabor y alcanza tallas entre 62 y 102 mm de longitud, altura máxima de 55-97 mm; diámetro de 34-48 mm (Keen, 1971; García-Pámanes*, com. pers.). Aún cuando se localiza a profundidades de 90 m (Keen, 1971), ésta almeja forma bancos en áreas someras con densidades de hasta 40 ind/m² (Baqueiro *et al.*, 1982). Por la facilidad con que se extrae y la accesibilidad a las áreas de captura, ésta

*García-Pámanes, Fernando; Instituto de Investigaciones Oceanológicas, U.A.B.C., Apdo. Postal 453, Ensenada, B.C., México.

almeja ha sido un recurso auxiliar del pescador. Debido a la falta de información y regulación por parte de las autoridades, éste recurso en ocasiones ha sido arrasado (Baqueiro y Massó, 1988), por lo que se deben implementar sistemas de cultivo, así como estrategias de repoblamiento para evitar su agotamiento y al mismo tiempo, se incrementa su comercialización.

Debido a que los bivalvos con larvas planctónicas presentan altas mortalidades en los estadios tempranos de desarrollo (Kraeuter *et al.*, 1982), el éxito de éstos cultivos depende en buena parte, del establecimiento y desarrollo de técnicas de larvicultura (Manzi, 1985). Por otro lado, se sabe que los requerimientos fisiológicos de los bivalvos son más específicos para las larvas que para organismos juveniles ó adultos (Loosanof y Davis, 1963; Calabrese y Davis, 1970; Walne, 1979) por lo que su cultivo en laboratorio con el control de su alimentación es recomendable para eficientizar la producción de semilla.

El establecimiento de técnicas eficientes de cultivo de moluscos bivalvos considera un gran número de factores como son: temperatura, salinidad, calidad y cantidad de alimento, densidad larval, calidad del agua, pH, oxígeno, etc. (Calabrese y Davis, 1970; Sidall, 1978). De

éstos factores, se destaca la ración alimenticia ya que el suministro de la cantidad adecuada de alimento contribuye a la obtención de un mejor crecimiento y sobrevivencia (Winter, 1970; Tenore y Dunstan, 1973; Riisgård, 1988). Asimismo es importante considerar el efecto que ejerce la densidad de población en un cultivo ya que determinar las necesidades de espacio de la larvas, permite un mayor control sobre el desarrollo del cultivo. Por lo tanto, el conocimiento de éstos requerimientos, aporta elementos para aplicar la tecnología eficientemente y proporciona una optimización de recursos en términos de alimento, estanqueras, mantenimiento de organismos, y del sistema de cultivo en general.

Por tal situación, surge la necesidad de ampliar el conocimiento de la especie; estudiar su fisiología, requerimientos alimenticios, aspectos reproductivos y en general, las condiciones óptimas para su desarrollo a fin de favorecer, el establecimiento de un sistema de cultivo. El presente trabajo forma parte de un primer intento para analizar los requerimientos de espacio y cantidad de alimento de las larvas de Chione cortezi, para lo cual se utilizará la microalga Isochrysis galbana como alimento.

ANTECEDENTES

La extracción de almejas y caracoles en la península de Baja California ha sido intensiva en los últimos 50 años (Villamar, 1965). En México se capturaron en 1987, 13,661 toneladas de almeja, de las cuales, 12,462 correspondieron al litoral del Pacífico y 1,199 al litoral del Golfo de México y Caribe (Sepesca, 1988; citado por García-Domínguez y Levy-Pérez, 1990).

Sin embargo, el desconocimiento de algunos sectores (cooperativistas, pescadores) sobre la situación de las pesquerías de las especies de importancia comercial ha ocasionado, en parte, el agotamiento de los bancos. Así, la declinación de otras pesquerías (como la del abulón), ha obligado a las cooperativas que cuentan con la infraestructura de captura, a poner su atención en especies hasta ahora ignoradas (Baqueiro et al., 1982).

La pesquería de la almeja roñosa está compuesta por varias especies del género Chione, entre ellas: C. californiensis, C. gnidia C. undatella y C. cortezi. Las tres primeras de explotación en el estado de Baja California Sur, México (Holguin, 1976; Baqueiro et al., 1982) y la última, objeto de éste estudio, de incipiente explotación en la región noroeste del Golfo de California.

El Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) ha realizado numerosos estudios enfocados al establecimiento de cultivos de moluscos y crustáceos en la región norte de Baja California. Actualmente se lleva a cabo el proyecto DELTA-CAMARON, en la zona del alto Golfo de California, que tiene entre sus objetivos estudiar las pesquerías alternas al camarón, así como analizar la factibilidad de llevarlas a nivel comercial. Entre esas especies se encuentra la almeja C. cortezi.

Chione cortezi (Carpenter, 1864), sinónimo de C. gibbosula, pertenece a la familia Veneridae. Keen, 1971 realiza una comparación y afirma que C. cortezi es más grande y triangulada que C. fluctifraga, la cual tiene mayor distribución. Las costillas concéntricas están más juntas y uniformemente espaciadas, las costillas radiales reducidas a estrias y unas pocas líneas incisivas anterior y posteriormente. El interior tiene un tono azulado más tenue, principalmente en las orillas. La distribución de C. cortezi vá de las costas de Baja California (cerca de Bahía Magdalena) hasta San Felipe, y en las costas del alto Golfo de California, hasta Guaymas, Sonora, que es su localidad típica (Keen, 1971).

La bibliografía sobre el género Chione es escasa. Se han realizado algunos trabajos sobre la biología y

fisiología del género Chione. Se conocen algunos trabajos referentes a la especie C. cancellata como el de D` Asaro (1967), quien describe su morfología; La Barbera y Chanley (1970) realizan una detallada descripción del desarrollo larval y Moore y López (1969; 1976) describen sus características de habitat y comportamiento. Más reciente es el trabajo de estrategias de transplatación de C. stutchburyi con respecto al gradiente de mareas, con el fin de madurar los organismos al nivel de mareas más conveniente (Dobbinson et al., 1989).

Otros trabajos analizan la pesquería de Chione en la región sur de la península de Baja California, Baqueiro et al., (1982) y Baqueiro y Massó (1988) concluyen que Chione californiensis constituye una pesquería auxiliar ó alternativa. En cuanto a aspectos reproductivos, Figueroa-López (1988) obtiene buenos resultados al aplicar las técnicas establecidas de cultivo de ostión a la producción de larvas y juveniles de C. gnidia en condiciones de laboratorio. García-Domínguez y Levy-Pérez, (1990) determinaron la relación de la temperatura con el ciclo reproductor de C. californiensis. Estos autores encontraron indiferenciación en los meses más fríos del año (enero-marzo).

Respecto a la especie Chione cortezi existe solamente

un trabajo conocido que describe su desarrollo embrionario y establece la importancia de la temperatura en el desarrollo larval (Estrada-Reyes, 1991).

El cultivo de larvas de almeja ha sido objeto de estudio desde principios de siglo, cuando pioneros como Belding, quien en 1912 intentó criar larvas de Mercenaria mercenaria sin éxito, y encontró que no existía un método práctico para mantener las larvas hasta la etapa de charnela recta debido al tamaño tan pequeño y a la delicada naturaleza del huevo. Aunque Wells en 1927, cultivó larvas de almeja hasta la metamorfosis, no hubo mayor avance en ésta área.

No fué hasta la década de los 50's y 60's cuando se realizaron numerosos trabajos que lograron establecer técnicas de acondicionamiento y crianza de larvas de un gran número de especies de moluscos bivalvos, incluidas las almejas (Loosanof y Davis, 1950, 1963; Loosanof y Marak, 1951; Carriker, 1961; Loosanof et al., 1955, 1966; Davis, 1969), entre otros.

Una vez implementado el larvicultivo, se estableció la importancia de la interrelación de los factores ambientales en el desarrollo del ciclo larval, así como conocer la tolerancia y requerimientos a parámetros

como temperatura, salinidad, pH, cantidad y calidad de alimento y el efecto de las diferentes combinaciones de éstos sobre el crecimiento y sobrevivencia de las larvas (Calabrese y Davis, 1970).

Asimismo surge la necesidad de generar información sobre las características de la alimentación de larvas de moluscos bivalvos (Ukeles, 1975). Es primordial conocer la alimentación que resulte más adecuada y económica para el cultivo bajo condiciones de laboratorio (Goodrich *et al.*, 1968; Dassow y Steinberg, 1973). El desarrollo de ésta información en moluscos se encuentra considerablemente atrás de los trabajos desarrollados al respecto para larvas de peces y crustáceos (Epifanio, 1975).

Manzi (1985), menciona que el éxito de la larvicultura de un bivalvo y de su subsecuente maduración y engorda, depende en buena parte de la calidad de su alimento. Sin embargo, desde que las microalgas unicelulares fueron reconocidas como fuente de alimento de las larvas de bivalvos hace cerca de medio siglo (Cole, 1937; Bruce *et al.*, 1939), relativamente pocas especies de microalgas han demostrado mantener a éstos organismos hasta completar su desarrollo larval (Tan Tiu *et al.*, 1989).

Las microalgas Monochrysis (Pavlova) lutheri e Isochrysis galbana se han utilizado ampliamente en las

dietas de larvas de moluscos, ya que han resultado alimento adecuado debido a que son flagelados de fácil cultivo, carecen de pared celular (son desnudos) por lo que pueden ser fácilmente digeridos, su tamaño resulta adecuado para ser ingeridos por las larvas y su composición química presenta alto contenido de lípidos (Davis y Guillard, 1957; Loosanof y Davis, 1963; Walne, 1970; Tan Tiu, 1988).

Ante la preocupación de establecer las cantidades de alimento requeridas por las larvas de bivalvos, Loosanof et al., (1953a; 1955) enfocaron su estudio al comportamiento de larvas de almeja ante diversas concentraciones de alimento y encontraron que en ocasiones, éstas murieron por sobrealimentación y en otras, por inanición. Además, las larvas mostraron selectividad alimenticia tanto cuantitativa como cualitativamente. En base a lo anterior, se establece la importancia del efecto de la concentración de alimento sobre el crecimiento y sobrevivencia de las larvas (Davids, 1964; Winter, 1970; Bayne et al., 1976; Winter, 1978). Estudios más recientes han encontrado que un incremento en la densidad algal, no significa necesariamente un incremento en la tasa de ingestión (Bayne, 1983; Bricelj, 1984) o en crecimiento (Rhodes et al., 1984; Riisgård, 1988; Malouf y Bricelj, 1989).

Otro aspecto a considerar es el nivel óptimo de

densidad de población que debe ser mantenido durante el cultivo. En experimentos realizados por Loosanof et al., (1953b, 1955) y Carriker, (1961) se encontró una relación inversa entre la tasa de crecimiento y la densidad de la población. Sin embargo, se sabe que la sobrepoblación de larvas no resulta tan peligrosa como se creía (Loosanof y Davis, 1963), aún así, se ha observado que la tasa de crecimiento en cultivos sobrepoblados es más lento y el tiempo en que alcanzan la metamorfosis es consecuentemente mayor (op. cit.).

Tradicionalmente la experimentación empleada para definir las mejores técnicas de cultivo se ha realizado mediante experimentos unifactoriales. Sin embargo, poco a poco se han ido aplicando cada vez más experimentos multifactoriales. La importancia de analizar el efecto combinado de varios factores sobre el desarrollo de un proceso fué inicialmente sugerida por Box y Wilson (1951).

Para interpretar éste efecto, la técnica de superficie de respuesta resulta un método eficiente, que además de ayudar al proceso, puede reducir los costos de experimentación. Esta técnica fué utilizada principalmente en áreas químicas, físicas y de producción (industrial, comercial, etc.), y encontró rápidamente aplicación en procesos biológicos (Mendez, 1977).

La ventaja de ésta metodología es la predicción de respuesta de un organismo ante un amplio rango de condiciones experimentadas y aún aquéllas no experimentadas y una representación visual de cualquier cambio a distintos varios niveles (Lough, 1975) y provee una predicción más real de los procesos fisiológicos (Alderdice, 1972).

Existen numerosos trabajos que coinciden en analizar el efecto combinado de los factores ambientales que influyen en el desarrollo y sobrevivencia de larvas y juveniles de moluscos. Utilizando la técnica de superficie de respuesta se han estudiado ampliamente parámetros como salinidad, temperatura, pH, oxígeno, concentración de alimento entre otros. El método ha sido aplicados por: Amemiya (1928), Davis y Calabrese (1964) y McAnally-Salas *et al.*, (1989) con ostiones; Bayne (1965), Brenko y Calabrese (1969), Lough y Gonor (1971) y Anguiano-Beltrán (1989) sobre mitílidos; Davis y Calabrese (1964), Calabrese (1969), Cain (1973), y Tettelbach y Rhodes (1981), sobre almejas, entre otros.

OBJETIVO

Analizar el efecto combinado de la densidad larval y ración alimenticia en el crecimiento y sobrevivencia de las larvas de la almeja Chione cortezi.

MATERIALES Y METODOS

Los ejemplares de Chione cortezi fueron recolectados en el Golfo de Santa Clara, Sonora, México. Se trasladaron en hieleras en seco al laboratorio de acuicultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas -UABC, donde se mantuvieron en un estanque a temperatura ambiente con recambios de agua cada tercer día . Fueron alimentados con dieta a base de Isochrysis galbana.

-Desove.-

Se indujeron al desove 10 almejas mediante la inyección de una solución de serotonina (Gibbons y Castagna, 1985) a una concentración de 2×10^{-4} M a través de una pequeña incisión en la concha, cuidando de aplicarla sobre el músculo aductor. Al iniciar el desove se separaron por sexo, para mantener un control sobre la fertilización; los óvulos fueron tamizados para eliminar material residual y se realizó su cuantificación de óvulos aforando a un volumen conocido. La cuantificación se hizo mediante el conteo de los ovocitos en muestras de 1 ml , observadas con un microscopio compuesto. La cantidad establecida por ml se extrapoló al volumen total.

Para la fertilización se agregaron 20 ml de una

suspensión densa de esperma al total de óvulos obtenidos, homogeneizando la mezcla con la ayuda de un agitador de acrílico. A partir de ése momento, las larvas permanecieron durante 48 horas sin alimento ni aireación de acuerdo a Loosanof y Davis (1963), después de lo cual se drenaron y filtraron en un tamiz de luz de malla de 53 μ con el objeto de eliminar el material de desecho. Se cuantificaron las larvas totales obtenidas, se distribuyeron en los recipientes individuales con las condiciones experimentales previamente establecidas.

-Diseño Experimental.-

Para analizar el efecto combinado de los factores ración alimenticia y densidad larval, se utilizó un diseño experimental del tipo central compuesto de precisión uniforme (Montgomery, 1976) que genera gráficas de superficie de respuesta, que proporcionan una clara visualización de los efectos combinados. Este diseño consiste de un factorial 2K (i.e., usando la codificación -1 a +1) y aumentado por 2K puntos axiales (ó estrella, usando la codificación -1.414 y +1.414) y n0 puntos centrales.

Un diseño central compuesto se hace rotacional al seleccionar el valor de alfa (α) que representa la distancia del centro a cualquier punto factorial y cuyo

valor depende del número de puntos en la parte factorial.

Con la elección del número de puntos centrales $n_0 = 5$ el diseño se hace de precisión uniforme (Montgomery, 1976) (Figura 1).

El diseño consistió de 5 puntos centrales, 4 puntos axiales y 4 puntos factoriales, con un total de 13 puntos, que representan 13 unidades experimentales (Tabla I). Este diseño cuenta con 5 niveles por variable; la combinación de ambas variables para cada tratamiento fue codificada (para agilizar su manejo) en -1.414, -1, 0, 1, y 1.414, en base al diseño experimental propuesto (Tabla I) en donde -1.414 y 1.414 corresponden a los valores extremos de las variables y el 0 al valor medio de cada variable.

Las dos variables a experimentar fueron la concentración de alimento y la densidad de larvas/ml. La ración alimenticia tuvo valores de 1,000 , 21,250, 75,000, 128,750 y 150,000 cel/larva/48 horas, estas raciones se establecieron con el objeto de analizar un rango nunca antes probado. En tanto que la densidad larval tuvo un rango de 3.3 a 16.5 larvas/ml para la primera semana; de 2.4 a 11 larvas/ml para la segunda, y 1.6 a 7.3 larvas/ml de la tercera semana en adelante; éstos rangos se establecieron en base al número de larvas obtenidas con el desove.

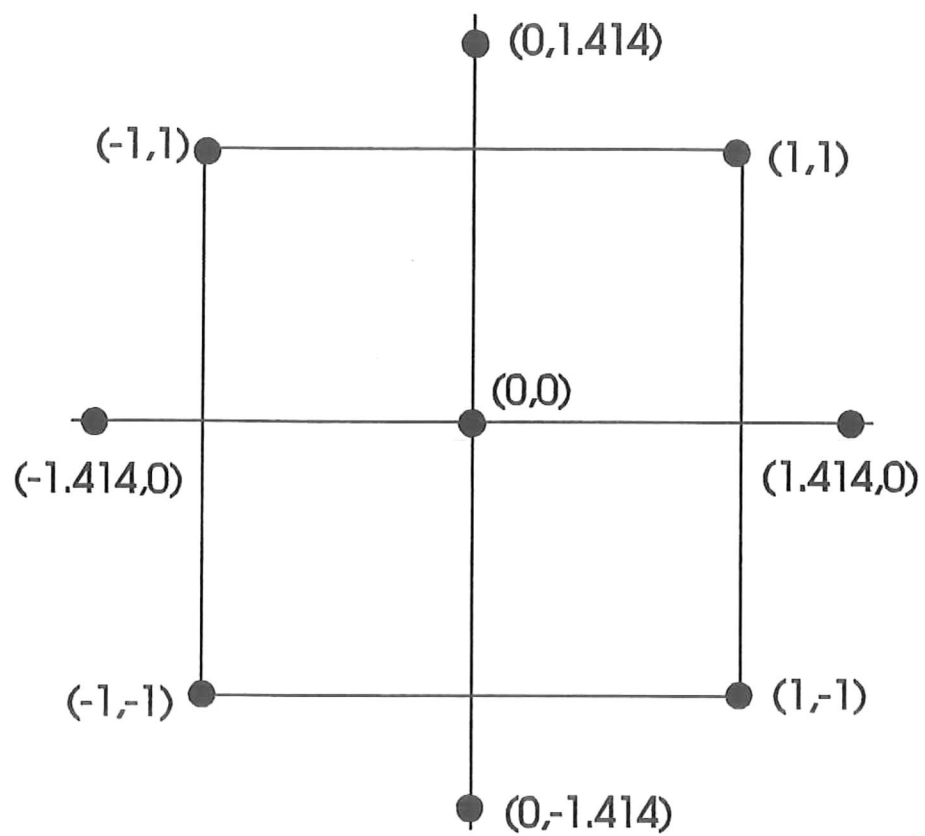


Figura 1.- Diseño central compuesto rotacional de precisión uniforme.

Tabla I.- Condiciones experimentales aplicadas a las larvas de Chione cortezi; se indica la densidad para la 1era, 2da y 3era semana. La matriz se expresa en combinación de valores codificados para el diseño central compuesto.

| DENSIDAD LARVAL [larva/ml] | RACION ALIMENTICIA [cel/larva X 10E3] | MATRIZ | | | |
|----------------------------------|---|--------|--------|-----------------------|--|
| (1a/2a/3a sem) | | | | | |
| 14.6/9.7/6.5 | 128,750 | +1 | +1 | | |
| 14.6/9.7/6.5 | 21,250 | +1 | -1 | PUNTOS FACTORIALES | |
| 5.3/3.5/2.3 | 128,750 | -1 | +1 | | |
| 5.3/3.5/2.3 | 21,250 | -1 | -1 | | |
| ----- | | | | | |
| 10/6.6/4.4 | 75,000 | 0 | 0 | | |
| 10/6.6/4.4 | 75,000 | 0 | 0 | | |
| 10/6.6/4.4 | 75,000 | 0 | 0 | PUNTOS CENTRALES | |
| 10/6.6/4.4 | 75,000 | 0 | 0 | | |
| 10/6.6/4.4 | 75,000 | 0 | 0 | | |
| ----- | | | | | |
| 10/6.6/4.4 | 150,000 | 0 | +1.414 | | |
| 16.5/11/7.3 | 75,000 | +1.414 | 0 | PUNTOS AXIALES | |
| 10/6.6/4.4 | 1,000 | 0 | -1.414 | | |
| 3.3/2.4/1.6 | 75,000 | -1.414 | 0 | | |

-Sistema Experimental.-

El sistema contó con 13 unidades experimentales que consistieron en recipientes Nalgene de 2 litros, que fueron colocados en una charola de 2.52 x 8.35 x 0.16 m y su acomodo fue aleatorio para evitar el problema de la pseudoreplicación (Hurlbert, 1978). Se les instaló un sistema de aireación con mangueras individuales y mediante un baño maría se mantuvieron a temperatura ambiente durante todo el experimento.

Con el fin de evitar la concentración de metabolitos, se establecieron rutinas de recambio de agua, cada tercer día; se drenó el cultivo a través de tamices de luz de malla de 28 μ para segregar a las larvas y de 245 μ para retener la basura. Los recipientes se lavaron, se reemplazó el agua y se reestablecieron las condiciones experimentales. Para mantener la densidad deseada se reajustó el volumen cuando fué necesario. La temperatura fué registrada diariamente.

El alimento suministrado fué la microalga Isochrysis galbana que fué proporcionada por el laboratorio de cultivo de microalgas del IIO. La concentración de células se determinó por densidad óptica, con un espectrofotómetro y se transformó a número de células mediante una curva de

calibración. Las raciones fijadas se basaron en el número de células por larva (cel/larva).

Se realizaron muestreos cada cuarto día, para ello se tomaron 30 larvas de cada unidad experimental con ayuda de una pipeta automática de 1 ml, se calculó la cantidad de larvas por ml y se extrapoló el número de larvas al volumen total del recipiente.

Para calcular el porcentaje de sobrevivencia para cada día de muestreo se tomó al número de larvas inicial como el 100% de sobrevivencia y a partir de éste se calculó el porcentaje de los días subsecuentes. El crecimiento se estimó midiendo la longitud antero-posterior de las larvas muestreadas. La respuesta en crecimiento para cada una de las 13 unidades experimentales se determinó promediando las longitudes registradas para cada unidad. Para evaluar la respuesta máxima en crecimiento para cada día de muestreo, el incremento máximo obtenido fué expresado como el 100% de respuesta y antes de convertir a porcentaje se les restó la talla promedio inicial.

-Análisis de datos.-

En cada muestreo se promediaron los porcentajes de sobrevivencia y crecimiento de cada unidad experimental.

Se realizó una regresión múltiple del tipo:

$$Y = b_0 + b_1(RA) + b_2(D) + b_3(RA^2) + b_4(D^2) + b_5(RA \cdot D)$$

que expresa la respuesta en crecimiento y sobrevivencia para los factores probados.

Donde: Y = respuesta en crecimiento y sobrevivencia

b_n = coeficientes de regresión

RA = Valor codificado de ración alimenticia

D = Valor codificado de densidad larval

Una vez hechas las regresiones para cada día de muestreo, se seleccionaron aquéllas que fueran significativas, para lo cual se tomó como criterio el valor de probabilidad del análisis de varianza. Las regresiones cuyo valor de probabilidad fuera $\alpha \leq 0.05$ se consideraron significativas y con los valores de la regresión de esos días, se analizó el crecimiento y sobrevivencia mediante gráficas de superficie de respuesta. Se tomó el mismo criterio para eliminar variables de la ecuación de regresión.

El intervalo de las isolíneas se determinó en base al error experimental estimado y se expresó en múltiplos de 5, y se asignó a cada gráfica el intervalo inmediato superior al error experimental. Con el fin de analizar el

crecimiento y de sobrevivencia de aquéllos días cuyas regresiones no resultaron significativas, se realizaron curvas de crecimiento y sobrevivencia para todas las condiciones experimentales. Estas curvas se expresaron en longitud (μm) en el caso del crecimiento, y en porcentaje de larvas sobrevivientes hasta el final del experimento, para el caso de la sobrevivencia.

Debido a que los métodos de alimentación utilizados en éste trabajo se expresan en términos de ración alimenticia (cel/larva) y los mencionados por la mayoría de los autores son en concentración de alimento (cel/ml, cel/ μl), para efecto de comparación, se transformó a cel/ μl .

RESULTADOS

De la inducción al desove realizada a 10 almejas, el 80% de los organismos reaccionaron al estímulo (5 machos y 3 hembras) y se obtuvo un total de 463,660 óvulos. Cuarenta y ocho horas después de la fertilización se cuantificaron 128,960 larvas en total. La temperatura fué de $20^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante el experimento.

-Superficies de respuesta en crecimiento

El ajuste al modelo fué significativo para las gráficas correspondientes a los días 5, 8, 14 y 17 de crecimiento y se presentan a continuación.

Respuesta al 5o día

En el análisis de varianza de la regresión para el quinto día de muestreo, se obtuvo un nivel de significancia de $\alpha=0.050$, con un coeficiente de determinación múltiple $R^2=0.54$ los términos significativos de la regresión fueron: el término constante, el término lineal de densidad (D), y el término cuadrático de la ración alimenticia (RA2) (Tabla II), por lo que se obtuvo con ellos la siguiente ecuación de respuesta:

$$Y = 79.439 - 13.365(D) - 9.567(RA2)$$

Tabla II.- Valores para el 5^o día de los coeficientes de regresión obtenidos para cada variable, sus niveles de significancia y el análisis de varianza. (<= coeficientes incluidos en la ecuación).

| Variable | Valor coeficiente | Error estandar | Coficiente estandar | T | Nivel de signif. (a) |
|-----------------|----------------------|-------------------|------------------------|--------|-------------------------|
| Constante | 79.439 | 4.803 | 0.000 | 16.538 | 0.000 < |
| Ración | -1.408 | 3.798 | -0.073 | -0.371 | 0.722 |
| Densidad | -13.365 | 3.798 | -0.689 | -3.519 | 0.010 < |
| Racion2 | -9.567 | 4.073 | -0.464 | -2.349 | 0.050 < |
| Densidad2 | -4.297 | 4.073 | -0.208 | -1.055 | 0.327 |
| Ración*Densidad | -3.639 | 5.370 | -0.133 | -0.678 | 0.520 |

ANOVA

| Fuente | Suma cuadrática | G/L | Media cuadrática | F | Nivel de significancia (a) |
|-----------|--------------------|-----|---------------------|-------|-------------------------------|
| Regresión | 2199.782 | 5 | 439.956 | 3.814 | 0.055 |
| Residual | 807.560 | 7 | 115.366 | | |

La superficie de respuesta obtenida para el día cinco (Fig. 2) muestra una cordillera ascendente, en la cual el término lineal de densidad es muy evidente, y presentó los más bajos valores de respuesta (45-60%) a altas densidades (10-16.5 larvas/ml), incrementándose a 90% al disminuir la densidad (5.3 larvas/ml). El término cuadrático de la ración alimenticia influyó en la respuesta de manera que en los niveles extremos (1,000 y 150,000 cel/larva) se dan respuestas más bajas (75%), incrementándose (90%) hacia los valores centrales (128,750; 75,000; 21,250 cel/larva). La mayor respuesta en crecimiento fué de 98.15%, con baja

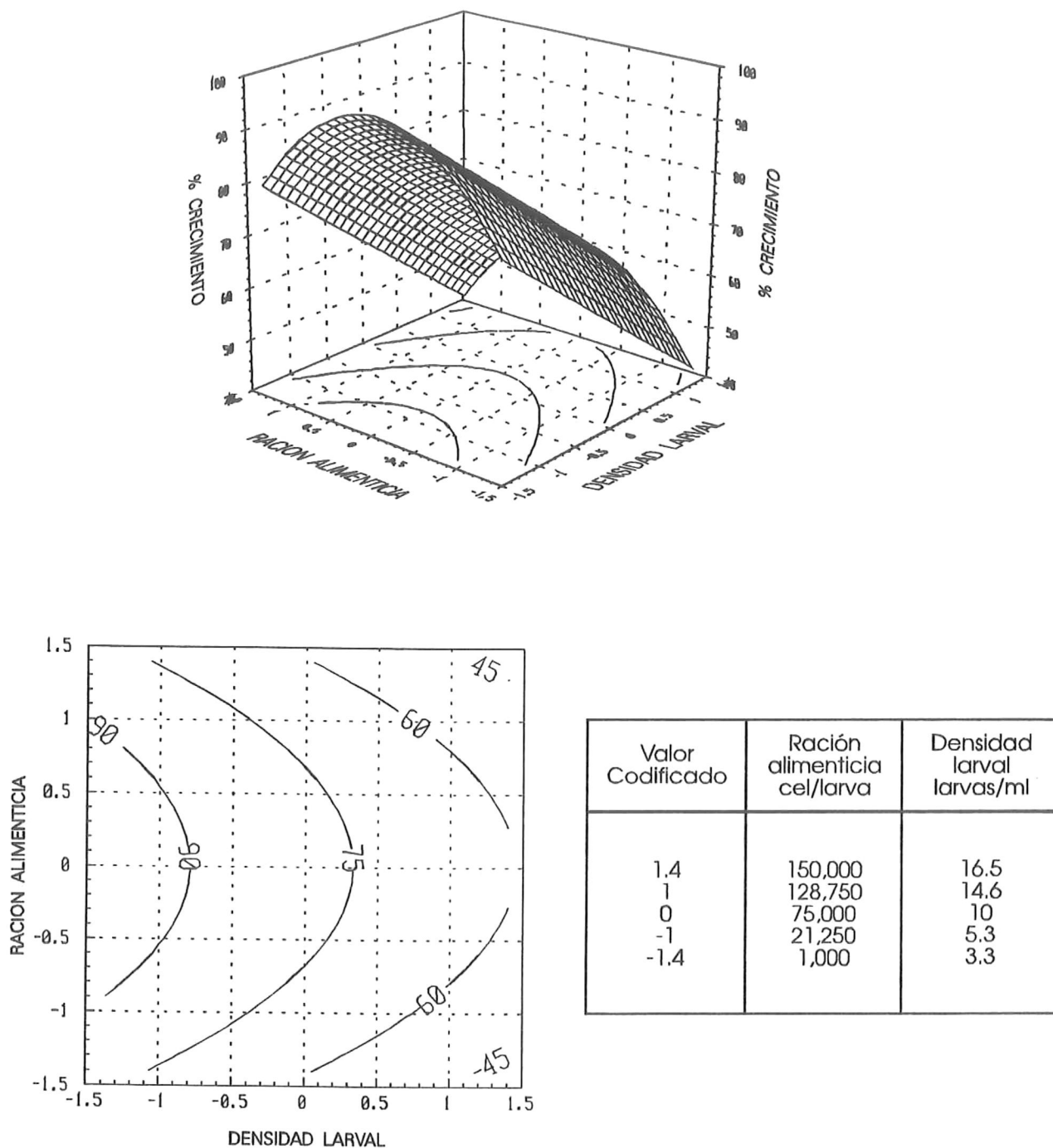


Figura 2.- Porcentaje de crecimiento obtenido de las larvas de *Chione cortezi*, para las posibles combinaciones de ración alimenticia y densidad larval en el quinto día.

densidad larval (3.3 larva/ml) y ración alimenticia intermedia (75,000 cel/larva). La respuesta mínima fué de 42% con alta densidad (16.5 larvas/ml) y con niveles extremos de ración alimenticia (1,000 y 150,000 cel/larva).

Respuesta al 8o día

En el análisis de varianza para la regresión del octavo día, se obtuvo un nivel de significancia de $\alpha=0.009$ por lo que la regresión se consideró significativa y tuvo un coeficiente de determinación múltiple $R^2=0.738$. Con base en el nivel de significancia de los términos de la regresión se incluyeron el término lineal de la densidad (D), el término cuadrático de la ración (RA2) y la constante (Tabla III); dichas variables describen la ecuación de respuesta como sigue:

$$Y=86.511 - 18.772(D) - 10.109(RA2)$$

Tabla III.- Valores para el 8o día de los coeficientes de regresión obtenidos para cada variable, sus niveles de significancia y el análisis de varianza. (<= coeficientes incluidos en la ecuación).

| Variable | Valor coeficiente | Error estandar | Coeficiente estandar | T | Nivel de signif. (a) |
|-----------------|----------------------|-------------------|-------------------------|--------|-------------------------|
| Constante | 86.511 | 4.416 | 0.000 | 19.592 | 0.000 < |
| Ración | 2.302 | 3.491 | 0.097 | 0.659 | 0.531 |
| Densidad | -18.772 | 3.491 | -0.794 | -5.377 | 0.001 < |
| Racion2 | -10.109 | 3.744 | -0.402 | -2.700 | 0.031 < |
| Densidad2 | -4.715 | 3.744 | -0.188 | -1.259 | 0.248 |
| Ración*Densidad | -5.697 | 4.937 | -0.171 | -1.154 | 0.286 |

| ANOVA | | | | | |
|-----------|--------------------|-----|---------------------|-------|-------------------------------|
| Fuente | Suma cuadrática | G/L | Media cuadrática | F | Nivel de significancia (a) |
| Regresión | 3783.095 | 5 | 756.619 | 7.761 | 0.009 |
| Residual | 682.401 | 7 | 97.486 | | |

Al igual que en el 5^o, la superficie de respuesta generada para el 8^o día (Fig. 3) muestra una cordillera ascendente originada por el término cuadrático de la ración alimenticia, la cual influye en el comportamiento de la respuesta y dá altos porcentajes (95-100%) a niveles intermedios de ración alimenticia, pero disminuye a un 45-55% hacia los valores extremos (1,000 y 150,000 cel/larva).

El efecto de la densidad larval alta (12.3-16.5 larvas/ml) origina las menores respuestas (45-55%) y mayores respuestas con densidad larval baja (3.3-7.7 larvas/ml). La máxima respuesta es de 100% con raciones de alimento bajas y medias (26,600-123,400 cel/larva), cultivadas a la menor densidad larval (3.3 larvas/ml), mientras que la mínima respuesta es de 40% con la mayor densidad larval (16.5 larvas/ml) y con valores extremos de ración alimenticia (1,000 y 150,000 cel/larva).

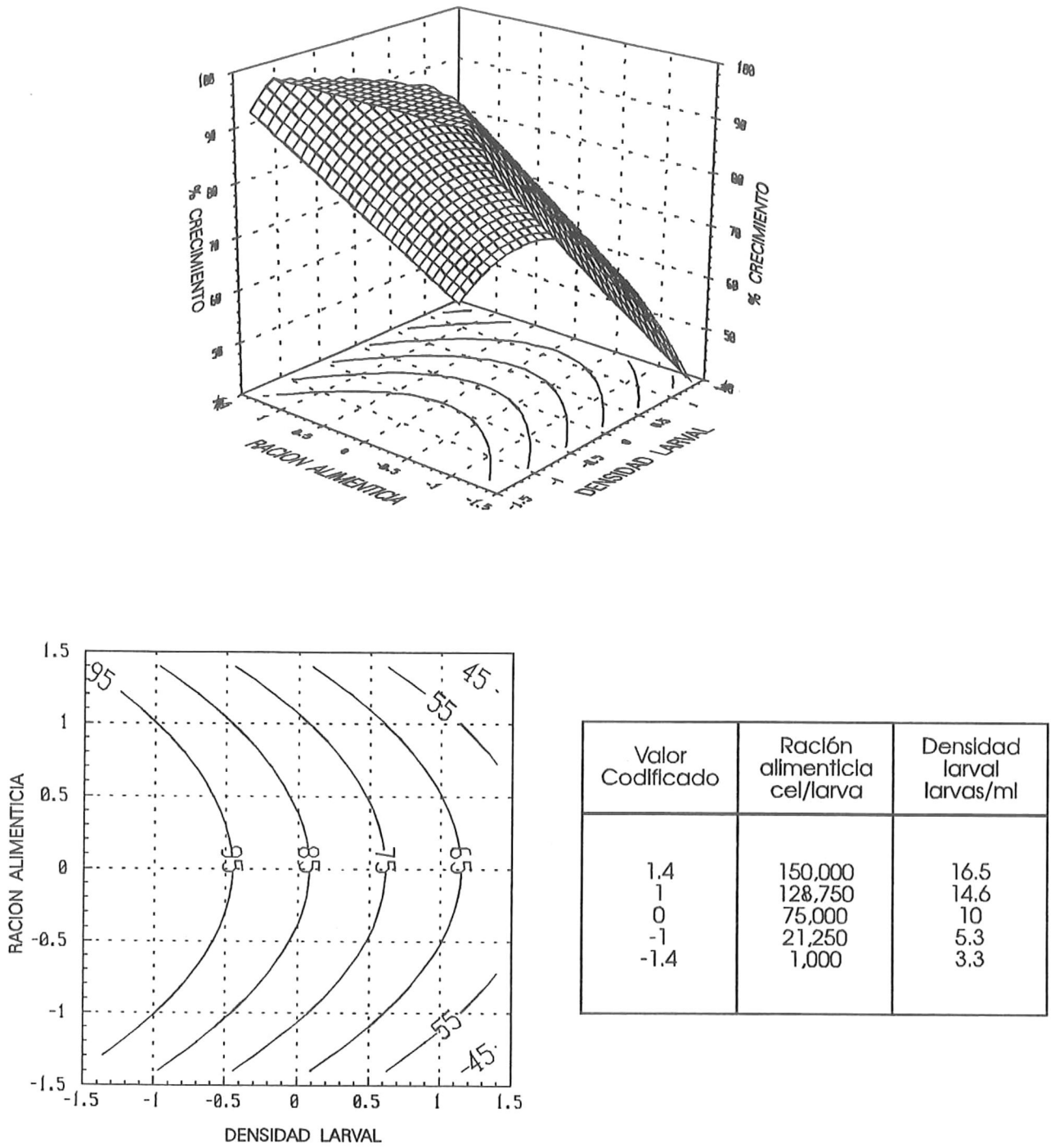


Figura 3.- Porcentaje de crecimiento obtenido de las larvas de *Chlone cortezi*, para las posibles combinaciones de ración alimenticia y densidad larval en el octavo día.

Respuesta al 14^o día

El análisis de varianza de la regresión para el crecimiento en éste día tuvo un nivel de significancia de $\alpha=0.025$ y un coeficiente de determinación múltiple $R^2=0.64$, se determinaron valores críticos de los términos de la regresión para describir la ecuación siendo el término constante y los términos lineal y cuadrático de la densidad larval (Tabla IV) sustituidos en el polinomio:

$$Y = 94.333 - 16.862(D) - 11.084(D^2)$$

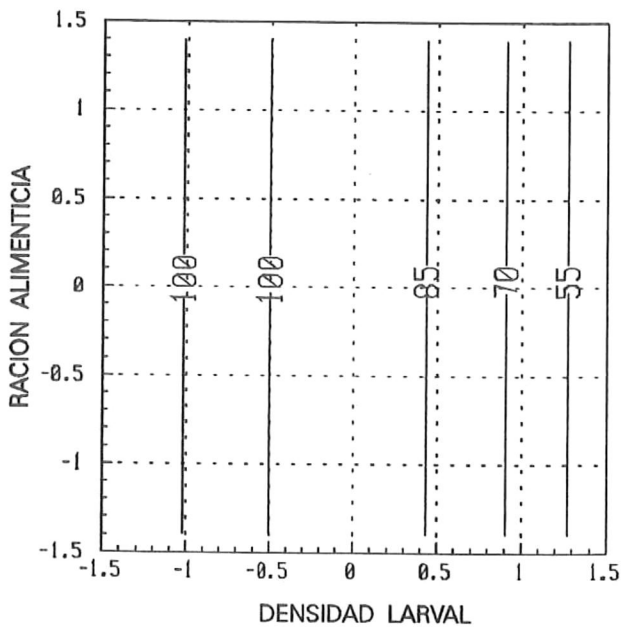
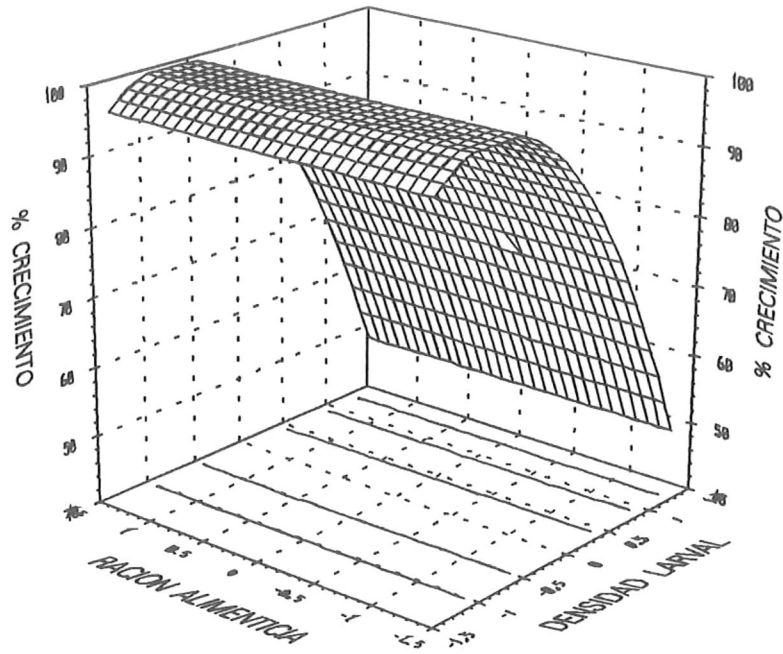
Tabla IV.- Valores para el 14^o día de los coeficientes de la regresión obtenidos para cada variable, sus valores críticos y el análisis de varianza (\leq coeficientes incluidos en la regresión).

| Variable | Valor coeficiente | Error estandar | Coeficiente estandar | T | Nivel de signif. (a) |
|-----------------|----------------------|-------------------|-------------------------|--------|-------------------------|
| Constante | 94.333 | 5.287 | 0.000 | 17.844 | 0.000 < |
| Ración | -4.124 | 4.180 | -0.171 | -0.987 | 0.357 |
| Densidad | -16.862 | 4.180 | -0.699 | -4.034 | 0.005 < |
| Racion2 | -6.496 | 4.483 | -0.253 | -1.449 | 0.191 |
| Densidad2 | -11.084 | 4.483 | -0.432 | -2.473 | 0.043 < |
| Ración*Densidad | -7.661 | 5.911 | -0.225 | -1.296 | 0.236 |

ANOVA

| Fuente | Suma cuadrática | G/L | Media cuadrática | F | Nivel de significancia (a) |
|-----------|--------------------|-----|---------------------|-------|-------------------------------|
| Regresión | 3679.882 | 5 | 735.976 | 5.267 | 0.025 |
| Residual | 978.158 | 7 | 139.737 | | |

La superficie de respuesta para este día (Fig. 4) muestra una cordillera estacionaria donde se observa que es la influencia de la variable de densidad larval la que determina la respuesta, que fué mayor (85-100%) con densidades bajas y medias (3.5-8.15 larvas/ml) y menor (55-70%) con densidades altas (9.7-11 larvas/ml). La variable de ración alimenticia no mostró efecto alguno sobre la respuesta. La máxima respuesta (100%) se dió a bajas densidades (3.5-5.4 larvas/ml) y la mínima (49%) a alta densidad (11 larvas/ml), ambas respuestas se dieron a todos los niveles de ración alimenticia.



| Valor Codificado | Ración alimenticia cel/larva | Densidad larval larvas/ml |
|------------------|------------------------------|---------------------------|
| 1.4 | 150,000 | 11 |
| 1 | 128,750 | 9.7 |
| 0 | 75,000 | 6.6 |
| -1 | 21,250 | 3.5 |
| -1.4 | 1,000 | 2.4 |

Figura 4.- Porcentaje de crecimiento obtenido de las larvas de *Chione cortezi*, para las posibles combinaciones de ración alimenticia y densidad larval en el día 14.

Respuesta al 17^o día

El análisis de varianza de la regresión del día 17 tuvo un nivel de significancia de $\alpha=0.0066$ y un coeficiente de determinación múltiple $R=0.764$. Se seleccionaron los términos significativos de la regresión; así, el término constante, los términos lineal y cuadrático de la densidad larval y la interacción de la densidad larval con la ración alimenticia (Tabla 8) y fueron sustituidos en el polinomio, obteniendo:

$$Y = 91.669 - 13.279(D) - 10.170(D^2) - 13.048(RA * D)$$

Tabla V.- Valores para el 17^o día de los coeficientes de la regresión obtenidos para cada variable, sus valores críticos y el análisis de varianza (\leq coeficientes incluidos en la regresión).

| Variable | Valor coeficiente | Error estandar | Coefficiente estandar | T | Nivel de signif. (a) |
|-----------------|----------------------|-------------------|--------------------------|--------|-------------------------|
| Constante | 91.669 | 3.793 | 0.000 | 24.168 | 0.000 < |
| Ración | -4.209 | 2.999 | -0.197 | -1.404 | 0.203 |
| Densidad | -13.279 | 2.999 | -0.621 | -4.428 | 0.003 < |
| Racion2 | -6.676 | 3.216 | -0.294 | -2.076 | 0.077 |
| Densidad2 | -10.170 | 3.216 | -0.447 | -3.162 | 0.016 < |
| Ración*Densidad | -13.048 | 4.241 | -0.431 | -3.077 | 0.018 < |

ANOVA

| Fuente | Suma cuadrática | G/L | Media cuadrática | F | Nivel de signif. (a) |
|-----------|--------------------|-----|---------------------|-------|-------------------------|
| Regresión | 3154.954 | 5 | 630.991 | 8.772 | 0.006 |
| Residual | 503.554 | 7 | 71.936 | | |

La superficie de respuesta generada por el modelo para el día 17 (Fig. 5) presenta una configuración del tipo punto silla. Se observa el efecto de la interacción de la densidad larval y la ración alimenticia. Así, se tiene que las mayores respuestas (100%) se dieron con bajas densidades de larvas (2.4-5.8 larvas/ml) y con raciones alimenticias altas (100,000-150,000 cel/larva), la respuesta disminuye a un 70% con baja densidad larval (2.4 cel/larva) y baja ración alimenticia (21,250 cel/larva). La respuesta continúa bajando hasta un 30% al combinar alta densidad larval (11 larvas/ml) con alta ración alimenticia (150,000 cel/larva).

La máxima respuesta fué de 100% con bajas densidades (2.4-5.8 larvas/ml) y altas raciones (100,000-150,000 cel/larva); la mínima respuesta fué de 27.57% con alta densidad (11 larvas/ml) y alta ración alimenticia (150,000 cel/larva).

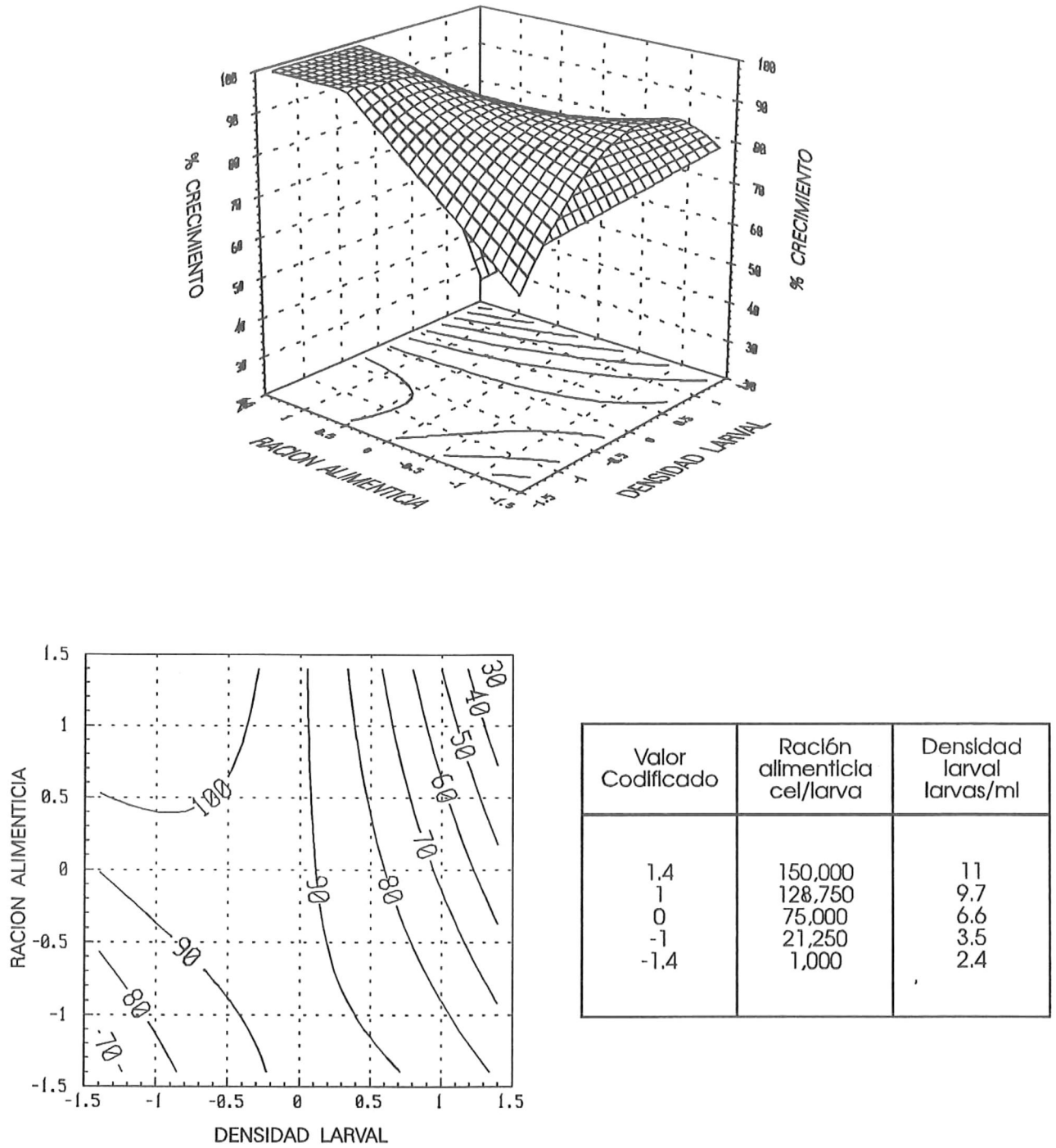


Figura 5.- Porcentaje de crecimiento obtenido de las larvas de *Chione cortezi*, para las posibles combinaciones de ración alimenticia y densidad larval en el día 17.

-Curvas de crecimiento.-

A partir del día 23 se comenzaron a observar organismos metamorfizados; en todas las unidades experimentales se registró entre el 0 y 30% de postlarvas, con excepción de la combinación de 16.5 larvas/ml y 75,000 cel/larva. Para el día 26 el porcentaje de postlarvas en el experimento fué entre el 50 y 86%.

Se observó una relación inversa de la densidad larval sobre el crecimiento de las larvas (Fig. 6); al comparar los tres diferentes niveles de densidad larval: extremo alto, medio, y extremo bajo (16.5, 10 y 3.3 larvas/ml, respectivamente), se encontró una marcada diferencia en las tallas, con la mayor densidad las larvas alcanzaron una talla de 203 μ m, con la densidad media se alcanzó una talla final de 322 μ m, mientras que la menor densidad (3.3 larvas/ml) causó la mayor talla de 367.5 μ m para el día 26.

Por otra parte, al analizar los valores, alto, medio y bajo de ración alimenticia (150,000; 75,000 y 1,000 cel/larva, respectivamente) (Fig. 7), se encontró que la ración alimenticia media produjo el mejor crecimiento, con una talla final de 290 μ m, en tanto que con las raciones extremas, las larvas alcanzaron una talla de 274 μ m, al día 23.

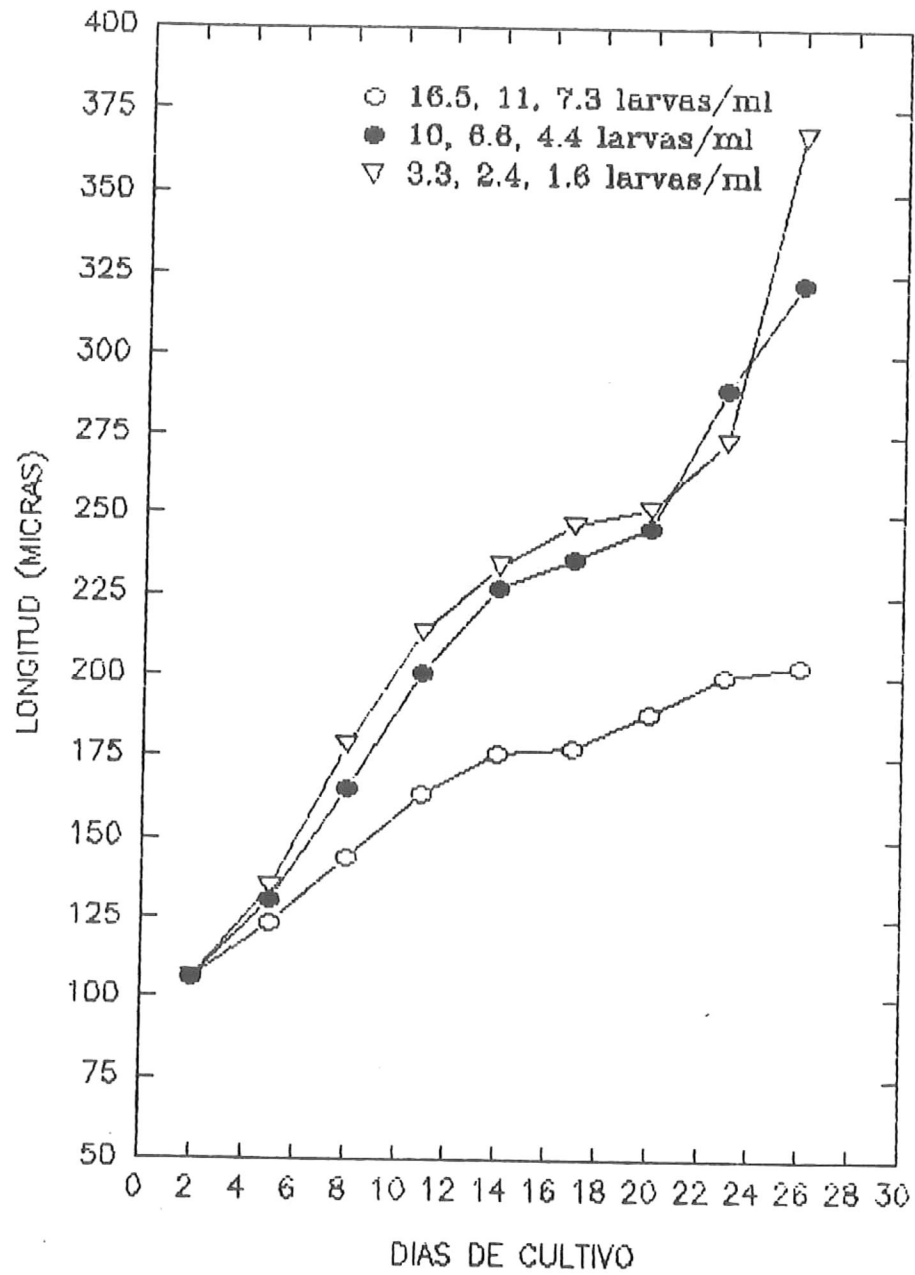


Fig. 6.- Efecto de la densidad larval, ajustada semanalmente, sobre el crecimiento de larvas de *Chione cortezi* alimentadas con una misma ración, de 75,000 cel/larva.

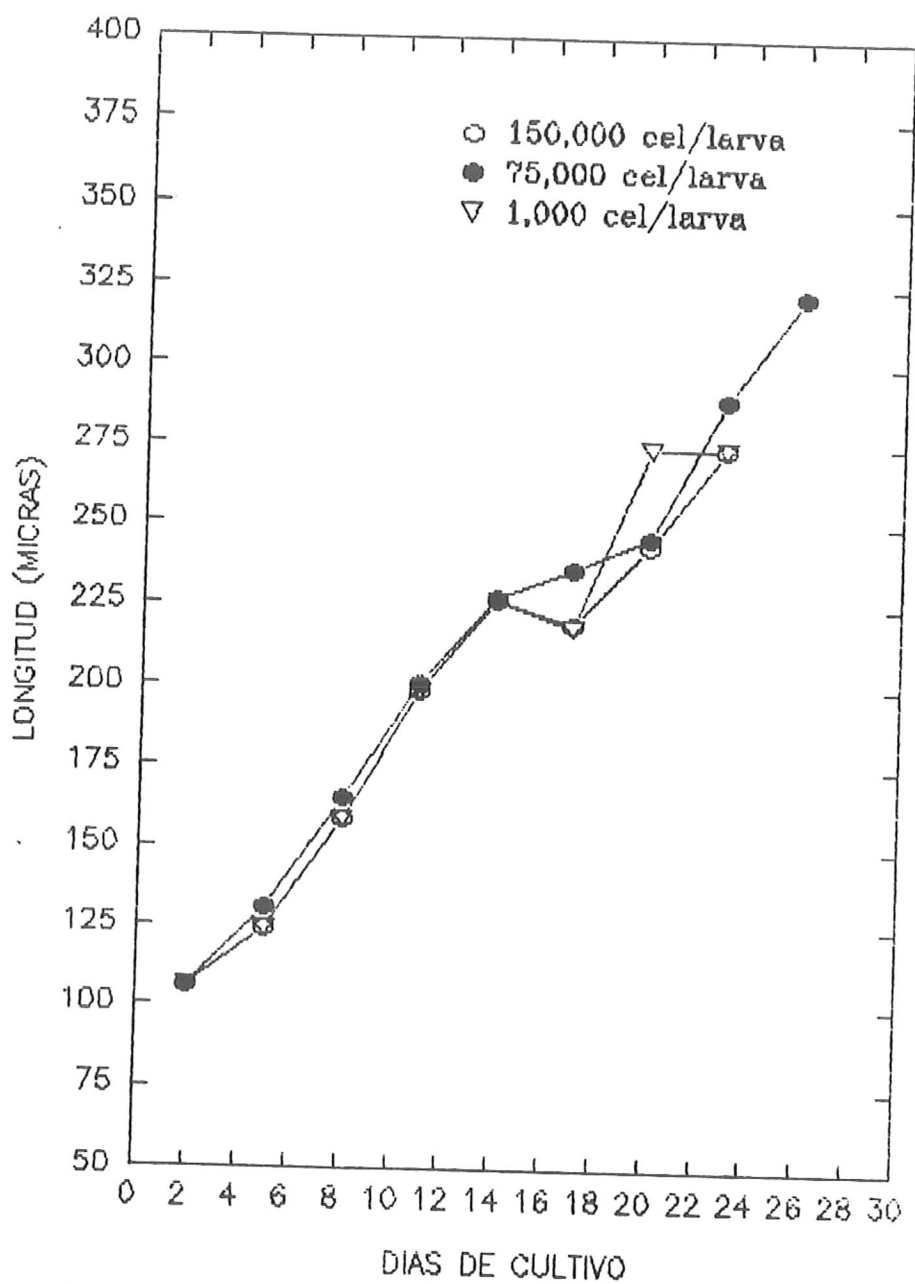


Fig. 7.- Efecto de la ración alimenticia sobre el crecimiento de larvas de Chione cortezi cultivadas a una misma densidad: 10 larvas por ml para la 1ª semana, 6.6 larvas/ml para la 2ª, y 4.4 larvas/ml para la 3ª.

La figura 8 muestra la diferencia en talla de las larvas alimentadas con niveles intermedios de ración (21,2150 y 128,750 cel/larv). Las larvas alimentadas con la primera ración alcanzaron la talla de 340-350 μm (postlarvas), indistintamente del nivel de densidad larval. En tanto que aquéllas larvas alimentadas con la segunda (128,750 cel/larva) crecieron hasta las 300 μm , a ambos niveles de densidad (5.3 y 16.5 larva/ml). Bajo éstas circunstancias, el efecto de la ración alimenticia es más notable que el ejercido por la densidad larval.

En general, se observa una tendencia a lograr tallas, en 26 días, de 300 a 350 μm con densidades bajas (3.3-5.3 larvas/ml) siempre que la ración alimenticia sea baja ó media (21,250-75,000 cel/larva). Por otra parte, el crecimiento mostró un importante incremento en la primera semana y continuó después del ajuste de densidad larval de la segunda semana, pero sólo hasta media semana, cuando se vió frenado, y volvió a incrementarse hacia la tercera semana, con el último ajuste de densidad.

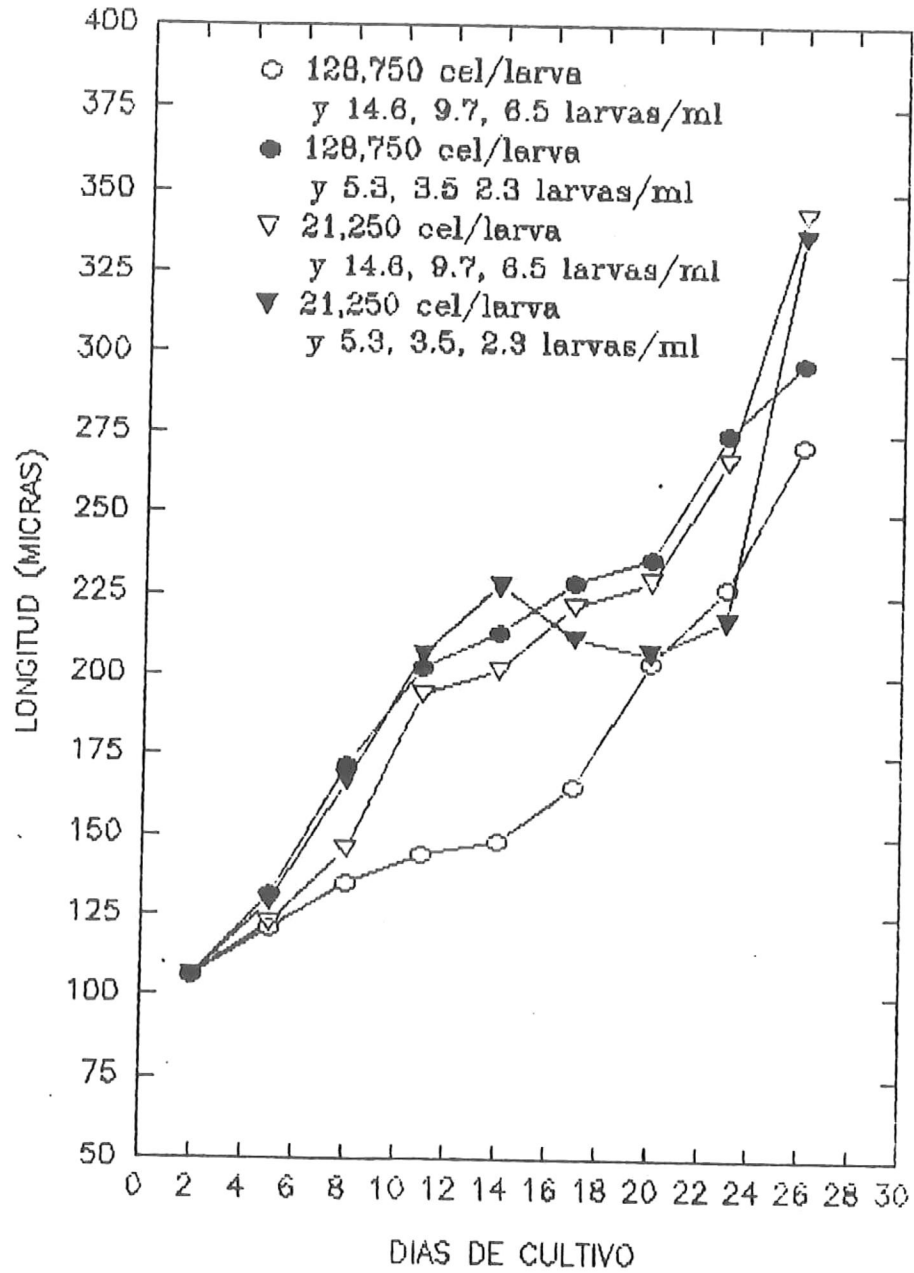


Fig. 8.- Efecto de la ración alimenticia y densidad larval sobre el crecimiento de larvas de Chione cortezi.

-Superficie de respuesta en sobrevivencia

El ajuste del modelo fué significativo para los datos correspondientes a los días 8 y 23 de sobrevivencia, analizados a continuación.

-Respuesta al 80 día

El análisis de varianza para la regresión de éste día tuvo un nivel de significancia de $\alpha=0.007$ y un coeficiente de determinación múltiple $R^2=0.759$. Los términos de la regresión que resultaron significativos (Tabla VI) fueron el término constante, el término cuadrático de la ración alimenticia y la interacción de la ración con la densidad larval, incluidos en la ecuación:

$$Y = 92.220 - 19.440(RA^2) + 15.730(RA*D)$$

Tabla VI.- Valores para el 80 día, de los coeficientes de la regresión obtenidos para cada variable, sus niveles significativos y el análisis de varianza (\leq coeficientes incluidos en la regresión).

| Variable | Valor coeficiente | Error estandar | Coficiente estandar | T | Nivel de signif. (α) |
|-----------------|----------------------|-------------------|------------------------|--------|----------------------------------|
| Constante | 92.220 | 4.329 | 0.000 | 21.303 | 0.000 < |
| Ración | 5.661 | 3.423 | 0.234 | 1.654 | 0.142 |
| Densidad | -3.883 | 3.423 | -0.161 | -1.135 | 0.294 |
| Racion2 | -19.440 | 3.671 | -0.756 | -5.296 | 0.001 < |
| Densidad2 | -0.714 | 3.671 | -0.028 | -0.195 | 0.851 |
| Ración*Densidad | 15.730 | 4.840 | -0.460 | 3.250 | 0.014 < |

ANOVA

| Fuente | Suma cuadrática | G/L | Media cuadrática | F | Valor crítico (α) |
|-----------|--------------------|-----|---------------------|-------|-------------------------------|
| Regresión | 4017.834 | 5 | 803.567 | 8.576 | 0.007 |
| Residual | 655.930 | 7 | 93.704 | | |

La superficie de respuesta generada por el polinomio para el día 8 (Fig. 9) corresponde a una configuración punto silla. Se observa que la mayor respuesta (95%) se produjo con densidades de larvas extremas (3.3 y 16.5 larvas/ml) con raciones alimenticias medias y altas (21,250 y 128,750 cel/larva, respectivamente). La tendencia a producir altas respuestas en sobrevivencia con densidad larval extrema alta (16.5 larvas/ml) difiere de la tendencia encontrada para las respuestas en crecimiento. La respuesta decreció a un 25% con la más baja densidad larval (3.3 larvas/ml) y la mayor ración alimenticia (150,000 cel/larva); disminuyó al mismo porcentaje (25%) con la mayor densidad larval (16.5 larvas/ml) y la mínima ración alimenticia (1,000 cel/larva).

La máxima respuesta obtenida fué de 98.43% con densidad larval de 16.5 y ración alimenticia de 107,250 cel/larva en un extremo y hacia el otro extremo el mismo porcentaje se dió a la mínima densidad de 1.6 larvas/ml y ración alimenticia baja de 53,500 cel/ml. La mínima respuesta también se presentó en dos extremos; 23.28% con la mínima densidad de 3.3 larvas/ml y ración alimenticia máxima de 150,000 cel/larva. Y 23.28% con la máxima densidad de 16.5 larvas/ml y una ración mínima de 1,000 cel/larva.

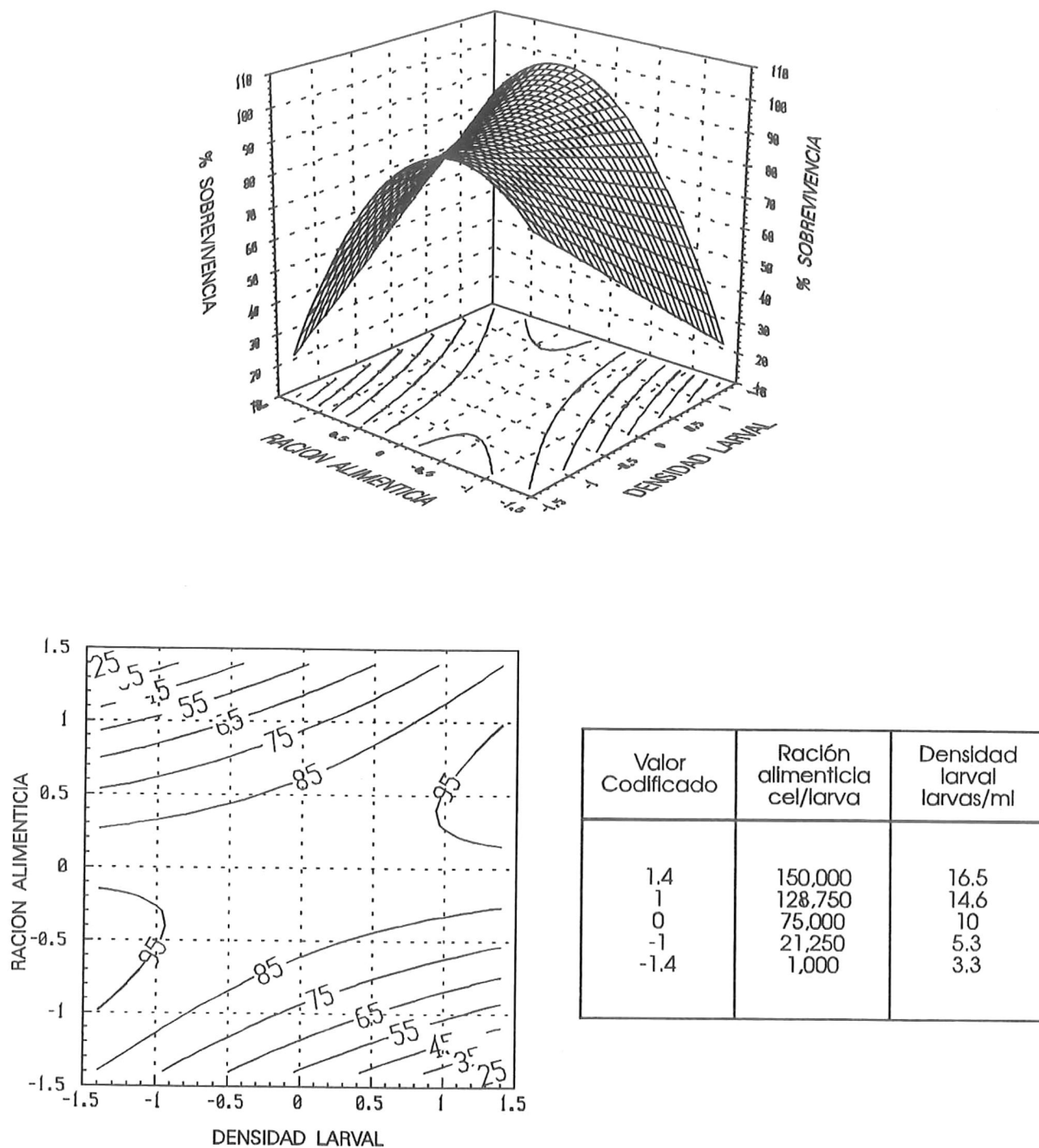


Figura 9.- Porcentaje de sobrevivencia obtenido de las larvas de *Chlone cortezi*, para las posibles combinaciones de ración alimenticia y densidad larval en el octavo día.

-Respuesta al 23° día

En el análisis de varianza se obtuvo el nivel de significancia de la regresión para el día 23, que fué de $\alpha=0.014$. Su coeficiente de determinación múltiple (R^2) fué de 0.699; se determinó la significancia de los términos de la regresión (Tabla VII), siendo los términos constante y densidad larval lineal los que generaron la ecuación:

$$Y = 11.764 - 17.642(D)$$

Tabla VII.-Valores para el 23o día de los coeficientes de la regresión obtenidos para cada variable, sus niveles de significativos y el análisis de varianza. (<= coeficientes incluidos en la ecuación).

| Variable | Valor coeficiente | Error estandar | Coeficiente estandar | T | Nivel de signif. (a) |
|-----------------|----------------------|-------------------|-------------------------|--------|-------------------------|
| Constante | 11.764 | 4.583 | 0.000 | 2.567 | 0.037 < |
| Ración | 3.388 | 3.624 | 0.148 | 0.935 | 0.381 |
| Densidad | -17.642 | 3.624 | -0.771 | -4.869 | 0.002 < |
| Racion2 | -3.216 | 3.886 | -0.132 | -0.827 | 0.435 |
| Densidad2 | 7.908 | 3.886 | 0.325 | 2.035 | 0.081 |
| Ración*Densidad | -8.730 | 5.124 | -0.270 | -1.704 | 0.132 |

ANOVA

| Fuente | Suma cuadrática | G/L | Media cuadrática | F | Nivel de significancia(a) |
|-----------|--------------------|-----|---------------------|-------|------------------------------|
| Regresión | 3448.648 | 5 | 689.730 | 6.567 | 0.014 |
| Residual | 735.180 | 7 | 105.026 | | |

La superficie de respuesta generada por el modelo para el día 23 muestra una cordillera estacionaria, (Fig 10). El término lineal de la densidad larval determina la

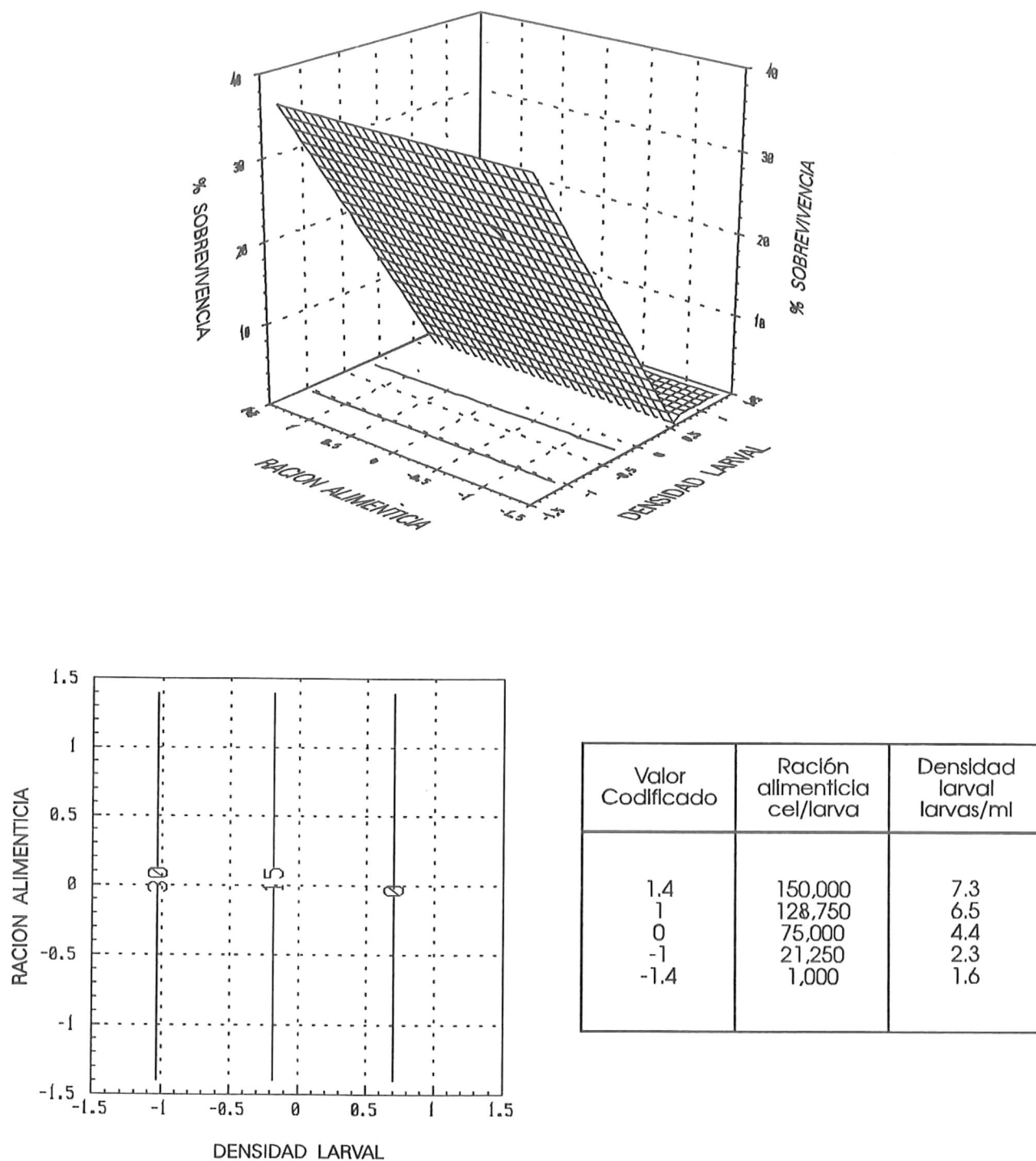


Figura 10.- Porcentaje de sobrevivencia obtenido de las larvas de *Chione cortezi*, para las posibles combinaciones de ración alimenticia y densidad larval en el día 23.

respuesta en sobrevivencia, la cual presenta su mayor valor (30%) con densidad larval baja (2.3 larvas/ml) y disminuye hasta 0% con densidad larval media de 5.87 org/ml. En tanto que la variable de ración alimenticia no ejerce efecto alguno sobre la respuesta en sobrevivencia. La máxima respuesta fué de 36.46% con una baja densidad de 1.6 larvas/ml, mientras que la mínima, 0% se dió a una densidad larval media de 5.87 ; ambas respuestas obtenidas a todos los niveles de ración alimenticia.

-Curvas de sobrevivencia

Al observar efecto de la densidad larval en la sobrevivencia de las larvas, se encontró que ésta variable por sí sola tuvo una influencia notable (Fig. 11). Las larvas cultivadas a la menor densidad larval (3.3 larvas/ml) presentaron un 52% de sobrevivencia al día 23, que fue el último muestreo posible. Con el nivel medio de densidad larval (10 larvas/ml), las larvas sobrevivieron un 6.9% al día 26; en tanto que a la densidad larval máxima sólo sobrevivieron un 0.1% al día 26, donde la ración alimenticia fué la misma para los tres casos.

En cuanto a la ración alimenticia, se apreció un efecto menos importante que el ejercido por la densidad larval (Fig. 12). Fué a la ración alimenticia media (75,000 cel/larva) que se obtuvo la mayor sobrevivencia, de 6.9% al día 26. Sin embargo, no hubo una diferencia notable respecto a la sobrevivencia obtenida a la ración de alimento mínima (1,000 cel/larva), con un 4.75% al día 26. En cambio sí se detectó una diferencia considerable en el número de larvas que sobrevivieron alimentadas con la mayor ración, donde sólo 1.3% al día 26.

De igual forma, se observó el efecto de ambas variables, cuando actuaron simultáneamente (Fig. 13). Se observa que la mayor sobrevivencia, 42.4% se obtuvo cuando

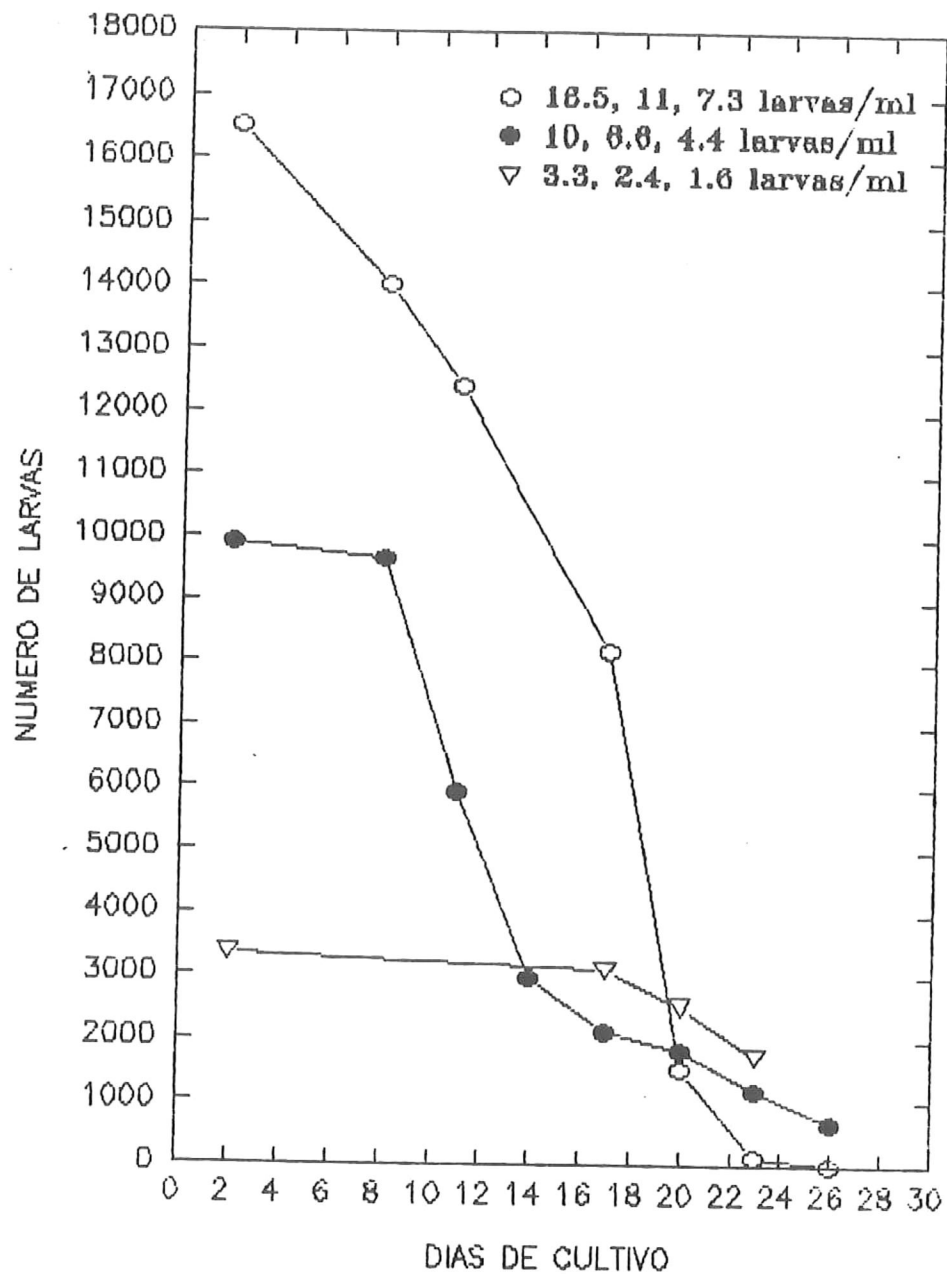


Fig. 11.-Efecto de la densidad larval, ajustada semanalmente, sobre la sobrevivencia de larvas de *Chione cortezi* alimentadas con una misma ración, 75,000 cel/larva.

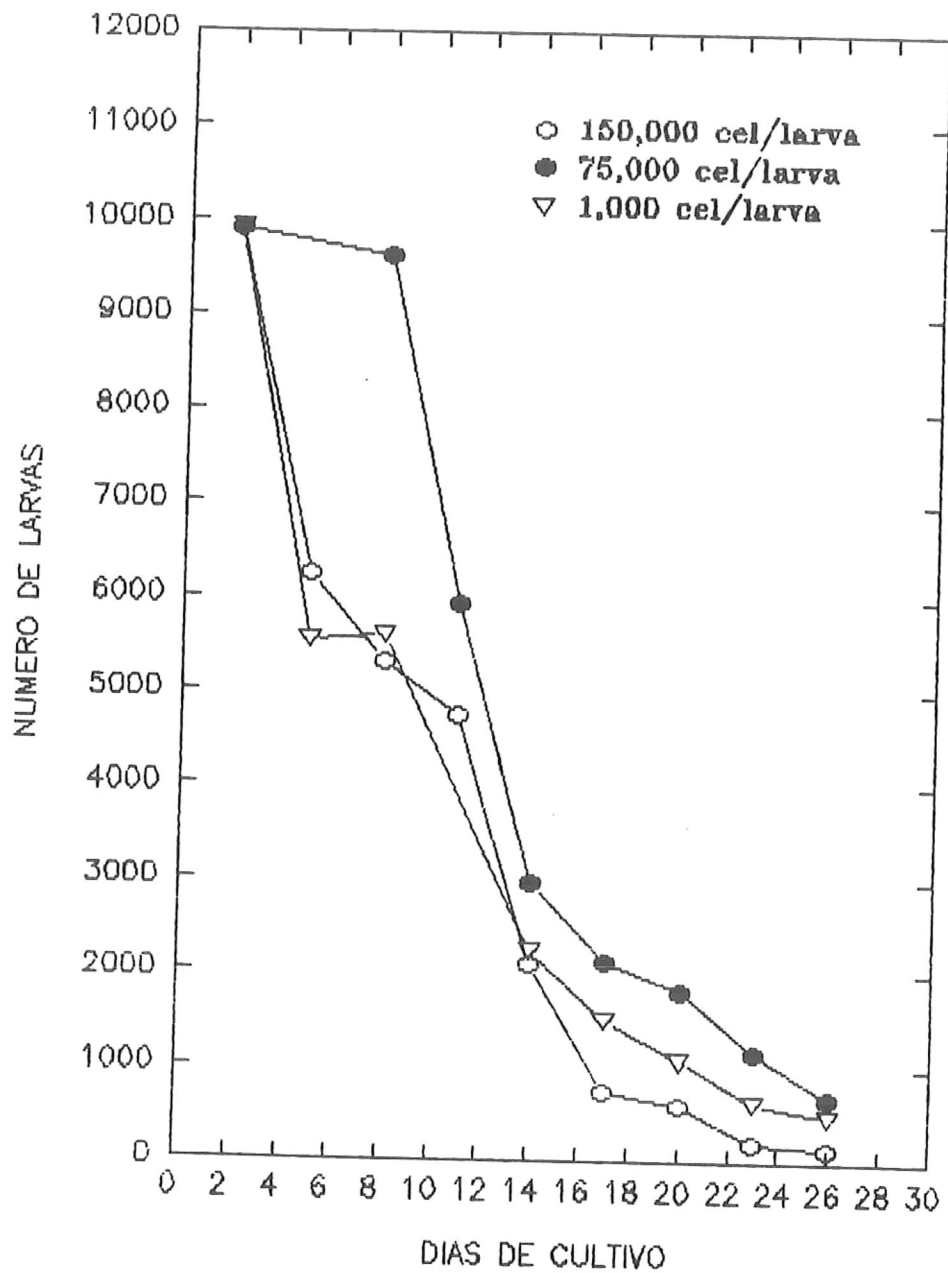


Fig. 12.-Efecto de la ración alimenticia sobre la sobrevivencia de larvas de Chione cortezi cultivadas a una misma densidad; 10 larvas/ml para la 1ª semana, 6.6 larvas/ml para la 2ª, y 4.4 larvas/ml para la 3ª.

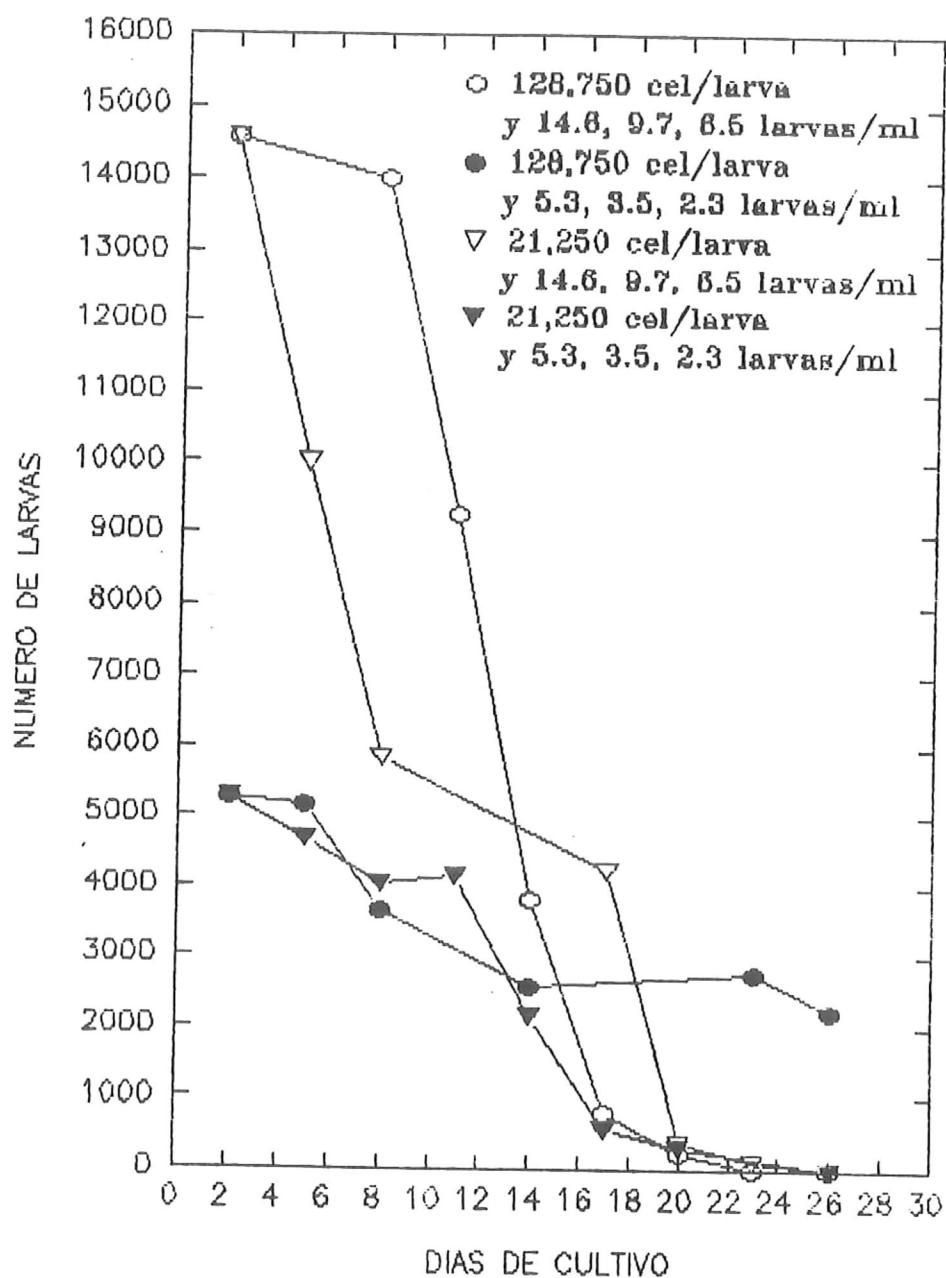


Fig. 13.-Efecto de la ración alimenticia y densidad larval sobre la sobrevivencia de larvas de Chione cortezi.

se suministraron altas raciones de alimento (128,750 cel/larva) con densidad larval baja (5.3 larvas/ml), en cambio, fué de sólo 0.03% suministrando la misma ración de alimento, pero a la más alta densidad larval (16.5 larvas/ml). La sobrevivencia se vió seriamente afectada y fué de sólo 0.06% cuando se dió baja ración de alimento (21,250 cel/larva) con densidad larval baja (5.3 larvas/ml) y de 0.01% con la alta densidad (14.6 larvas/ml), todas las sobrevivencias, obtenidas hasta el día 26. En éste caso, el efecto de la ración alimenticia fue el que determinó en mayor proporción la sobrevivencia de las larvas. Esto sugiere que para sobrevivir, es más importante la disponibilidad de alimento que los problemas ocasionados por una alta densidad de cultivo (espacio, incremento de metabolitos en el medio, etc.).

Con el análisis de éstas curvas se observó de manera general que las bajas densidades larvales (3.3-5.3 larvas/ml) así como las raciones alimenticias medias y altas (75,000 y 128,750 cel/larva) produjeron mejores resultados en sobrevivencia.

DISCUSION

Se analizó un rango de ración alimenticia, de 3.3 - 2475 cel/ul, amplio en comparación con otros trabajos, como el de Winter (1970), de 10-40 cel/ul para Modiolus modiolus y Arctica islandica, Riisgård (1988) con 3-60 cel/ul para larvas de Mercenaria mercenaria; y aunque algunos autores han experimentado con rangos mas amplios como Davis y Guillard (1957), con 25-400 cel/ul, Loosanof y Davis (1963) con 100-800 cel/ul, Tenore y Dunstan (1973), con 100-600 cel/ul y Gallagher (1988) quien varió entre 1-1,000 cel/ul para M. Mercenaria, no se reportan valores tan grandes como los utilizados en éste trabajo.

Respecto al rango de densidad larval usado en el presente estudio, de 3.3-16.5 larvas/ml, éste entra en el intervalo empleado y recomendado por la literatura (1-10 larvas/ml), anteriormente mencionada.

-Crecimiento

En el análisis de superficie de respuesta para los días 5 y 8 (Fig. 2 y 3) se encontró que la densidad larval tiene un efecto significativo y una relación inversamente proporcional con el crecimiento. Las mejores respuestas se dieron con densidades bajas (3.3-5.3 larvas/ml), mientras

que la respuesta en crecimiento fué baja con altas densidades de larvas (14.6-16.5 larvas/ml). Esta relación ha sido reportada por otros autores como Loosanof et al., (1955) y Loosanof y Davis, (1963) quienes atribuyen la disminución de crecimiento en cultivos sobrepoblados (26, 52 larvas/ml) principalmente a dos razones; las frecuentes colisiones entre las larvas, lo que les dificultan los mecanismos de alimentación como filtración e ingestión y al aumento en la acumulación de metabolitos.

En cuanto al efecto de la ración alimenticia sobre el crecimiento de las larvas en los primeros días (5 y 8), éste fué menos importante que el ejercido por la densidad larval. De cualquier forma, se observó que se produjeron mejores respuestas en crecimiento con raciones medias de alimento (21,250; 75,000 cel/larva) que con raciones extremas (1,000 y 150,000 cel/larva). Kirby-Smith y Barber (1974), encontraron un lento crecimiento de Argopecten irradians con bajas concentraciones de alimento, pero no encontraron un incremento significativo al suministrar concentraciones de alimento muy altas.

Tenore y Dunstan, (1973) y Tenore et al., (1973) afirman que la almeja Mercenaria mercenaria no está adaptada para una alimentación eficiente a altas concentraciones de alimento. Foster-Smith (1975) menciona

que la causa de ésto parece ser un mecanismo de regulación dominante en las almejas Venerideas, que generalmente reducen su tasa de bombeo y/o incrementan la producción de pseudoheces en respuesta al incremento en las concentraciones de partículas.

Por otra parte, el lento crecimiento observado al suministrar ración de alimento extrema baja (1,000 cel/larva) concuerda con lo establecido por Winter y Langton (1975) sobre el mejillón Mytilus edulis el cual al ser alimentado con concentración de alimento muy baja sufre un desgaste energético que no se utiliza para el crecimiento, debido a la filtración de grandes cantidades de agua para la obtención de alimento.

Para el 5o y 8o día , el rango de ración alimenticia que produjo las mejores respuestas en crecimiento fue de 80 a 700 cel/ul. Trabajos realizados sobre mitílidos, establecieron la concentración óptima en base a la producción de pseudoheces, la cual aparece a concentraciones mayores de 60 cel/ul y temperatura de 22°C (Winter, 1970). Sin embargo, aparentemente él no consideró la posibilidad de un mejor crecimiento con concentraciones mayores, a pesar de la presencia de pseudoheces. Por otra parte, los niveles de ración alimenticia óptimos encontrados en el presente estudio

tuvieron influencia del número de larvas en el cultivo, lo que también contribuye a ésa diferencia de resultados.

Respecto al día 14, se observó que la ración alimenticia aparentemente no influyó en la respuesta en crecimiento, que se comportó constante a todos los niveles de concentración (Fig. 4), si esto fuera verdad, sugeriría que las larvas de dos semanas de vida presentan mayor eficiencia de ingestión y filtración, lo que concuerda con lo establecido por Riisgård (1988) quien encontró que las larvas de Mercenaria mercenaria de 15 días asimilan las partículas de alimento con una eficiencia 50% mayor que las larvas de 3-8 días. Sin embargo, es probable que el efecto de ésta variable no haya sido significativo debido a que la eficiencia de alimentación desarrollada por las larvas, les permitió utilizar el alimento suministrado en un amplio rango de raciones, sin mostrar una influencia importante sobre el crecimiento.

La respuesta en crecimiento para el día 17 se vió evidentemente influenciada por la interacción de la densidad larval y la ración alimenticia (Fig. 5), se obtuvieron respuestas óptimas con concentraciones de alimento de 100,000-150,000 cel/larva, más altas que las de días anteriores, lo que podría atribuirse a que los

requerimientos cuantitativos de las larvas se incrementan con la edad (Castagna y Kraeuter, 1977).

Se registró baja respuesta en crecimiento con bajas raciones alimenticias (1,000 y 21,250 cel/larva), probablemente debido al desgaste energético por el bombeo y filtración que dificulta que el organismo utilice su energía en crecer (Winter y Langton, 1975). Sin embargo, la respuesta mínima se dió con la ración alimenticia extrema alta (150,000 cel/larva) y a la mayor densidad larval (16.5 larva/ml) lo que sugiere que la alta concentración tanto de células como de larvas ocasionó el aumento en la concentración de metabolitos en el medio, que afectó el crecimiento. El bajo porcentaje de respuesta en crecimiento obtenido sugiere que el efecto de la sobrepoblación se vuelve más crítico con la edad como los indica Kraeuter et al., 1982.

Al analizar las curvas de crecimiento (Fig. 6, 7 y 8) se encontró que las bajas densidades de larvas (3.5-5.3 larvas/ml) produjeron al día 26 postlarvas con tallas mayores (300-350 μm), mientras que a densidades altas (14.6, 16.5 larvas/ml) las larvas lograron tallas de sólo 200-280 μm , es decir, aproximadamente 100 μm menos que las primeras. Por otro lado, la diferencia entre la talla final de las postlarvas alimentadas con ración media y baja, de

330-370 μm y aquéllas alimentadas con ración alta, de 270-290 μm , fué de aproximadamente 60 μm .

La tendencia general observada en las gráficas de superficie de respuesta y en las curvas de crecimiento indica que éste estuvo influenciado principalmente por la densidad larval durante todas las etapas del desarrollo.

En tanto que la ración alimenticia influyó significativamente en el crecimiento de la primera semana de desarrollo cuando las larvas todavía son ineficientes en la ingestión de alimento. En la segunda semana, el efecto de la ración alimenticia no muestra influencia importante, posiblemente debido al crecimiento poblacional experimentado por las microalgas en ése lapso de tiempo entre cada alimentación (48 hrs), lo que cambiaría las condiciones experimentales de tal manera que dificultara observar el efecto de la ración alimenticia. En la tercera semana y hasta el final del desarrollo larval, vuelve a tomar importancia el efecto de la ración alimenticia, suministrada a poblaciones de densidad larval baja, por la disponibilidad de alimento. Y a altas densidades de larvas, por el aporte de desechos metabólicos al cultivo, que sumados a los desechos provenientes de las microalgas mismas influyen de manera tangible en el crecimiento.

En base a ésto, se observa que los recambios de agua realizados cada tercer día no resultaron eficientes para la última etapa del desarrollo, por lo que se haría necesario que a partir del día 15 o 17 de desarrollo, dichos recambios se realizaran con mayor frecuencia.

-Sobrevivencia

La respuesta en sobrevivencia para el día 8 fué determinada por la interacción de ración alimenticia y densidad larval donde la máxima respuesta (95%) se dió con la mayor densidad larval (16.5 larvas/ml) y raciones alimenticias altas (100,000-150,000 cel/larva). Este comportamiento probablemente se deba a que durante la primera semana, las larvas dependen en mayor grado de la disponibilidad de alimento al ser poco eficientes para alimentarse (Riisgård,1988), y el efecto de la concentración de metabolitos provenientes de larvas de ésta edad no alcanza un nivel en el que represente una limitante de sobrevivencia.

Sin embargo las larvas produjeron bajas respuestas con la más baja ración alimenticia (1,000 cel/larva) y a todos los niveles de densidad larval, probablemente debido a un efecto de inanición a raciones alimenticias extremas bajas (Loosanof y Davis, 1963; Winter, 1970). La

combinación de las dos variables, cuando se establecieron condiciones extremas opuestas afectó negativamente a la sobrevivencia de las larvas debido al incremento en la tasa de biodeposición causadas por las altas concentraciones de larvas y microalgas como lo sugieren Tenore y Dunstan (1973).

La respuesta en sobrevivencia para el día 23 fué determinada principalmente por el efecto negativo de la densidad larval. Las mayores respuestas fueron de sólo 40%, y a pesar de que la ración alimenticia aparentemente no influyó en la respuesta de éste día, se sabe que las larvas aumentan sus necesidades cuantitativas de alimento con el tiempo (Castagna y Kraeuter, 1977). Por lo tanto, se puede pensar que los requerimientos de espacio y alimento, así como la concentración de metabolitos se incrementaron significativamente al día 23, de manera que resultaron factores limitantes de la sobrevivencia.

La tendencia general observada en las gráficas de superficies de respuesta para la sobrevivencia, es que ésta se vió determinada principalmente por la disponibilidad de alimento y los metabolitos producidos en altas concentraciones tanto de larvas como de microalgas, a lo largo del cultivo.

A pesar de que las superficies de respuesta no muestran la importancia de la ración alimenticia, las curvas de sobrevivencia (Fig. 11, 12, y 13) destacaron que ambas variables fueron importantes para la sobrevivencia.

El rango de densidad larval que produjo las mejores respuestas en crecimiento y sobrevivencia se estableció en 3.3-5.3 larvas/ml, con sus correspondientes ajustes semanales. Este rango concuerda con el recomendado por otros autores como Loosanof y Davis (1963), Breese y Malouf (1975) y Manzi (1985), que establecen el rango entre 1-10 larvas/ml.

Por su parte, el rango de ración alimenticia se estableció entre 75,000-128,750 cel/larva, para la sobrevivencia, y en 75,000 cel/larva, para el crecimiento. No obstante, esa diferencia no constituye un problema, ya que se puede promediar el rango y establecer la ración en 75,000 cel/larva (247-398 cel/ul), y de esta forma también se puede optimizar el recurso alimento. Esta ración resulta alta comparándola con rango de 10-100 cel/ul, propuesto por otros autores (Loosanof y Davis, 1963; Gallagher, 1988; Riisgård, 1988).

Es probable que la causa de la discordancia en las condiciones óptimas encontradas en éste trabajo, con los rangos óptimos encontrados por los autores antes

mencionados se deba en parte al hecho de que las comparaciones hechas, fueron en su mayoría, con la almeja dura Mercenaria mercenaria, que a pesar de pertenecer a la misma familia que Chione cortezi, presenta características fisiológicas y ecológicas diferentes. Además, las condiciones experimentales son específicas para cada estudio. Riisgård (1988), por ejemplo, trabaja con temperatura de 28.5 °C, mientras que el presente trabajo se realizó a 20°C, por lo que es de suponer que los efectos de la misma sean distintos en ambos casos. Quizá el que se hayan utilizado diferentes especies de microalgas, con distinto valor nutricional también haya contribuido a ésta discordancia. Por otra parte, los trabajos anteriores se basaron en análisis unifactoriales en tanto que el presente estudio consideró el efecto de dos variables a la vez, por lo que dificulta su comparación ya que los primeros no establecieron condiciones de cultivo específicas para cada etapa del desarrollo.

En base al análisis realizado, se puede afirmar que a pesar de las múltiples ventajas que ofrece el uso de experimentos multifactoriales, hay que tomar en cuenta que éste tipo de modelos, tienden a ser sensibles al manejo de las unidades experimentales. En el presente estudio se observó que las mayores dificultades se dieron en el

muestreo ya que debido al volumen de cultivo utilizado la homogeneización de la unidad experimental para asegurar una muestra aleatoria fue problemática.

Por otra parte, hay que considerar la naturaleza de las variables experimentadas, no son estáticas ya que involucran seres vivos que están en continua actividad, lo que determina que los ajustes al modelo no siempre fueran buenos y por ende, que los análisis para algunos días no resultaran significativos. Por lo tanto, éstos resultados deben ser considerados como preliminares y sujetos a comprobación.

Se determinaron requerimientos fisiológicos diferentes para cada etapa de desarrollo como sucede en otros bivalvos (Anguiano-Beltrán, 1989), sin embargo, tratando de establecer una rutina de trabajo para el cultivo de larvas de Chione cortezi en base a los resultados obtenidos, se pueden determinar condiciones de cultivo semanales, así, una población de con densidad de 5.3 larvas/ml puede ser alimentada con 75,000 cel/larva (equivalente a 397 cel/ul), dando buenos porcentajes de crecimiento y sobrevivencia durante la primera y segunda semanas, mientras que para las condiciones de la tercera semana solamente se cambiaría la densidad a 1.6 larvas/ml con la misma ración alimenticia.

La importancia de analizar simultáneamente el efecto de más de una variable sobre la fisiología de los organismos marinos radica en que al habitar en un medio tan variante como es el océano, se encuentran sometidos al efecto de una gran variedad de parámetros que actúan en forma simultánea (Alderdice, 1972; Cain, 1973; Anguiano-Beltrán, 1989; Mc Anally-Salas *et al.*, 1989).

Así, en la medida que se genere información más específica sobre las respuestas fisiológicas de los bivalvos, se tendrá un mayor control de los sistemas de cultivo, asegurando un mayor éxito, sin olvidar la importancia de optimizar tiempo y recursos (en éste caso, alimento y densidad de larvas, que resulta de especial importancia y utilidad cuando se realizan cultivos a nivel comercial.

CONCLUSIONES

- La densidad larval afectó significativamente el crecimiento y sobrevivencia de las larvas.

- Las altas densidades de larvas presentaron un efecto negativo sobre el crecimiento y sobrevivencia.

- La ración alimenticia influyó en mayor proporción en la sobrevivencia que en el crecimiento de las larvas.

- El resultado de combinar bajas densidades de larvas (3.3- 5.3 larvas/ml) con raciones alimenticias medias (75,000 cel/larva, equivalente a 247-398 cel/ul), produjo las mejores respuestas.

BIBLIOGRAFIA:

- ALDERDICE, D.F., 1972. Factor combinations responses of marine poiquilotherms to enviromental factors acting in concert. In: Marine Ecology, Vol. 1. Part. 3. pp.1659-1722. O. Kinne (Ed.) London. Wiley Interscience.
- AMEMIYA, I., 1928. Ecological studies of Japanese oysters with special reference to the salinity of their habitats. J. Imp. Coll. Agric. Univ. Tokyo. 9: 334-382. (1928)[Reviewed by H.P. Sherewood.J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer 3:407-409].
- ANGUIANO-BELTRAN, C., 1989. Efecto de la temperatura, salinidad y concentración de alimento sobre el desarrollo larval de Mytilus californianus. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada, B.C., México. UABC. 95 pp.
- BAQUEIRO, E y J. MASSO., 1988. Variaciones poblacionales y reproducción de dos poblaciones de Chione undatella (Sowerby, 1835), bajo diferentes regímenes de pesca en la Bahía de La Paz, B.C.S., México. Ciencia Pesquera. Inst. Nal. Pesca. SEPESCA. 6:51-67 (1988).
- BAQUEIRO, E.; J. MASSO y GUAJARDO, H., 1982. Distribución y abundancia de moluscos de importancia comercial en Baja California Sur. Inst. Nal. Pesca. Serie Divulgación No.11, 32 pp. (1982).
- BAYNE, B.L., 1965. Growth and delay of metamorphosis of the larvae of Mytilus edulis(L.). Ophelia.2:1-47 (1965).
- BAYNE, B.L.; C.J. BAYNE; T.C. CAREFOOT & R.J. THOMPSON, 1976. The physiological ecology of Mytilus californianus. Conrad.1. Metabolism and energy balance. Oecologia.22:211-228. (1976)
- BAYNE, B.L., 1983. Physiological ecology of marine molluscan larvae. In: N.H. Verdonk ; Y.A.M., Vanden Biggelaar and A.S. Tompa (Eds.) The Mollusca. Vol. 3, Academic Press., New York. 352pp.
- BELDING, D.L., 1912. The quahaug fishery of Massachusetts. Marine Fisheries Series. No.2. Mass. Div. Mar. Fish., Dept. Nat. Res., Boston, Massachusetts. 41pp.

- BOX, G.E.P. & K.B. WILSON, 1951. On the experiment attainment of optimum conditions. *Jl. R. Statistic Soc. B.* 13:1-45 (1951).
- BREESE, W.P. y R.E. MALOUF, 1975. Hatchery Manual for the Pacific Oyster. Oregon State University. Sea Grant College Program. Pub. No ORESU-75-002. Agricultural Experiment Station. Special Report No 443.
- BRENKO, M. Hrs. & A. CALABRESE, 1969. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel Mytilus edulis. *Mar. Biol.* 4:224-226. (1969).
- BRICELJ, V.M., 1984. Effect of suspended sediments on the feeding physiology and growth of the hard clam Mercenaria mercenaria (L.). Ph. D. Thesis. Marine Sciences Research Center State Univ. of N.Y. Proc. Nat. Shellfish Assoc. 70(2):216-229.
- BRUCE, J.R., H. KNIGHT y M.W. PARKE, 1939. The rearing of oyster larvae on an algal diet. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 24:337-374.
- CAIN, T.D., 1973. The combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the clam Rangia cuneata. *Mar. Biol.* 21:1-6. (1973).
- CALABRESE, A. & H.C. DAVIS, 1970. Tolerances and requirements of embryos and larvae of bivalve mollusks. *Helgolander Wiss. Meeresunters.* 20:553-564. (1970).
- CARRIKER, M.R., 1961. Interaction of functional morphology, behavior and autoecology in early stages of the bivalve Mercenaria mercenaria. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society.* 77:168-241.
- CASTAGNA, M. & J.N. KREUTER, 1977. Mercenaria culture using stone aggregate for predator protection. *Proc. Nat. Shellfish Assn.* 67:1-6 (1977).
- COLE, H.A., 1937. Experiments in the breeding of oysters Ostrea edulis in tanks with special reference to the food of the larva and spat. *Fish. Invest., London.* Series 2. 15:1-28.
- D'ASARO, C.N., 1967. The morphology of larval and postlarval of Chione cancellata(L.) (Eulamellibranchia: Veneridae) reared in the laboratory. *Bull. Mar. Sci.* 17(4):949-972. (1967).

- DASSOW, J.A y M.A., STEINBERG, 1973. The technological basis for development of aquaculture to produce low-cost food fish. *Mar. Fish. Rev.* 35:6-13.
- DAVIDS, C., 1964. The influence of suspensions of microorganism of different concentrations on the pumping and retention of food by the mussel Mytilus edulis. *Neth. J. Sea Res.* 2:233-249. (1964).
- DAVIS, H.C., 1953. On food and feeding of larvae of the American oyster Crassostrea virginica. *Biol. Bull.* 104:334- 350 (1953).
- _____, 1969. Shellfish hatcheries-present and future. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 98(4):743-750.
- DAVIS, H.C. y A. CALABRESE, 1964. Combined effects of temperature and salinity on development of eggs and growth of larvae of Mercenaria mercenaria and Crassostrea virginica. *U.S. Fish Wildlf. Serv. Bull.* 63:643-655.
- DAVIS, H.C. y R.R. GUILLARD, 1957. Relative value of ten genera of microorganisms as food for oyster and clam larvae. *Fish. Bull.* 126:293-304.
- DOBBINSON, S.J., M.F. BARKER y J.B. JILLET, 1989. Experimental shore level transplanted of the New Zealand cockle Chione stutchburyi. *J. Shellfish Res.* 8:197-212.
- EPIFANIO, C.E., 1975. Culture of bivalve mollusks in recirculating systems : nutritional requirements. *Proceedings of the 1st. Int. Conference on Aquaculture Nutrition.* October, 1975.
- ESTRADA-REYES, M.V., 1991. Desarrollo embrionario y efecto de la temperatura en el desarrollo larval de la almeja Chione cortezi (Carpenter, 1864). Tesis-Licenciatura, Facultad Ciencias Marinas, UABC, México. 48 pp.
- FIGUEROA-LOPEZ, J.A., 1988. Aplicación de un método de cultivo para la obtención de larvas y juveniles de Chione gnidia (Broderip & Sowerby, 1829) bajo condiciones de laboratorio. *Univ. Aut. de Guadalajara.* 42pp.

- FOSTER-SMITH, R.L., 1975. The effect of concentration of suspension on the filtration rates and pseudofaecal production for Mytilus edulis L., Cerastoderma edule (L.) and Venerupis pullastra. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 17:1-22.
- GALLAGER, S.M., 1988. Visual observations of particle manipulation during feeding in larvae of bivalve molluscs. Bull. Mar. Sci. 1988.
- GARCIA DOMINGUEZ, F., 1990. Ciclo reproductor de la almeja roñosa Chione californiensis (Broderip, 1835) (Veneridae) en la Ensenada de La Paz, B.C.S., México. Memorias IV reunión Nacional de Malacología y Conquiliología. Sociedad Mexicana de Malacología, A.C.- UABCS, 1990.
- GIBBONS M.C. y M. CASTAGNA, 1985. Responses of hard clam Mercenaria mercenaria (L.) to induction of spawning by serotonin. Journal of Shellfish Research, 5(2):65-67.
- GOODRICH, D.B., L.J. CALBO, A, PERLMUTTER y R.B. WAINWRIGHT, 1968. New engineering approaches for the production of Connecticut oysters. I,II. American Cyanamid Co. Central Res.Div., Stamford, Connecticut.
- HOLGUIN, Q.D., 1976. Catálogo de Especies Marinas de Importancia Comercial en Baja California Sur. SIC, Subsecretaría Pesca México. Inst. Nal. de Pesca. 177 PP.
- HURLBERT, S.H., 1978. The measurement of niche overlap and some relatives. Ecology, 59(1):67-77.
- KEEN, A.M., 1971. Sea Shells of Tropical West America. Marine Mollusks from Baja California Mexico to Peru. Second ed. Stanford Press, U.S.A. 1064pp.
- KRAEUTER, J.N., M. CASTAGNA y R. Van DESSEL, 1982. Egg size and larval survival of Mercenaria mercenaria (L.) and Argopecten irradians (L.) . J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 56:3-8.
- La BARBERA, M. y P. CHANLEY, 1970. Larval development of Chione cancellata (L.) (Veneridae: Bivalvia) Chesapeake Sci. 11:42-49 (1970).
- LOOSANOF, V.L., H.C., DAVIS, 1950. Conditioning of Venus mercenaria for spawning in winter and breeding its larvae in the laboratory. Biol. Bull. 98:60-65.

- _____, 1963. Rearing of Bivalve Molluscs. In: F. S. Russel (Ed) . Advances in Marine Biology. 1:1-136.
- LOOSANOF, V.L., H.C., DAVIS y P. CHANLEY, 1953a. Behavior of clam larvae in different concentrations of food organisms. Anat. Rec. 117:586 (Abstract)
- _____, 1953b. Effect of overcrowding on rate of growth of clam larvae. Anat. Rec. 117:645 (Abstract).
- _____, 1955. Food requirements of some bivalves larvae.
- _____, 1966. Dimensions and shapes of larvae of some marine bivalve mollusks. Malacologia 4:351-435.
- LOOSANOF, V.L., y R.R., MARAK, 1951. Culturing lamellibranch larvae. Anat. Rec. 111-129-130.
- LOUGH, R.G., 1975. A reevaluation of the combined effect of temperature and salinity on survival and growth of bivalve larvae using response surface techniques. Fish. Bull. 73:86-94. (1975).
- LOUGH, R.G. & J.J. GONOR, 1971. Early embryonic stages of Adula californiensis (Pelecypoda: Mytilidae) and the effect of temperature and salinity on developmental rate. Mar. Biol. 8:118-125 (1971)
- _____, 1973. A response-surface approach to the combined effects of temperature and salinity on the larval development of Adula californiensis .I. Survival and growth of three and fifteen-day old larvae. Marine Biology 22:214-250.
- MALOUF, R.E. & M. BRICELJ, 1989. Comparative biology of clams: enviromental tolerances, feeding and growth. In: Clam Mariculture in North America. Manzi, J.J. & M. Castagna (Eds). Developments in Aquaculture and Fisheries Sciences. Vol. 19:23-74. Elsevier Science Publ. 461pp.
- MANZI, J.J., 1985. Clam aquaculture. In: J. Huner and E. Brown (Eds), Crustacean and Mollusk Aquaculture in the United States. AVI Publ., pp. 275-310.
- McANALLY, L., H., CAVAZOS LLITERAS, y SALAS GARZA, A., 1989. Efecto de la epinefrina, norepinefrina y L-dopa en el asentamiento y metamorfosis de larvas de Crassostrea gigas. Ciencias Marinas. 15(4):85-103 (1989).

- MENDEZ, I., 1977. Metodología de Superficies de Respuesta. Vol. 4 46 pp.
- MONTGOMERY, D.C., 1976. Design and analysis of experiments . John Wiley & Sons. 417 pp.
- MOORE, H.B., y N. LOPEZ, 1969. The ecology of Chione cancellata. Bull. Mar. Sci. 19:131-148.
- MOORE, H.B., y N. LOPEZ, 1975. An additional study of the ecology of Chione cancellata L. Bull. Mar. Sci. 25:126- 130.
- RHODES, E.W., J.C. WIDMAN & GRINGBERGS, E.L., 1984. Optimum algal concentrations and algal consumption for bivalve larvae in culture and some implications for feeding protocols. J. Shellfish Res. 4:99pp.
- RIISGARD, H.B., 1988. Feeding rates in the hard clam Mercenaria mercenaria(L.) veliger larvae as a function of algal Isochrysis galbana concentrations . J. Shellfish Res. Vol. 7 (3):377-380 (1988).
- SEPESCA, 1988. Anuario Estadístico de Pesca, 1987. Sría. Pesca. Dirección General de Informática, Estadística y Documentación. México, D.F. 351 pp.
- SIDALL, S. E., 1978. Temporal changes in the salinity and temperature requirements of tropical mussel larvae. Prod. World. Maricul. Soc. 9:549-566.
- TAN TIU, A. y D., VAUGHAN, 1988. Food value of tropical microalgae to mercenaria mercenaria larvae; a preliminary study. J. Shellfish Res. 7:206-207.
- TAN TIU, A. , D., VAUGHAN, T., CHILES y K., BIRD, 1989. Food eurytopic microalgae to bivalve larvae of Cytopleura costata , Crassotrea virginica and mercenaria mercenaria. J. Shellfish research, 8(2):399-405.
- TENORE, K.R. y W.M., DUNSTAN, 1973. Comparison of rates of feeding and biodeposition of the american oyster Crassotrea virginica Gmelin, fed different species of phytoplankton. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 12:19-26.
- TENORE, K.R., J.C. GOLDMAN Y J.P. CLARNER, 1973. The food chain dynamics of the oyster, clam and mussel in an aquaculture food chain. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 12:157- 165.

- TETTELBACH, S.T. & E. W. RHODES, 1981. Combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the northern Bay scallop Argopecten irradians irradians. Mar. Biol. 63:249-253 (1981).
- UKELES, R. 1975. Views on bivalve larvae nutrition. Proc. of 1st. Int. Conf. on Aquac. Nutrition. October, 1975. pp. 127-162.
- VILLAMAR, C.A., 1965. Fauna malacológica de la Bahía de la Paz. Notas ecológicas. Inst. Nal. Inv. Biol. Pesq. Contribuciones al II Congreso de Oceanografía, Ensenada, B.C. 57 pp.
- WALNE, P.R., 1970. Studies of the food value of nineteen genera of algae to juvenile genera Ostrea, Crassostrea, Mercenaria, Mytilus. Ministry Agric. Fish. Food. Fish. Investig. Series, II, 26(5); 62 pp.
- , 1979. Culture of Bivalve Molluscs. The Whitefriars Press Ltd., London. 2nd. edition. pp. 189.
- WELLS, W.F., 1927. Report of the experimental shellfish station. Rept. New York State Conserv. Dept. 16:1-22 .
- WINTER, J. E., 1970. Filter feeding and food utilization in Arctica islandica and Modiolus modiolus at different food concentrations. In: Marine Food Chains. pp. 196-206. Ed. by J.H. Steele. Univ. of California Press. Berkeley, CA.
- , 1978. A review of the knowledge of suspension-feeding in Lamellibranchiate bivalve, with special reference to artificial aquaculture systems. Aquaculture 13:1-33 (1978).
- WINTER, J.E., y R.W. LANGTON, 1975. Feeding experiments with Mytilus edulis L. at small laboratory scale. I. The influence of the total amount of food ingested and food concentration on growth. 10th Europ. Symp. Mar. Biol. Belgium, 1975. 1:565-581.