



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
BAJA CALIFORNIA**



**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**

**BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA**



*Conocimiento, Desarrollo y Progreso*

**Ontogenia larval de *Panopea globosa* (Dall, 1898) alimentada  
con *Isochrysis* sp y *Chaetoceros calcitrans* cultivadas con fertilizantes  
agrícolas.**

Tesis

Para obtener el título de

Licenciado en Biotecnología en acuicultura

Presenta:

Bonett Calzada Brenda Guadalupe

Ensenada, Baja California, México, a junio del 2015

**Ontogenia larval de *Panopea globosa* (Dall, 1898) alimentada  
con *Isochrysis* sp y *Chaetoceros calcitrans* cultivadas con  
fertilizantes agrícolas.**

Tesis

Para obtener el título de

Licenciado en Biotecnología en acuicultura

Presenta:

Bonett Calzada Brenda Guadalupe

Aprobada por:



Director de tesis

Dr. Enrique Valenzuela Espinoza



Sinodal

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz



Sinodal

Dr. Roberto Millán Núñez

Ensenada, Baja California, a 02 de junio del 2015

*Pues ¿qué provecho obtendrá un hombre si gana  
el mundo entero, pero pierde su alma?*

*Mateo 16:26*

*Las cosas inesperadas, son las que nos cambian la vida...*

*Anónimo*

## Resumen

Se comparó el crecimiento y supervivencia larval de *Panopea globosa* alimentada con dietas monoalgales y mixtas de *Isochrysis* sp y *Chaetoceros calcitrans* producidas con fertilizantes agrícolas y medio f/2, con el propósito de conocer el efecto de estas dietas en el crecimiento y supervivencia larval de *P. globosa*. Para evaluar el desarrollo ontogénico se tomaron imágenes en microscopio Axioscop 40 con apoyo del programa axiovision 4.0. Se realizaron registros fotográficos cada hora a partir de la fertilización de los huevos y durante el desarrollo de estos hasta el primer estadio larvario de la especie. Los siguientes estadios larvarios fueron registrados cada dos días durante los recambios de agua. Los resultados indican que el desarrollo embrionario de *P. globosa* tiene una duración de 14 horas a 22°C. Asimismo, el desarrollo larval duró 15 días a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , tiempo en el cual se identificaron 5 estadios larvales. El primer estadio fue larva trocófora que tuvo una duración de 9 horas. Los estadios subsecuentes fueron; larva "D" la cual presenta velo funcional. Al término de esta etapa se observaron los estadios veliger temprana e intermedia y cada estadio duro 4 días. A diferencia de los anteriores, el último estadio larval (pediveliger) duro 3 días, tiempo en el cual las larvas desarrollaron un pie funcional y velo retraído previo a la metamorfosis. Por otra parte, se registró mayor supervivencia con las dietas mixtas cultivadas con fertilizantes agrícolas (21%) y medio f/2 (20%) respectivamente. Se concluye que el cultivo de *Isochrysis* sp y *C. calcitrans* con fertilizantes agrícolas son menos onerosas que el uso del medio f/2. Por tanto, el uso de fertilizantes agrícolas pueden ser utilizados para la producción de microalgas destinadas a la alimentación de larvas de *P. globosa* en centros acuícolas.

## **Dedicatoria**

### **A mi Familia**

#### **A mis papas**

#### **Bonett y Lupita**

Porque yo sin ustedes no soy nadie, porque gracias a ustedes he llegado hasta donde estoy, porque ustedes han hecho de mí una mujer de bien y siempre les estaré agradecida por sus enseñanzas y sus regaños, por siempre estar para mí cuando lo necesito y apoyarme en todas las actividades que realizo.

#### **A mis hermanos**

#### **Francisco y Samuel**

Esto también es gracias a ustedes, porque crecer con ustedes siempre ha sido divertido y lleno de experiencias inolvidables, por siempre cuidar de mi antes que de ustedes mismos, porque ustedes creen en mí y mi apoyan siempre. Siempre estaré aquí para ustedes.

#### **A mi cuñada**

#### **Jessica Flores**

Desde que pasaste a formar parte de la familia has estado siempre para nosotros, también gracias a ti este trabajo dio resultado por ayudarme los días que no podía, porque en ti encontré la hermana que quería tener.

**Los amo familia**

## **Agradecimientos**

A la Universidad Autónoma de Baja California por haberme permitido realizar mis estudios, así como a la Facultad de Ciencias Marinas y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) por permitirme realizar el desarrollo experimental de esta tesis.

A Oceánica Laboratorios, en particular al M.C José Carlos Garduño Franco por proporcionar el material biológico para el desarrollo de esta tesis y por todos sus consejos y sugerencias. ¡Muchas gracias en verdad!

En particular al Dr. Enrique Valenzuela Espinoza mi director de tesis, tutor académico y profesor. Por la infinita paciencia que tuvo conmigo y por haberme permitido ser parte de su laboratorio durante estos años y además de haber despertado en mi el interés por las microalgas, por la ciencia y por la acuicultura. En si profe no tengo palabras para agradecerle que me hubiera guiado durante gran parte de mi carrera y brindarme tantos consejos. De todo corazón gracias profe por creer siempre en mí y en que podía terminar esta tesis.

Al Ocean. Filiberto Cebrero Núñez por haberme brindado su amistad y sus consejos durante largas platicas que no olvidare. Gracias profe Fili.

Así mismo a la Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz por haber participado como sinodal de estas tesis y por haberme brindado su apoyo durante mi estadía en Chile y todos sus consejos.

Al Dr. Roberto Millán Núñez por haber aceptado ser sinodal de tesis y por haberme brindado sus sugerencias y consejos.

También a todos los profesores que me dieron clases durante mi carrera universitaria al Dr. Alfredo Salas, Ocean. Diego Veá, Ocean. Maximiliano López, Dr. Mario Galaviz, Dr. Luis Enríquez, Dr. Zaul, Dr. Gabriel Correa, Dr. Samuel Sánchez, Dra. Luz López por solo mencionar algunos y porque cada uno aportó un granito de arena para mi formación académica. ¡Gracias profes!

Al Ocean. Alberto Gálvez, por ayudarme en la toma de fotografías de esta tesis, por enseñarme a usar el equipo y por haberme brindado sus consejos y apoyo este tiempo.

A la M.C Rosario Jara por brindarme su amistad estos últimos meses y haberme brindado importantes consejos y compañía mientras redactaba mi tesis.

A mis compañeras y amigas de laboratorio: Beatriz Nava y Sofía León por haberme ayudado durante el experimento, en fin chicas gracias por haber estado siempre apoyándome ustedes saben que fueron parte fundamental de esta tesis y agradezco de corazón que hayan estado, aunque les robe vacaciones, días festivos y fines de semana; algún día se los recompensaré. Gracias niñas las quiero mucho sin su ayuda no hubiera sido posible.

A Koreysi Ojeda, Rocio Arce y Brian Curiel, porque estuvieron apoyándome en sus vacaciones. ¡Gracias niños!

A mis amigos de carrera que estuvieron todo el tiempo y se preocuparon por esta tesis, gracias Samantha Victoria, Francisco Villavicencio, Daniela Meza, Nathy Ulloa, Jimena, Valentín, José Carlos Macedo, Gerardo Torres gracias chicos.

A la Maní (Estefanía Real) gracias Fany por haberme brindado tu amistad desde el principio y por haber aguantado mis berrinches durante clases, exámenes, exposiciones y durante lo que duro todo este asunto de la tesis.

A Abel Segundo y Miriam García, gracias por haberme aguantado en Chile durante 6 meses, cachai chiquillos, que sin ustedes ese viaje no hubiese sido igual, ¡gracias chiquillos!

A mis amigos de secundaria y prepa Johanna Cabrera, Juan Rosales, Nadine Villalobos, Bella Martínez, Jaqueline Castro, Alberto Galván, Maricela Cortes, Aracely Borja, Erika Cruz gracias por seguirme queriendo y apoyando como siempre a pesar de tantas veces que me ausente para estar en la universidad o en el laboratorio.

Por último pero no menos importante, GRACIAS a mi familia que sin ellos no soy nada y a quien les he dedicado esta tesis que he realizado con tanto esfuerzo.

**¡Gracias a todos ustedes!**

*Pensar es moverse en el infinito.*

*H.D. Lacordaire*

## Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Distribución en México del género <i>Panopea</i> spp.	3
Figura 2. Densidad celular promedio de <i>Isochrysis</i> sp y <i>Chaetoceros calcitrans</i> cultivadas en medio f/2 y fertilizantes agrícolas -F. La barra vertical indica el error estándar (n=3).	15
Figura 3. Tasa de crecimiento específica promedio de <i>Isochrysis</i> sp y <i>Chaetoceros calcitrans</i> cultivadas en medio f/2 y fertilizantes agrícolas -F. La barra vertical indica el error estándar (n=3).	16
Figura 4. Variaciones de pH antes y después a la adición de CO <sub>2</sub> en cultivos de <i>Isochrysis</i> sp y <i>Chaetoceros calcitrans</i> en medio f/2 y fertilizantes agrícolas - F. Línea discontinua indica valores posteriores a la adición de CO <sub>2</sub> .	17
Figura 5. Costos de producción de 1 L de cultivo con medio f/2 de Guillard (1975) y fertilizantes agrícolas.	18
Figura 6. Fases del desarrollo embrionario de <i>Panopea globosa</i> . a) óvulo; b) óvulo fecundado y expulsión del primer cuerpo polar; c) primera división celular; d) segunda división celular; e) tercera división celular; f) cuarta división celular; g) Mórula; h) blástula; i) larva trocófora; m.f: membrana de fecundación; c.p: cuerpo polar; f.c: flagelos centrales.	20
Figura 7. Desarrollo larval de <i>Panopea globosa</i> alimentada con diferentes dietas de microalgas. A) Inicio de larva de charnela recta o "D"; B) final de larva de charnela recta o "D"; C) Inicio de larva veliger temprana; D) final de larva veliger temprana; E) inicio de larva veliger intermedia; F) final de larva	25

veliger intermedia. V: velo; e: estómago; m.a: músculos abductores.

- Figura 8. Cambios en la longitud dorso-ventral de *Panopea globosa* alimentada con *Isochrysis* sp, *C. calcitrans* y su mezcla cultivadas en medio f/2 y fertilizantes agrícolas -F. 28
- Figura 9. Cambios en la longitud antero-posterior de *Panopea globosa* alimentada con *Isochrysis* sp, *C. calcitrans* y su mezcla cultivadas en medio f/2 y fertilizantes agrícolas -F. 29
- Figura 10. Supervivencia larval promedio de *Panopea globosa* alimentada con diferentes dietas de microalgas cultivadas en medio f/2 y fertilizantes agrícolas -F. La barra vertical indica el error estándar (n=3). 29
- Figura 11. Final del desarrollo larval e inicio de postlarvas de *Panopea globosa*. 30  
a) inicio de larva pediveliger; b) final de larva pediveliger; c) inicio de postlarva; d) final de postlarva; e y f) semilla de 4 días. p: pie; e: estómago; s: sifón; m.a: músculo abductor; m: manto.
- Figura 12. Larvas deformes presentes en el cultivo de *Panopea globosa* alimentadas con diferentes dietas de microalgas. 32
- Figura 13. Porcentaje total de larvas deformes presentes en los diferentes tratamientos del cultivo de *Panopea globosa*. 33

## Lista de tablas

	Pág.
Tabla I. Composición del medio f/2 de Guillard (1975) y medio enriquecido con fertilizantes agrícolas (Valenzuela et al., 1999).	10
Tabla II. Resultados del análisis de varianza de una vía, comparando densidad celular de las diferentes especies en distintos tratamientos (medio f/2 y fertilizantes agrícolas) en cultivo semi-continuo.	15
Tabla III. Significancia según el contraste analizado por día en los diferentes tratamientos de <i>Isochrysis</i> sp, <i>C. calcitrans</i> y su <i>mezcla</i> , cultivados en medio f/2 de Guillard (1975) y fertilizantes agrícolas.	31

# Contenido

	<b>Pág.</b>
<b>Resumen</b>	<b>IV</b>
<b>Dedicatoria</b>	<b>V</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>VI</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>X</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>XI</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Biología de la especie	2
1.2. Distribución	2
1.3. Clasificación taxonómica	3
1.4. Desarrollo larval	4
<b>2. Antecedentes</b>	<b>5</b>
<b>3. Justificación</b>	<b>7</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>7</b>
4.1. Objetivos general	7
4.2. Objetivos particulares	8
<b>5. Hipótesis</b>	<b>8</b>
<b>6. Metodología</b>	<b>9</b>
6.1. Cultivo de microalgas	9
6.1.1.1. Cultivo semi-continuo de microalgas	10
6.1.1.2. Evaluación de la densidad celular de microalgas	11
6.1.1.3. Análisis de costos de producción de microalgas	11

6.2. Cultivo y desarrollo larvario	11
6.2.1.1. Fertilización de óvulos	11
6.2.1.2. Registró de ontogenia larval	12
6.2.1.3. Diseño experimental y manejo de larvas	12
6.2.1.4. Evaluación de supervivencia	14
6.2.1.5. Evaluación de crecimiento larval	14
6.2.1.6. Análisis estadístico	14
<b>7. Resultados</b>	<b>15</b>
7.1. Microalgas	15
7.2. Desarrollo embrionario	18
7.3. Desarrollo larval	21
a) Trocófora	21
b) Larva de charnela recta "D"	21
c) Veliger temprana	22
d) Veliger intermedia	23
e) Pediveliger	26
f) Postlarva	26
g) Semilla	27
<b>8. Larvas deformes</b>	<b>31</b>
<b>9. Discusión</b>	<b>33</b>
<b>10. Conclusión</b>	<b>39</b>
<b>11. Referencias</b>	<b>39</b>

## 1. Introducción

La explotación pesquera de la almeja de sifón (*Panopea* spp) inició a partir del año 1970 en Washington, Estados Unidos y en 1976 en Columbia Británica, Canadá (Khan, 2006), a partir del año 2002 inició la pesca comercial de *Panopea generosa* en el Océano Pacífico y en el Golfo de California de *Panopea globosa* (Dall, 1898). Los permisos otorgados a la fecha han sido 44, de los cuales solo 5 se encuentran aún vigentes (Pérez-Valencia, 2011 y Aragón-Noriega, 2012). Para los años 2006 y 2007 las capturas registradas para *P. globosa* y *P. generosa* fueron de 1 171 toneladas (Pérez-Valencia, 2011). Mientras que para el 2008 la captura fue de 904.7 y 340 toneladas para *P. globosa* y *P. generosa*, respectivamente (SAGARPA, 2007).

En particular los estudios sobre la almeja de sifón en México indican que para *P. globosa* en el Golfo de California se han enfocado al conocimiento de su ciclo reproductivo (Aragón-Noriega et al., 2007). Por este motivo es necesario realizar investigaciones que permitan identificar estadios de maduración, desove, crecimiento larval y alimentación para la introducción de esta especie al rango de la acuicultura y para tener una estrategia de gestión y aprovechamiento sostenible de estas especies (Pauly 1996, Tijaro-Rojas y Salgado-Cabrera, 2007).

La información biológica y ecológica específica sirve para establecer puntos de referencia que orienten el manejo pesquero (Ramírez-Félix et al., 2012). Esto es especialmente importante considerando que se trata de especies que de acuerdo con las investigaciones en *P. generosa*, se caracterizan generalmente por ser longevas, tener bajas tasas de reclutamiento y crecimiento poblacional lento. De acuerdo con Orensanz et al.,

2004, la explotación de especies con dichas características imponen problemas al manejo pesquero, especialmente si se conoce poco de la dinámica poblacional.

### **1.1. Biología de la especie**

Las características de *Panopea globosa* son similares a las presentados por *Panopea generosa*, sin embargo, ambas presentan una característica peculiar, la cual es la marca de un seno paleal en la concha, en *Panopea globosa* esta marca es fácilmente detectable, en cambio en *P. generosa* es prácticamente nula, siendo esto lo que permite diferenciarlas como dos especies distintas (Arámbula et al., 2008); no obstante, ambos organismos presentan dos valvas y un sifón alargado. Esta característica es la de mayor interés para su comercialización ya que presenta un gran tamaño, con una longitud máxima de 1.5m. Estas especies se encuentran en el intermareal en sustratos lodosos y arenosos, a 18m de profundidad. Ambos organismos son dioicos, pero la temporada reproductiva de cada especie es diferente, *P. globosa* se reproduce de diciembre a febrero (Arámbula et al., 2008), mientras que *P. generosa* se reproduce de mayo a julio (Guadamud-Tapia, 2012), cuando se encuentra en condiciones óptimas para la reproducción, liberan los gametos al medio para que estos se fecunden, estas especies tienen una edad promedio de 20 a 60 años.

### **1.2. Distribución**

Dentro de las costas mexicanas se encuentran dos especies del género *Panopea*, se les conoce por sus nombres comunes como "almeja de sifón", "almeja chiluda" o en general almeja generosa, una de estas es *P. generosa*, la cual anteriormente se conocía como *P. abrupta*, esta se distribuye desde Alaska hasta las costas de Baja California, México. Del

otro lado de la península de Baja California se encuentra *P. globosa* la cual tiene una distribución desde el Golfo de California hasta el lado del Pacífico en Bahía Magdalena (Hendrickx et al., 2005).

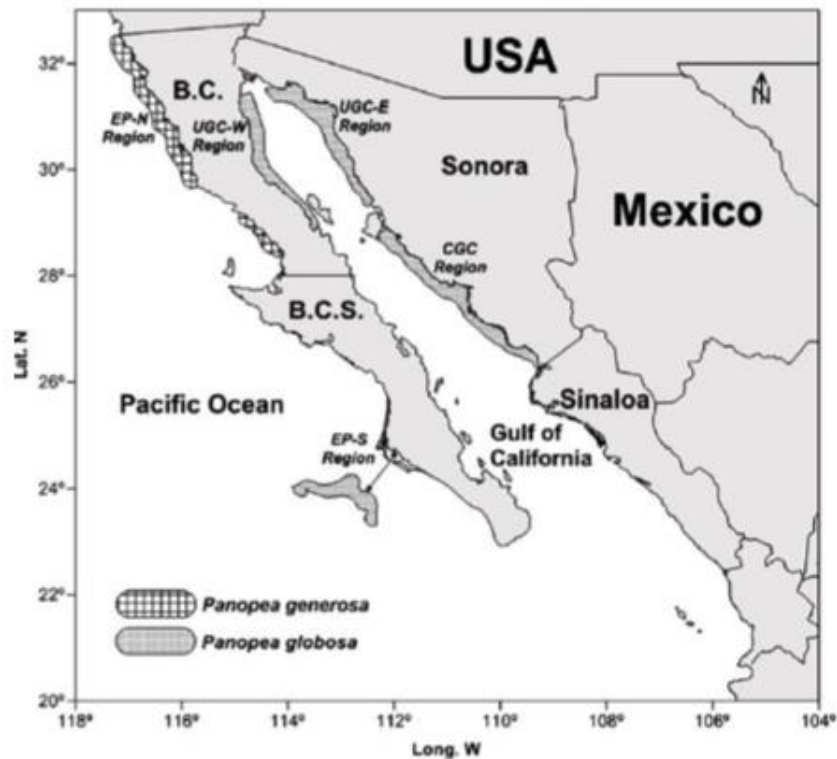


Figura1. Distribución en México del género *Panopea* spp.

### 1.3. Clasificación taxonómica

Phyllum: *Molusca*

Clase: *Bivalvia*

Orden: *Myoida*

Familia: *Hiatellidae*

Género: *Panopea*

Especie: *globosa* (Dall, 1898)

#### **1.4. Desarrollo larval**

El inicio de la gametogénesis de *Panopea globosa* comienza en épocas de otoño, cuando la temperatura aún se mantiene entre 20–28°C, teniendo desoves en invierno cuando la temperatura desciende y se encuentra entre 15–18°C (Aragón-Noriega et al., 2007).

El desarrollo de esta especie es similar al resto de los moluscos bivalvos, comienza con la fecundación de los huevos y después de 48 horas inicia el estadio de larva trocófora, la cual no consume alimento. Después de esta etapa continua la larva de charnela recta o también conocida como larva "D" la cual tiene un tamaño entre 80-150µm y cuenta con un velo, el cual le funciona para la movilidad, alimentación y respiración. Al completarse el estadio "D", continua el estadio veliger que se caracteriza por la formación de umbos para después continuar con la larva pediveliger. En este estadio, inicia la aparición de un pie el cual le ayudará al momento de la fijación en el sustrato y se comienza a apreciar la disoconcha. Cuando la larva ha alcanzado un tamaño superior de 250-300µm inicia el proceso de metamorfosis, en donde la larva va a retraer por completo el velo, formar branquias y sus órganos internos, esta etapa es crítica ya que se presentan altas mortalidades (Helm et al., 2006).

En el medio natural se estima que la supervivencia para organismos no maduros de *Panopea globosa* solo alcanza valores del 2% (Ramírez - Félix, 2011). Además de que para adultos se registra una mortalidad natural del 26.6% (González-Peláez et al., 2015).

## 2. Antecedentes

*P. globosa* es una especie que tiene un alto valor comercial, debido a la presencia de un alargado sifón, pero debido a que es una especie longeva su desarrollo es lento y actualmente se han realizado escasos estudios acerca del crecimiento de *P. globosa*, León-Hing (2012) investigó los cambios histológicos y bioquímicos asociados al ciclo de maduración de la almeja de sifón, *P. globosa* en San Felipe, B.C. México, encontró que los niveles de vitelogenina y de carbohidratos presentes en la hemolinfa pueden ser utilizados como indicadores de niveles de madures en hembras adultas. Buitimea-Álvarez (2011) estudio el efecto de la salinidad y temperatura en desarrollo larval de *Panopea* spp. Encontró que la temperatura óptima para *P. globosa* es de 26°C obteniendo supervivencias del 30%. Ferreira-Arrieta (2012) registró el desarrollo larval y tasa de alimentación para dicha especie. Concluye que la capacidad gástrica en larvas umbadas iniciales es de 200 células  $\mu\text{L}^{-1}$  siendo esta la máxima ingesta durante el desarrollo larval, así mismo, indica que la metamorfosis se presenta cuando alcanza un tamaño de 330-350  $\mu\text{m}$  y ocurre a los días 13 y 14 días de su cultivo.

Con respecto a estudios sobre el uso de diferentes dietas en el cultivo de *Panopea* spp, los trabajos son escasos. Sin embargo, Ren et al., (2015) evaluaron en pos-larvas de *Panopea generosa* el efecto en supervivencia y crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) al utilizar diferentes dietas de microalgas, concluyen que las dietas mixtas de diversas especies de microalgas proporcionan crecimiento significativos que el uso de dietas monoalgales, así mismo existen otros estudios en diversos moluscos bivalvos que podrían servir de guía para esta investigación. Por ejemplo Díaz y Martínez (1992), realizaron un cultivo de *Argopecten purpuratus* en donde calcularon la tasa de ingestión y crecimiento en larvas de estos

organismos utilizando microalgas como *Chaetoceros gracilis*, *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana*. Encontraron que la tasa de ingestión y el crecimiento fue mayor en tratamientos con dietas mixtas que en dietas unialgales. De igual manera se han realizado estudios en otras especies de moluscos bivalvos como *Mediolis capax* y *Pinctada mazatlanica*, en estos casos se evaluaron cinco dietas microalgales utilizando *Isochrysis* sp, *Tetraselmis* sp y *Monochyris* sp para ambas especies, la dieta que proporcionó mejores resultados en crecimiento y supervivencia fue la suministrada en una proporción de 2:1 de *Isochrysis* sp y *Tetraselmis* sp (Mazón-Suastegui, 1984).

Debido a que el cultivo de larvas de moluscos requiere del cultivo previo de microalgas, entonces este puede ser llevado a cabo utilizando diversos medios de cultivo, incluyendo el medio f/2 de Guillard (1975) u otros medios basados en fertilizantes agrícolas. Valenzuela-Espinoza et al. (2004) realizó un estudio sobre el crecimiento de *Rhodomonas* sp, cultivadas con medio f/2 y fertilizantes agrícolas y concluye que el crecimiento en ambos medios fue similar. Por lo tanto, es altamente recomendable la utilización de fertilizantes agrícolas con fines de reducción de costos en producción. Sin embargo, también es recomendable analizar perfil bioquímico, especialmente si la producción de lípidos es diferente al que se encuentra en especies cultivadas con medio f/2 (Piña et al., 2007). Entre los estudios que han utilizado fertilizantes para el cultivo de microalgas y se utilizaron como base en la alimentación de moluscos en cultivo, está el realizado por Coronado-Rosas (1994) quien utilizó la microalga *Isochrysis galbana* como alimento para *Crassostrea gigas*. En su estudio encontró que la composición bioquímica de la microalga, el crecimiento y supervivencia de este ostión tuvieron cambios importantes al usar fertilizantes agrícolas. Entonces estos nutrientes de uso agrícola son una alternativa viable

para la producción microalgas y su posterior uso en la alimentación de larvas de ostión (*Crassostrea gigas*).

### **3. Justificación**

Durante el desarrollo larvario de moluscos bivalvos es altamente recomendable el uso de dietas mixtas de microalgas, debido a que proporcionan mejor crecimiento y mayor supervivencia. La ventaja de usar fertilizantes agrícolas es el bajo costo de producción de microalgas comparado con el costo inherente de nutrientes en medio f/2 de Guillard (1975).

Entre las especies de microalgas que son utilizadas para la alimentación de estos organismos se encuentra *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis* sp las cuales contienen dos tipos de ácidos grasos esenciales para el desarrollo larvario. *C. calcitrans* contiene 17% de EPA (ácido eicosapentaenoico) e *Isochrysis* sp contiene 22% de DHA (Ácido docosahexaenoico), que influyen en la tasa de crecimiento, supervivencia y de manera directa en la metamorfosis (Band, 1999). Farías (2008), menciona que microalgas con diferentes perfiles nutrimentales suministran cantidades distintas de ácidos grasos esenciales para larvas de moluscos. Aunque en este estudio no se determinó la cantidad de ácidos grasos en las microalgas utilizados como alimento, es importante verificar si la producción de *C. calcitrans* e *Isochrysis* sp, con nutrientes agrícolas es similar a la que se obtiene en medio f/2 y su posible efecto en la alimentación de larvas de *Panopea globosa*.

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo general

Evaluar la ontogenia larval de *Panopea globosa* y su respuesta en crecimiento y supervivencia al suministrar dietas mixtas y monoalgales de microalgas cultivadas en diferentes medios.

### Objetivos particulares

- Comparar la densidad celular y tasa de crecimiento específica de *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis sp* cultivadas en medio f/2 de Guillard (1975) y fertilizantes agrícolas.
- Evaluar la tasa de crecimiento y supervivencia de larvas de *Panopea globosa* alimentada con dietas mixtas y monoalgales cultivadas en medio f/2 de Guillard (1975) y fertilizantes agrícolas.
- Evaluar la factibilidad del cultivo de *Panopea globosa* al utilizar microalgas producidas con fertilizantes agrícolas.

## 5. Hipótesis

El uso de dietas mixtas de *Isochrysis sp* y *Chaetoceros calcitrans* cultivadas con fertilizantes agrícolas incrementa el crecimiento y supervivencia de larvas de *Panopea globosa* con respecto a dietas monoalgales.

## 6. Metodología

### 6.1. Cultivo de microalgas

Las especies de microalgas *Isochrysis* sp y *Chaetoceros calcitrans* utilizadas para la alimentación de larvas de *Panopea globosa*, fueron cultivadas en medio f/2 de Guillard (1975) y medio nutritivo con fertilizantes agrícolas (Valenzuela et al., 1999), a temperatura de  $19\pm 1^\circ\text{C}$ .

Para preparar los medios de cultivo, el agua de mar se filtró a través de cuatro filtros tipo Cuno de  $1\ \mu\text{m}$  e irradiada mediante un sistema de luz ultravioleta modelo H-50. Cada litro de agua de mar usada se enriqueció con los nutrientes mayores, metales traza y vitaminas descritos en la tabla I, de acuerdo a las especificaciones de preparación indicadas. De este medio, se prepararon para cada especie volúmenes de cultivo de 150 mL en matraces Erlenmeyer, para después ser transferidos a un volumen de cultivo de 2 L en Fernbach.

Los dos niveles de cultivo se esterilizaron en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 15 libras de presión pulgada<sup>-2</sup> durante 15 minutos, enfriados a temperatura de laboratorio. Una vez enfriados, se procedió a la adición de vitaminas estériles en condiciones controladas en la concentración indicada en la tabla I. Después, se procedió a la inoculación. Los cultivos en los dos niveles se mantuvieron en una irradianza fotosintéticamente activa de 100 y 150  $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  suministrada por lámparas fluorescentes Osram de 75 W. La irradiancia se midió en la superficie externa de los matraces Erlenmeyer y Fernbach con un irradiómetro PAR (modelo QLS-100,  $4\pi$  sensor, Biospherical Instruments). Los cultivos en Erlenmeyer fueron mantenidos en cultivo estático, mientras que los Fernbach se mantuvieron en cultivo semi-continuo y ambos se homogenizaron diario de manera manual.

Tabla I. Composición del medio f/2 de Guillard (1975) y medio enriquecido con fertilizantes agrícolas (Valenzuela et al., 1999).

Medio f/2			Fertilizantes agrícolas		
NUTRIENTES MAYORES	Formula	Cantidad/L	NUTRIENTES MAYORES	Formula	Cantidad/L
Nitrato de sodio	NaNO <sub>3</sub>	75 mg	Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	36.8 mg
Fosfato de sodio monobásico	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	5 mg	Ácido fosfórico	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	5.6 mg
Silicato de sodio meta soluble	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	30 mg	Silicato de sodio meta soluble	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	30 mg
METALES TRAZA			METALES TRAZA		
EDTA disódico	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na · H <sub>2</sub> O	4.36 mg	Fe-EDTA	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> FeH <sub>2</sub> O	5.4 mg
Cloruro férrico	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	3.15 mg	Fe-no quelado		70.7 mg
Sulfato cúprico	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.01 mg	Sulfato cúprico	CuSO <sub>4</sub>	2.0 mg
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.022 mg	Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub>	1.09 mg
Cloruro de cobalto	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.01 mg	Sulfuro	S	45.84 mg
Cloruro de manganeso	MnC <sub>14</sub> · H <sub>2</sub> O	0.18 mg	Sulfato de manganeso	MnSO <sub>4</sub>	1.09 mg
Molibdato de amonio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.006 mg			
Vitaminas			Vitaminas		
Tiamina hidroclorehídrica	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> CIN <sub>4</sub> OS	0.1 mg	Tiamina hidroclorehídrica	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> CIN <sub>4</sub> OS	0.1 mg
Biotina	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	0.5 µg	Biotina	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	0.5 µg
Cianocobalamina (B12)	C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> P	0.5 µg	Cianocobalamina (B12)	C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> P	0.5 µg

### 6.1.1. Cultivo semi-continuo de microalgas

Durante el desarrollo experimental se realizó cultivo semi-continuo en Fernbach de las dos especies de microalgas utilizadas en esta investigación (*C. calcitrans* e *Isochrysis* sp), en el cual se cosecho diario volúmenes de 300 mL (15%) de cada especie y posteriormente

se recuperó el mismo volumen con la previa adición de los nutrientes, vitaminas (tabla I) y agua de mar esterilizada.

### **6.1.2. Evaluación de la densidad celular de microalgas**

La densidad celular se cuantificó en una cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad. De los resultados de densidad celular se calculó la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) con la siguiente expresión:

$$\mu = \ln (C_2) - \ln (C_1) / t_2 - t_1$$

Donde:

C<sub>1</sub>: Densidad celular inicial

C<sub>2</sub>: Densidad celular final

t<sub>1</sub>: Tiempo inicial

t<sub>2</sub>: Tiempo final

### **6.1.3. Análisis de costos de producción de microalgas**

Se obtuvo el costo de los nutrientes de cada uno de los medios de cultivo para conocer el costo por litro de producción de *C. calcitrans* e *Isochrysis* sp y así determinar la factibilidad económica de cultivo de cada uno de los medios.

## **6.2. Cultivo y desarrollo larvario**

### **6.2.1. Fertilización de óvulos**

En el inicio de esta etapa "Laboratorio Oceánica" ubicados en Ensenada; proporcionó huevos y espermatozoides de organismos adultos de *Panopea globosa*, los cuales fueron transportados al laboratorio de microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) perteneciente a la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y se procedió al

cambio de agua de transporte utilizando tamiz de 35  $\mu\text{m}$  y posteriormente colocados un volumen de 10 L con agua de mar filtrada y esterilizada a temperatura de  $22 \pm 1$  °C y prosiguió a la fertilización de los mismos.

Para la fertilización se usó una concentración de 6-8 espermatozoides por óvulo y se dejó en este proceso durante 1 hora para asegurar que fuesen fertilizados la mayor cantidad de óvulos posibles.

Una vez que los óvulos fueron fertilizados se incubaron durante las siguientes 24 horas y comenzó el registro de la ontogenia del desarrollo embrionario.

### **6.2.2. Registró de ontogenia larval**

Para evaluar el desarrollo ontogénico se inició con la toma de fotografías en un microscopio Axioscop 40, con apoyo del programa axiovision 4.0. Estas se tomaron cada hora después de la fertilización y durante los primeros estadios de desarrollo embrionario hasta el primer estadio larvario de la especie. Para el registro de los siguientes estadios larvarios, la toma de fotografías se realizó cada recambio total de agua (3 días), en donde se registró el tiempo entre estadios larvarios y el tiempo que dura para alcanzar la metamorfosis.

### **6.2.3. Diseño experimental y manejo de larvas**

Se mantuvieron 6 tratamientos los cuales constaban de cuatro dietas monoalgales de *C. calcitrans* e *Isochrysis* sp cultivadas con fertilizantes agrícolas y medio f/2 de Guillard

(1975) y dos tratamientos que incluían la mezcla (1:1) de microalgas cultivadas tanto con fertilizantes agrícolas y medio f/2 de Guillard (1975).

El cultivo inicio con larva trocófora, la cual se mantuvo en recipientes con volumen de 10 L, con aireación constante suministrada alrededor del fondo y el centro con el fin de evitar que las larvas permanecieran en el fondo. La densidad inicial fue de 10 larvas/mL, teniendo un total de  $100 \times 10^3$  larvas por unidad de evaluación y temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  con fotoperiodo 12:12; el agua de mar utilizada se filtró por 4 filtros tipo Cuno de  $1 \mu\text{m}$  y se irradio mediante un sistema de luz ultravioleta modelo H-50. Después, el agua se trató con hipoclorito de sodio y se neutralizó con tiosulfato de sodio.

Para evitar el desarrollo bacteriano en los cultivos larvarios y post-larvarios se utilizó cloranfenicol a concentración de  $9 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### **6.2.4. Evaluación de supervivencia**

Para evaluarla supervivencia se registró el número de larvas por triplicado ( $n=3$ ) por tratamiento durante el recambio de agua cada 3 días, mediante el conteo en cámara Sedgwick Rafter de 1 mL de volumen. Para estos recambios se utilizaron tamices de diferente tamaño, los cuales fueron seleccionados conforme el tamaño que presentaron las larvas durante el tiempo de cultivo, con el fin de eliminar la materia orgánica presente en el cultivo. Las muestras utilizadas para el conteo de supervivencia se fijaron con formol salino al 10% y se utilizaron para evaluar el crecimiento de larvas en cultivo.

Los datos de supervivencia se obtuvieron a partir del conteo de todas las larvas tanto vivas como muertas, en donde los datos se procesaron mediante la fórmula de porcentaje de supervivencia:

$$S (\%) = (N_t/N_i)*100$$

Donde:

S: Porcentaje de sobrevivencia

N<sub>t</sub>: Cantidad de larvas presentes al momento del conteo (t)

N<sub>i</sub>: Número de larvas iniciales (i)

### **6.2.5. Evaluación de crecimiento larval**

Muestras por triplicado fueron tomadas para la evaluación de supervivencia las cuales fueron almacenadas en viales de 5mL y fijadas con formol salino al 10%. Estas muestras fueron utilizadas para la medición del crecimiento larval (longitud) utilizando un microscopio compuesto con un objetivo de 5x y el apoyo de una reglilla para la medición.

Se midieron los márgenes dorso-ventrales y antero-posterior de cada estadio larvario hasta la metamorfosis.

Así mismo se calculó la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) de la longitud dorso-ventral y antero-posterior, a partir de la fórmula:

$$\mu = L_2 - L_1 / t_2 - t_1$$

Donde:

L<sub>1</sub>: Longitud inicial

L<sub>2</sub>: Longitud final

t<sub>1</sub>: Tiempo inicial

t<sub>2</sub>: Tiempo final

### **6.2.6. Análisis estadístico**

Un análisis de varianza de dos vías será usado para determinar el efecto individual y combinando de diferentes dietas producidas en medio f/2 y fertilizantes agrícolas en la variable dependiente de densidad larval. Para aquellos datos que resulten significativamente afectados por variables independientes ( $P < 0.05$ ), se llevará a cabo una prueba de comparaciones múltiples (Tukey).

## 7. Resultados

### 7.1. Microalgas

Al comparar las densidades celulares registradas por *Isochrysis* sp en medio f/2 y fertilizantes agrícolas no se observaron diferencias significativas ( $P=0.772$ ) (ver tabla II). Los valores de las densidades fueron  $10.3 \times 10^6$  y  $10.7 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> respectivamente (Fig. 2). Los resultados de cultivos en medio f/2 produjeron mayor densidad celular ( $14.9 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>) de *Chaetoceros calcitrans* la cual representó un 12%, con respecto a aquellos cultivos que se realizaron con fertilizantes agrícolas ( $13 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>) (Fig. 2). Sin embargo, la tasa de crecimiento específica promedio de *C. calcitrans* cultivado con Fertilizantes agrícolas ( $\mu=0.54$ ) y medio f/2 ( $\mu=0.55$ ) fue similar.

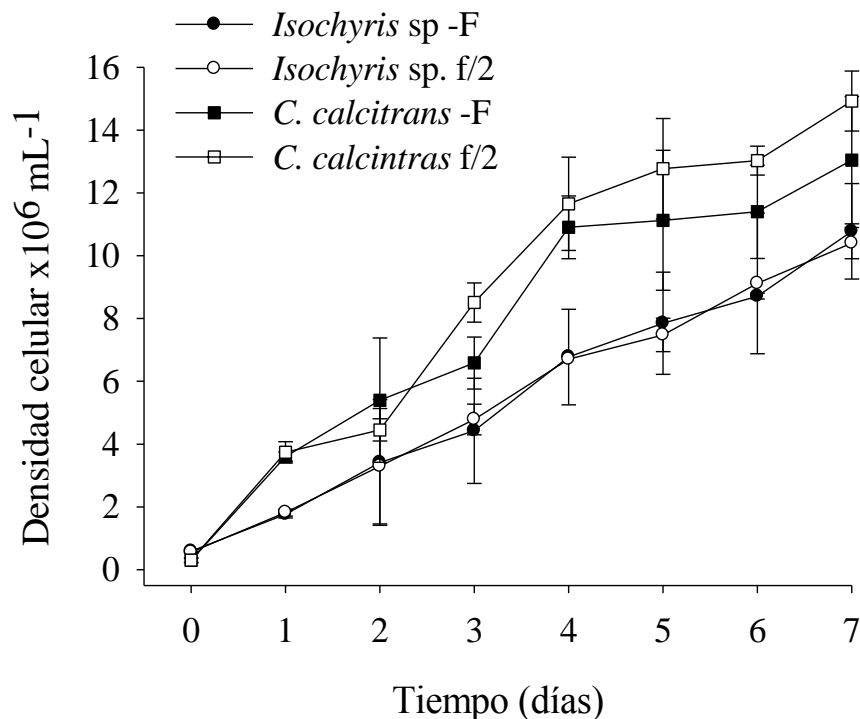


Figura 2. Densidad celular promedio de *Isochrysis* sp y *Chaetoceros calcitrans* cultivadas en medio f/2 y fertilizantes agrícolas -F. La barra vertical indica el error estándar (n=3).

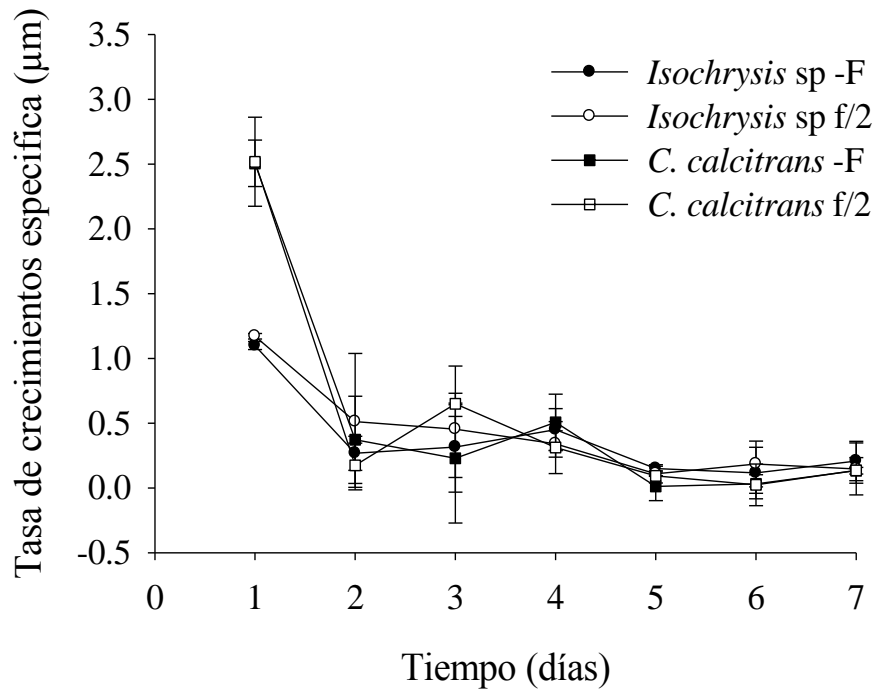


Figura 3. Tasa de crecimiento específica promedio de *Isochrysis* sp y *Chaetoceros calcitrans* cultivadas en medio f/2 y fertilizantes agrícolas -F. La barra vertical indica el error estándar n=3).

Tabla II. Resultados del análisis de varianza de una vía, comparando densidad celular de las diferentes especies en distintos tratamientos (medio f/2 y fertilizantes agrícolas) en cultivo semi-continuo.

d.f=1				
Tiempo	Contraste	Valor F	Valor P	P<0.05
0	<i>Isochrysis</i> F vs <i>Isochrysis</i> f/2	0.315	0.631	NS
	<i>Chaetoceros</i> F vs <i>Chaetoceros</i> f/2	0.014	0.916	NS
1	<i>Isochrysis</i> F vs <i>Isochrysis</i> f/2	0.22	0.684	NS
	<i>Chaetoceros</i> F vs <i>Chaetoceros</i> f/2	0.29	0.644	NS
2	<i>Isochrysis</i> F vs <i>Isochrysis</i> f/2	0.003	0.957	NS
	<i>Chaetoceros</i> F vs <i>Chaetoceros</i> f/2	0.446	0.573	NS
3	<i>Isochrysis</i> F vs <i>Isochrysis</i> f/2	0.085	0.798	NS
	<i>Chaetoceros</i> F vs <i>Chaetoceros</i> f/2	6.916	0.119	NS
4	<i>Isochrysis</i> F vs <i>Isochrysis</i> f/2	0.004	0.951	NS
	<i>Chaetoceros</i> F vs <i>Chaetoceros</i> f/2	0.347	0.615	NS
5	<i>Isochrysis</i> F vs <i>Isochrysis</i> f/2	0.096	0.786	NS

	<i>Chaetoceros</i> F vs <i>Chaetoceros</i> f/2	0.72	0.485	NS
6	<i>Isochrysis</i> F vs <i>Isochrysis</i> f/2	1.444	0.352	NS
	<i>Chaetoceros</i> F vs <i>Chaetoceros</i> f/2	2.186	0.277	NS
7	<i>Isochrysis</i> F vs <i>Isochrysis</i> f/2	0.11	0.772	NS
	<i>Chaetoceros</i> F vs <i>Chaetoceros</i> f/2	1.143	0.357	NS

\*NS= no significativo

Previo a la cosecha de microalgas y durante el tiempo de cultivo, se ajusto el pH mediante la adición de CO<sub>2</sub> en cada unidad experimental de *Isochrysis* sp y *Chaetoceros calcitrans* cultivadas en medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Este se mantuvo entre valores de 7-8 unidades de pH (Fig.3).

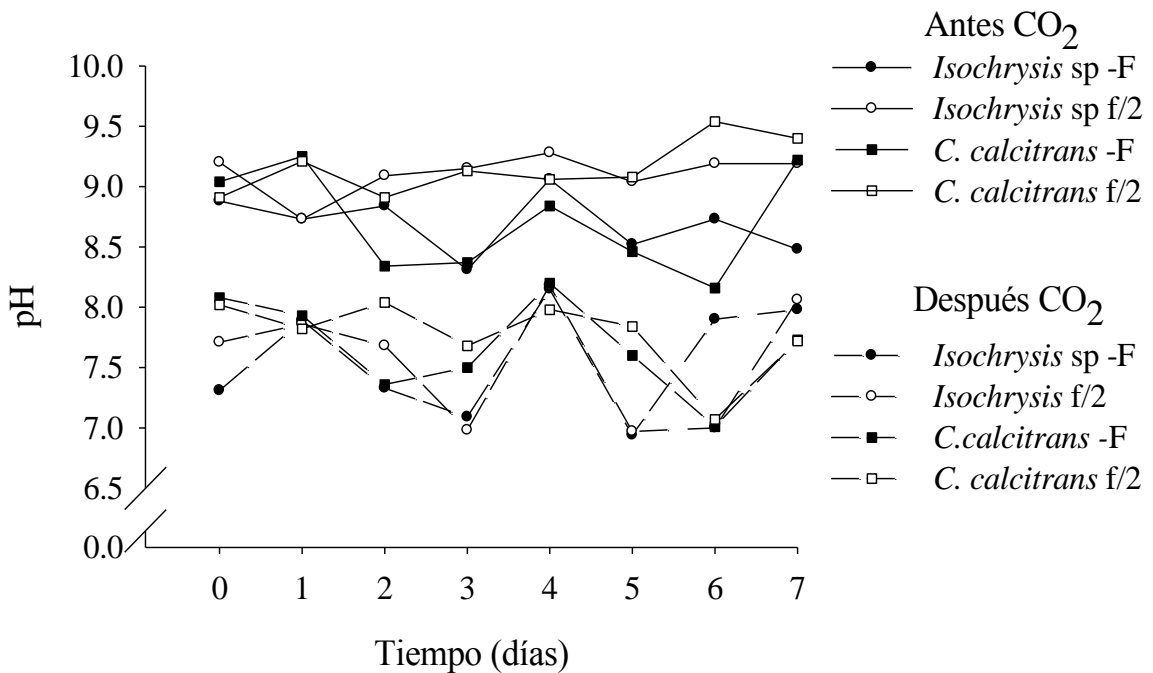


Figura4. Variación de pH antes y después a la adición de CO<sub>2</sub> en cultivos de *Isochrysis* sp y *Chaetoceros calcitrans* en medio f/2 y fertilizantes agrícolas -F. Línea discontinua indica valores posteriores a la adición de CO<sub>2</sub>.

El costo de los nutrientes utilizados en los diferentes medios difieren de cultivo difieren entre sí. Para producir 1 litro de microalgas con nutrientes del medio f/2 de Guillard (1975) cuesta \$0.39, el cual es 82% mayor que utilizar nutrientes de fertilizantes agrícolas (\$0.068) (Fig. 5). La cotización de los insumos para el cultivo se realizó con Sigma aldrich y otra en producción de fertilizantes agrícolas (Icassa S.A de C.V), como resultado se obtuvo que la producción con fertilizantes agrícolas es de menor costo que aquella generada con el medio f/2 de Guillard (1975).

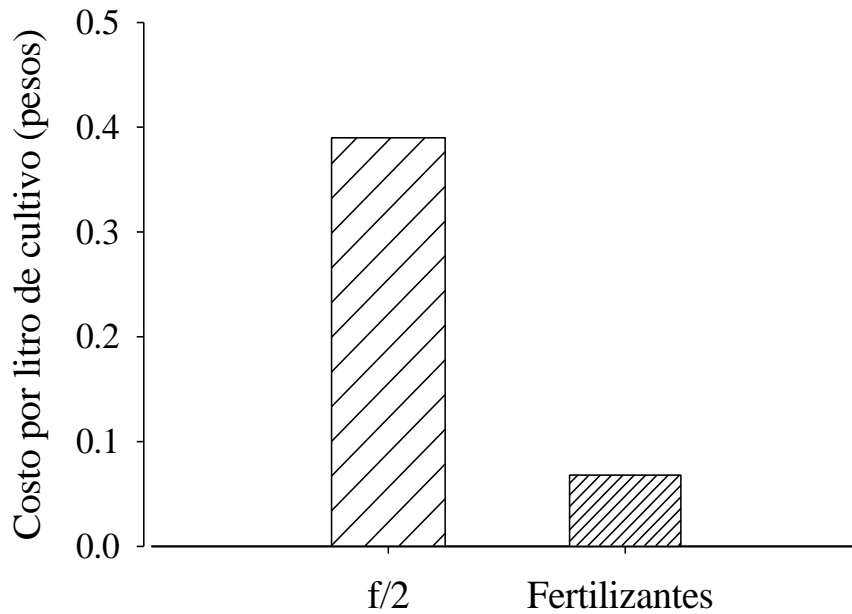


Figura 5. Costos de producción de L de cultivo con medio f/2 de Guillard (1975) y fertilizantes agrícolas.

## 7.2. Desarrollo embrionario

El desove de *Panopea globosa* se realizó mediante el uso de inductores químicos y se utilizaron 6 machos y 2 hembras. Previo a la fertilización se evaluó mediante observaciones

al microscopio la calidad de los gametos, en el caso de los óvulos se observó que presentaran forma ovoide y en los espermatozoides se verificó que tuvieran movilidad constante.

Para fertilizar el ovulo se utilizó una proporción de 7 espermatozoides. El tiempo de fecundación fue de 1 hora, durante el cual se registró un porcentaje de fecundación del 92%. Cinco minutos después se observó la membrana de fecundación. Después de 15 minutos de observo que el 40% de los óvulos presentaban la expulsión del primer cuerpo polar y a los 45 minutos el 30% de los óvulos fecundados empezaron con la segunda, tercera y cuarta división celular (Fig. 6). La etapa de mórula y blástula se presentaron después de 6 horas de la fecundación, la etapa de blástula comenzó a presentar movimientos giratorios sobre un mismo eje (blástula giratoria). A las 10 horas post-fecundación el 100% de los óvulos se encontraba en la etapa de gástrula. Así mismo después de 14 horas post fecundación se encontraban en estadio de larva trocófora (Fig. 6), registrando una supervivencia del 100% con 180,000 larvas trocóforas.

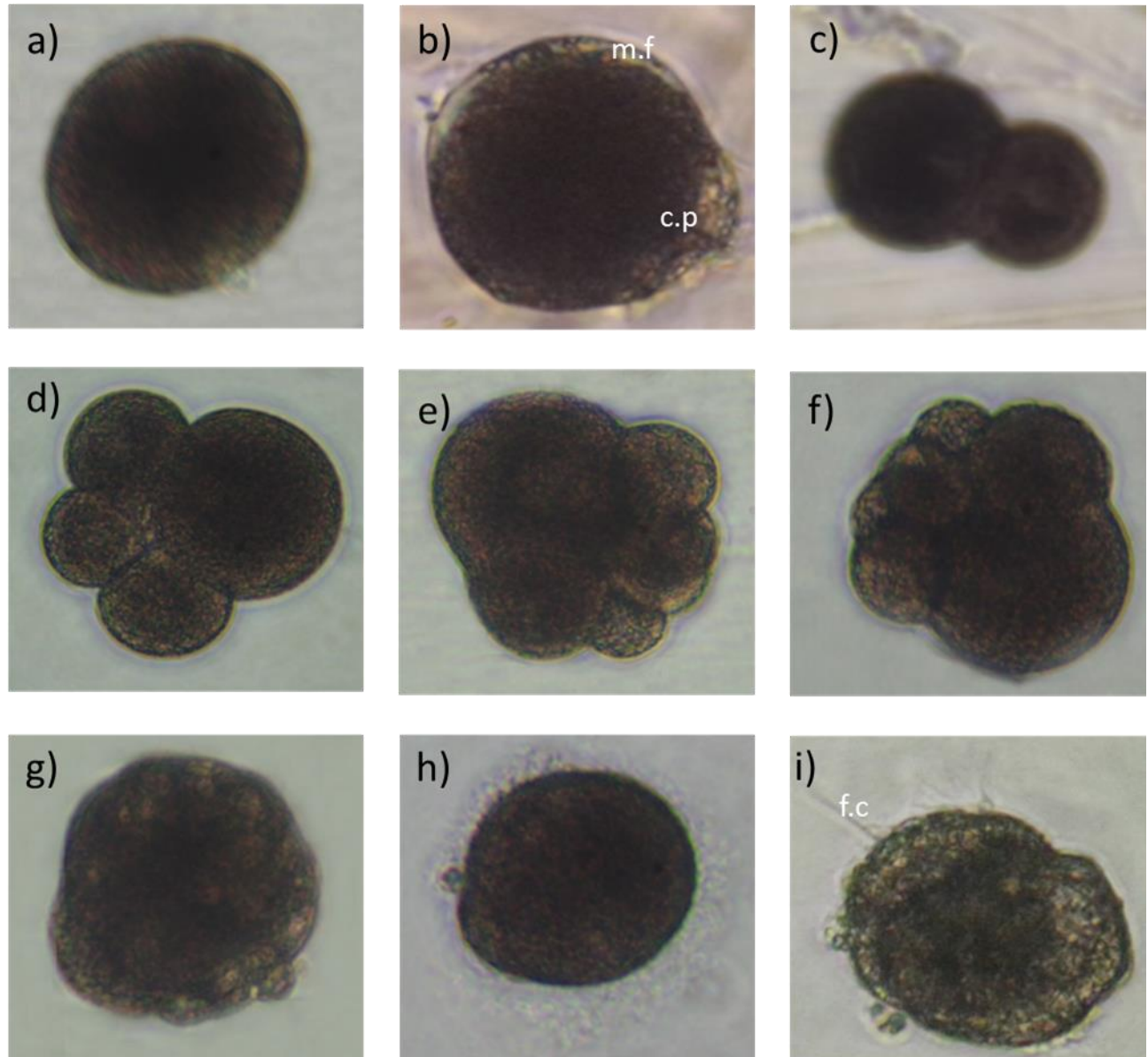


Figura 6. Fases del desarrollo embrionario de *Panopea globosa*. a) óvulo; b) óvulo fecundado y expulsión del primer cuerpo polar; c) primera división celular; d) segunda división celular; e) tercera división celular; f) cuarta división celular; g) Mórula; h) blástula; i) larva trocófora; m.f: membrana de fecundación; c.p: cuerpo polar; f.c: flagelos centrales.

### 7.3. Desarrollo larval

Durante el desarrollo larval se identificaron 5 estadios, los cuales fueron larva trocófora, larva "D" (charnela recta), veliger temprana, veliger intermedia y pediveliger. Además, se identificaron dos etapas post metamorfosis, siendo estas la etapa de pos-larva y semilla. Cada etapa presentó diferentes características morfológicas, de comportamiento y fisiológicas. Estas son descritas a continuación.

#### a) Larva trocófora

Durante este estadio, la larva trocófora registró tamaños promedio de  $80 \pm 10 \mu\text{m}$ , además presentó características morfológicas como la presencia de dos flagelos centrales, la presencia de un cinturón de flagelos en la parte media y constante natación, es importante mencionar que durante este tiempo no se suministró alimento (Fig. 6). Al término de este estadio la supervivencia no disminuyó y el 100% de las larvas se encontraban en el siguiente estadio larval conocido como larva de charnela recta (D).

#### b) Larva de charnela recta (D)

Después de 28 horas de la fecundación a temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  se presentó el estadio de larva "D". Estas larvas presentaron la formación de la primera concha larval, además de tener la presencia de velo retráctil el cual presenta una corona de cilios y una par de cilios ligeramente más largos que el resto, este velo es funcional para la alimentación, respiración y mediante el cual la larva en esta etapa presenta gran actividad de natación; además de la formación clara del estómago, distinguiéndose un color dorado-verdoso por la ingestión de microalgas durante su alimentación. (Fig. 7, A y B).

El tiempo de duración de este estadio fue de 4 días, en los cuales se registraron diferentes tamaños, todos los tratamientos iniciaron con una talla promedio de  $141 \pm 1 \mu\text{m}$

(Fig. 8) y al finalizar este estadio, los tratamientos que fueron alimentados con las dietas *Isochrysis* sp y *Chaetoceros calcitrans*, ambos en medio con fertilizantes agrícolas tuvieron mayor crecimiento en la longitud antero-posterior ( $161 \pm 25 \mu\text{m}$  para ambos tratamientos) (Fig. 8). En cambio en los tratamientos que se le suministró microalgas producidas en medio f/2 presentaron menos crecimiento con valores de  $155 \pm 23 \mu\text{m}$  al alimentarlos con *Isochrysis* sp,  $143 \pm 15 \mu\text{m}$  con *C. calcitrans* y  $148 \pm 15 \mu\text{m}$  al utilizar como alimento la mezcla de *Isochrysis* sp y *C. calcitrans* (Fig.8), detectándose diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos (ver tabla III). Así mismo los tratamientos en medio f/2 registraron supervivencia mayores (*Isochrysis* sp 67%, *C. calcitrans* 75% y mezcla 64%) (Fig. 9) que aquellos tratamientos donde las larvas recibieron microalgas cultivadas con fertilizantes agrícolas (*Isochrysis* sp 66%, *C. calcitrans* 66% y mezcla 61%) (Fig.9).

#### c) Larva veliger temprana

Este estadio larval fue observado a partir del 5<sup>to</sup> día de cultivo y se caracterizó por un crecimiento alométrico de la concha en la región del umbo, ocasionando un cambio en la curvatura de la charnela, que dejó de ser una estructura recta, asumiendo un perfil semi-curvo en la unión de las valvas (Fig. 7, C y D).

El valor promedio de la longitud dorso-ventral inicial para este estadio mostraron diferencias significativas (ver tabla III). Los valores mayores en longitud correspondieron a los tratamientos con fertilizantes agrícolas (*Isochrysis* sp y *C. calcitrans* con  $200 \pm 25 \mu\text{m}$  y la mezcla con  $183 \pm 24 \mu\text{m}$ ) (Fig. 8). En cambio los tratamiento en medio f/2 tuvieron talla promedio de  $155 \pm 23 \mu\text{m}$  para *Isochrysis* sp,  $178 \pm 21 \mu\text{m}$  para *C. calcitrans* y  $181 \pm 25 \mu\text{m}$  para la mezcla (Fig. 8). Entre las características morfológicas y de comportamiento que se

manifestaron durante este tiempo fue la disminución en el tamaño visible del velo y de la actividad natatoria. Sin embargo el aparato digestivo se continuó apreciando con claridad.

Al final de este estadio los porcentajes de supervivencia disminuyeron notablemente, pero los tratamientos en medio f/2 registraron mayores porcentajes de supervivencia (*Isochrysis* sp 56%, *C. calcitrans* 61% y la mezcla 48%) (Fig. 9) que los tratamientos en medio con fertilizantes agrícolas cuyos valores de supervivencia fueron: 42% para *Isochrysis* sp y *C. calcitrans* y 47% para la mezcla (Fig. 9).

El estadio de larva veliger temprana tuvo una duración de 4 días. Los tratamientos que fueron alimentados con las microalgas producidas con fertilizantes agrícolas obtuvieron en promedio un incremento de longitud dorso-ventral del 12% (*Isochrysis* sp  $222 \pm 25 \mu\text{m}$ , *C. calcitrans*  $208 \pm 25 \mu\text{m}$  y  $240 \pm 24 \mu\text{m}$ ) (Fig. 8) a diferencia de los tratamientos en medio f/2 que obtuvieron un aumento promedio del 18% registrando en *Isochrysis* sp  $187 \pm 28 \mu\text{m}$ , en *C. calcitrans*  $209 \pm 23 \mu\text{m}$  y en la mezcla de  $212 \pm 36 \mu\text{m}$  (Fig. 8).

#### a) Larva veliger intermedia

Esta fase inicio en el día 9 de cultivo y tuvo una duración de 4 días al igual que la fase anterior, sin embargo se caracterizó por el inicio de la formación del pie, el cual era visible en la cavidad corporal, además disminuyo la actividad natatoria permaneciendo más tiempo en el fondo, sin embargo en esta fase el velo presento gran actividad en los cilios y este se contrae constantemente (Fig. 7, E y F).

Durante el tiempo de esta fase la longitud dorso-ventral se mantuvo similar en todos los tratamientos, registrando valores para los tratamientos con fertilizantes agrícolas de  $277 \pm 55 \mu\text{m}$  en *Isochrysis* sp,  $259 \pm 31 \mu\text{m}$  en *C. calcitrans* y para la mezcla  $280 \pm 36 \mu\text{m}$  (Fig.

8), así mismo para los tratamientos en medio f/2 los valores fueron de  $256 \pm 39 \mu\text{m}$ , de  $277 \pm 32 \mu\text{m}$  y de  $276 \pm 44 \mu\text{m}$  en la mezcla (Fig. 8). Los tratamientos que presentaron menor incremento en longitud fueron aquellos alimentados con *Isochrysis* sp en medio f/2 y *C. calcitrans* en medio con fertilizantes agrícolas (Fig. 8). Al inicio de esta fase no hubo diferencias significativa ( $P < 0.05$ ), sin embargo, al final se encontraron diferencias significativas (ver tabla II).

La supervivencia de esta fase, en los tratamientos alimentados con *Isochrysis* sp producida con fertilizantes agrícolas fue 25%, mientras que en medio f/2 fue de 43%. Sin embargo los tratamientos alimentados con *C. calcitrans* muestran diferencias significativas debido a que el tratamiento en fertilizantes agrícolas presentó un 19% de supervivencia, en cambio el tratamiento en medio f/2 presentó 52% de supervivencia este valor fue el mayor de todo los tratamientos. Los tratamientos alimentados con la mezcla de ambas microalgas tanto en fertilizantes agrícolas como en medio f/2 presentaron valores similares (39%) (Fig. 9).

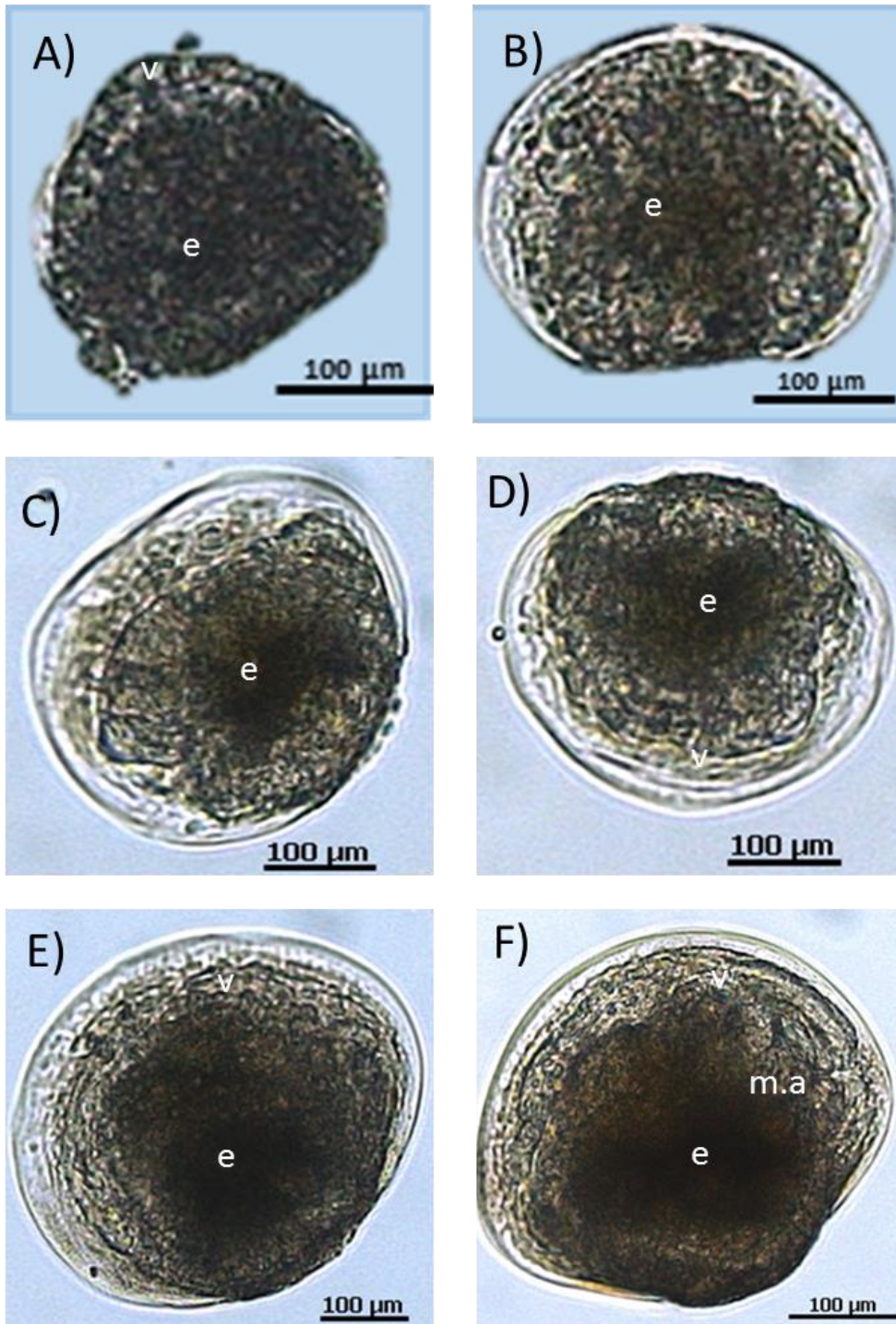


Figura 7. Desarrollo larval de *Panopea globosa* alimentada con diferentes dietas de microalgas. A) Inicio de larva de charnela recta o "D"; B) final de larva de charnela recta o "D"; C) Inicio de larva veliger temprana; D) final de larva veliger temprana; E) inicio de larva veliger intermedia; F) final de larva veliger intermedia. V: velo; e: estomago; m.a: músculos abductores.

#### b) Larva pediveliger

Previo a la fase de metamorfosis se presentó el estadio pediveliger el cual inició en el día 13 de cultivo y tuvo una duración de 4 días. El valor promedio de la longitud dorso-ventral en los 6 tratamientos de  $303 \pm 24 \mu\text{m}$ . Los tratamientos con *Chaetoceros calcitrans* en medio f/2 y fertilizantes agrícolas presentaron la menor longitud en este estadio ( $294.27 \mu\text{m}$  y  $260.55 \mu\text{m}$  respectivamente) (Fig. 8). Los tratamientos alimentados con la dieta mixta de microalgas tanto en medio f/2 y fertilizantes agrícolas presentaron mayor supervivencia previo a la metamorfosis (34.3%) y la dietas antes mencionadas mantuvieron los valores post metamorfosis (21.3% y 20.3% respectivamente) (Fig. 10) y los tratamientos alimentados con *Isochrysis* sp la cual se cultivó en medio f/2 y fertilizantes presentaron valores de 22.3% y 13% respectivamente, no obstante post metamorfosis se presentaron valores del 14.3% y 10% (Fig. 10), diferencias significativas entre los tratamientos con *Chaetoceros calcitrans* en f/2 y fertilizantes obteniendo este último supervivencia previo a la metamorfosis de 3.33% y post metamorfosis de 1% a diferencia del tratamiento con f/2 el cual obtuvo 33% y 12% respectivamente (Fig. 10).

Las características propias de este estadio fue la presencia de un pie funcional el cual se extendía hacia fuera a través de las valvas en busca de sustrato, además se notó la visible disminución del velo y de los cilios. Así mismo en esta fase se inicia la formación de los septos branquiales (Fig. 11, a y b).

#### c) Postlarva

La fase de postlarva es el siguiente estadio después de la metamorfosis, en esta fase el organismo tiene características definidas como lo es la formación interna de branquias, y la concha deja de ser de aragonita para pasar a formarse de calcita (Arámbula et al., 2008). La

presencia de un sifón ya es notoria aunque todavía faltan de realizarse cambios morfológicos que darán paso a la fase de semilla (Fig. 11, c y d).

Esta fase se presentó en el día 17 de cultivo dando fin al desarrollo larval y tuvo una duración de 2 días. La menor supervivencia (3%) que se registró en esta fase pertenece al tratamiento alimentado con *C. calcitrans* en medio con fertilizantes agrícolas a diferencia del tratamiento con *C. calcitrans* en medio f/2 que registro 33%. En contraste la supervivencia los tratamientos con *Isochrysis* cultivada con fertilizantes agrícolas fueron de 13% y 22% en medio f/2. En cambio, los tratamientos alimentados con la dieta mixta de microalgas mantuvieron valores del 36% de supervivencia en ambos tratamientos (Fig. 10).

#### d) Semilla

En la etapa de semilla, los organismos presentaron un tamaño promedio de  $377 \pm 36 \mu\text{m}$ . Los tratamientos alimentados con *C. calcitrans* en medio f/2, *Isochrysis* sp con fertilizantes y la mezcla con fertilizantes registraron tamaños de  $406.4 \pm 63 \mu\text{m}$ ,  $409.14 \pm 70 \mu\text{m}$ , y  $400 \pm 55 \mu\text{m}$  respectivamente (Fig. 8). El tratamiento alimentado con *C. calcitrans* producido con fertilizantes agrícolas no aumento significativamente el tamaño en comparación con la etapa anterior (pediveliger) registrando  $312 \mu\text{m}$  en la etapa de semilla.

En este estadio termino la evaluación, obteniéndose porcentajes finales de supervivencia de 1% para el tratamiento de *C. calcitrans* producido con fertilizantes agrícolas, siendo este el valor más bajo, a diferencia de *C. calcitrans* en medio f/2 que obtuvo 12% (Fig. 8), los tratamientos con *Isochrysis* sp obtuvieron 10% y 14% (Fertilizantes agrícolas y medio f/2 respectivamente) (Fig. 10). Los tratamientos que registraron mayor supervivencia fueron los alimentados con la dieta mixta de microalgas (21% fertilizantes agrícolas y 20% medio f/2) (Fig. 10).

La principal características de las semillas de *Panopea globosa* fue la visible apreciación de las branquias, presencia de sifón y pie móvil, además de estar completamente formado el sistema digestivo (Fig. 11, e y f).

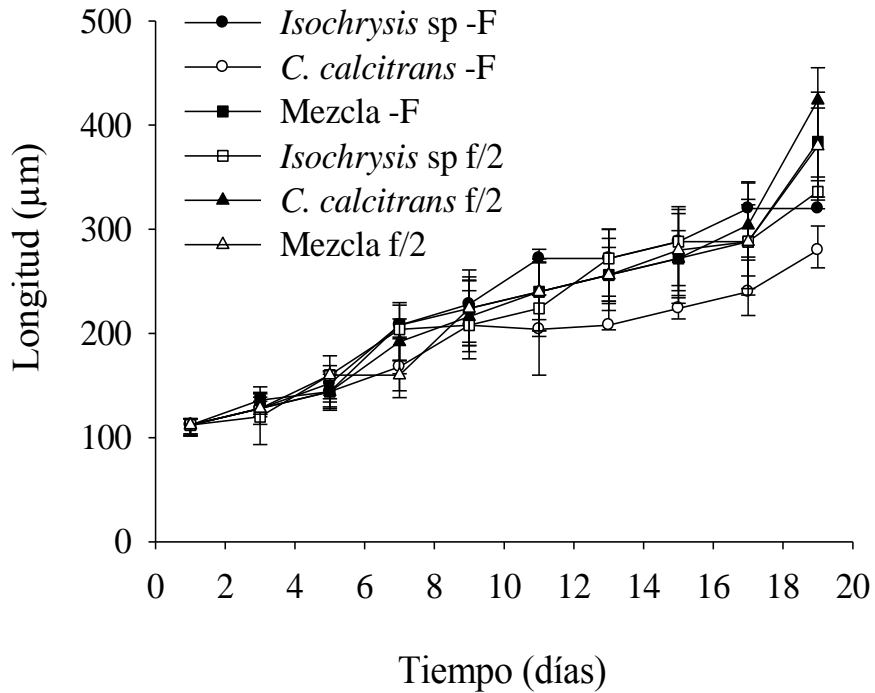


Figura 8. Cambios en la longitud dorso-ventral de *Panopea globosa* alimentada con *Isochrysis* sp, *C. calcitrans* y su mezcla cultivadas en medio f/2 y fertilizantes agrícolas -F.

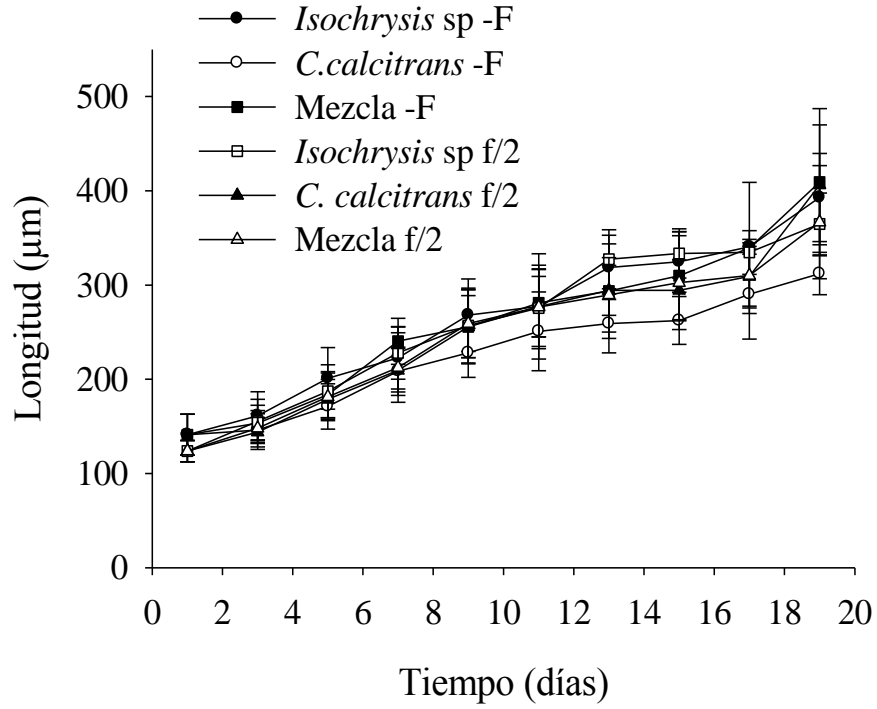


Figura 9. Cambios en la longitud antero-posterior de *Panopea globosa* alimentada con *Isochrysis* sp, *C. calcitrans* y su mezcla cultivadas en medio f/2 y fertilizantes agrícolas -F.

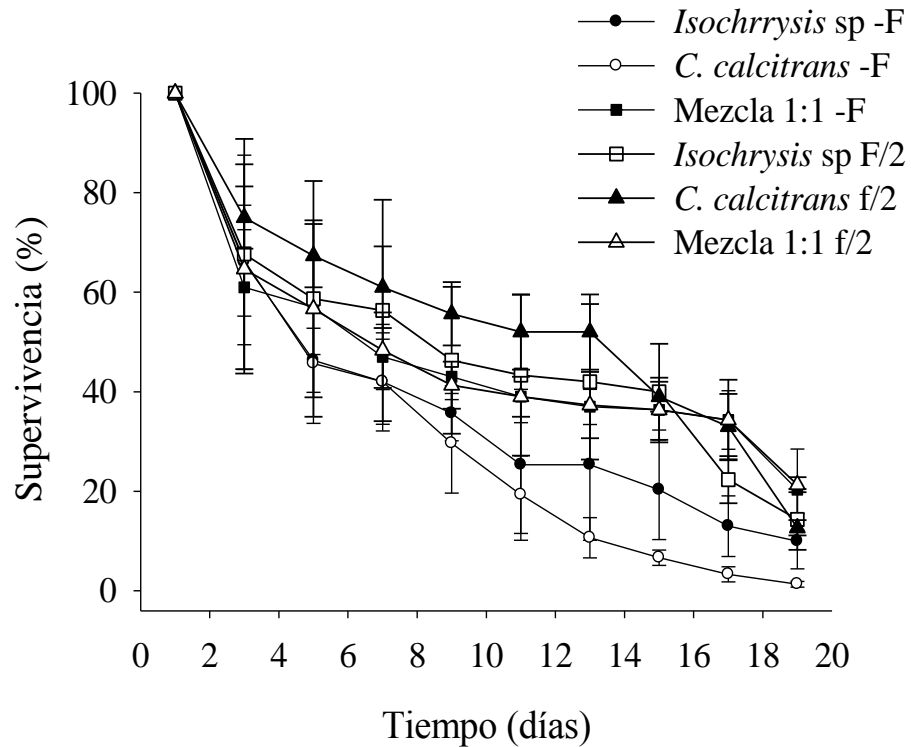


Figura 10. Supervivencia larval promedio de *Panopea globosa* alimentada con diferentes dietas de microalgas cultivadas en medio f/2 y fertilizantes agrícolas -F. La barra vertical indica el error estándar (n=3).

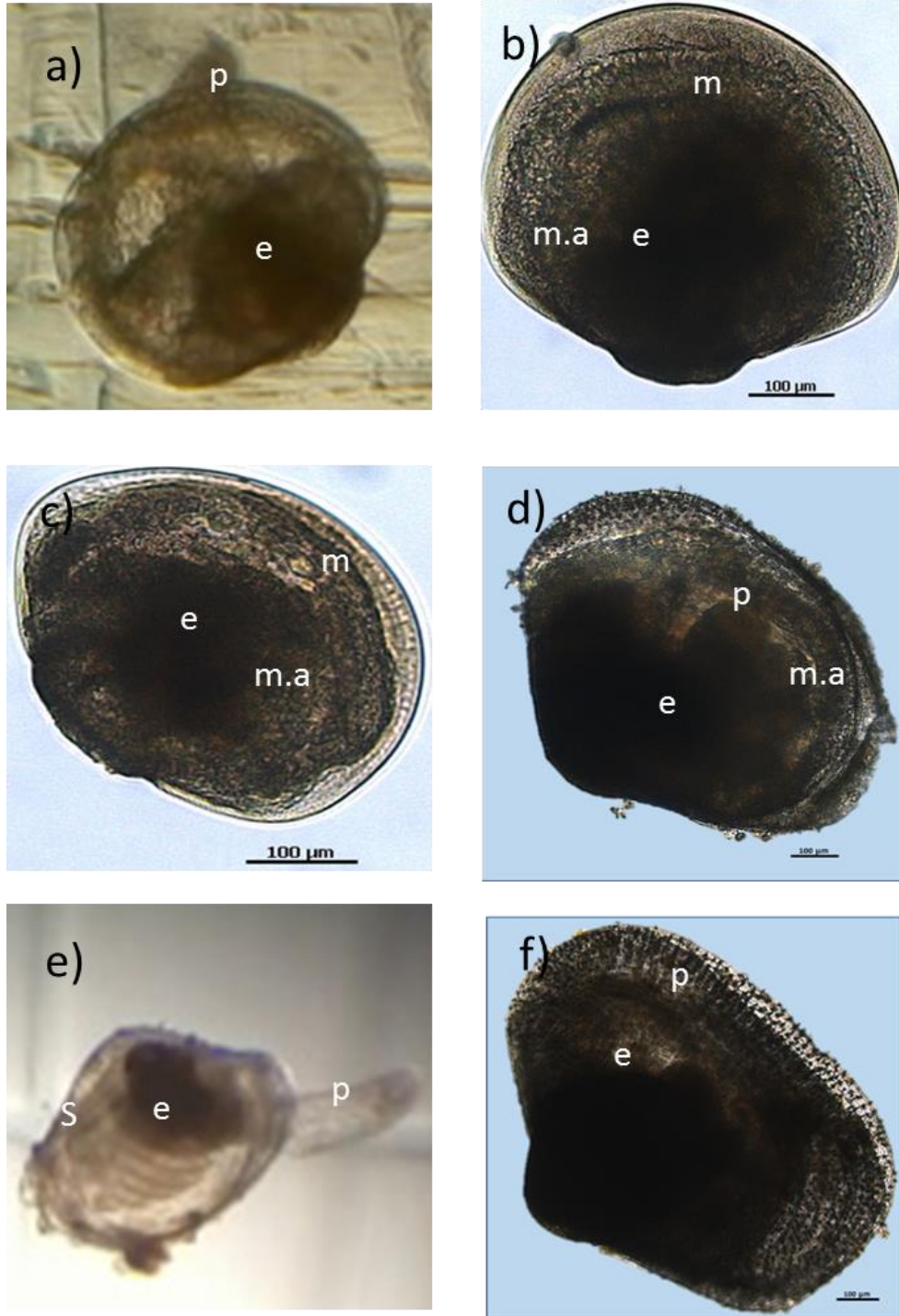


Figura 11. Final del desarrollo larval e inicio de postlarvas de *Panopea globosa*. a) inicio de larva pediveliger; b) final de larva pediveliger; c) inicio de pos-larva; d) final de pos larva; e y f) semilla de 4 días. p: pie; e: estomago; s: sifón; m.a: musculo abductor; m: manto.

Tabla III. Significancia según el contraste analizado por día en los diferentes tratamientos de *Isochrysis* sp, *C. calcitrans* y su mezcla, cultivados en medio f/2 de Guillard (1975) y fertilizantes agrícolas (Valenzuela et al., 1999).

d.f = 5			
Día	Valor F	Valor P	$p < 0.05$
0	0.211	0.957	NS
1	4.117	<0.001	S
3	4.974	<0.001	S
5	7.106	<0.001	S
7	5.196	<0.001	S
9	1.212	0.305	NS
11	9.37	<0.001	S
13	9.044	<0.001	S
15	3.474	0.006	NS
17	3.031	0.019	S

Contrastes analizados por día: *Isochrysis* F vs *Isochrysis* f/2, *Isochrysis* vs *Chaetoceros* f/2, *Isochrysis* F vs Mezcla f/2, *Isochrysis* F vs *Chaetoceros* F, *Isochrysis* F vs Mezcla F, *Chaetoceros* F vs *Isochrysis* f/2, *Chaetoceros* F vs *Chaetoceros* f/2, *Chaetoceros* F vs Mezcla f/2, Mezcla F vs *Isochrysis* f/2, Mezcla F vs *Chaetoceros* f/2, Mezcla F vs Mezcla f/2, Mezcla F vs *Chaetoceros* F, *Isochrysis* f/2 vs *Chaetoceros* f/2, *Isochrysis* f/2 vs Mezcla f/2 y *Chaetoceros* vs Mezcla f/2.

#### 7.4. Larvas deformes

Al inicio de la fase veliger temprana, se observó la presencia de larvas que no presentaban características morfológicas (Fig. 12) y longitudes dorso-ventrales propias de larvas en dicha fase, por lo cual fueron catalogadas como larvas deformes y separadas del resto de los cultivos y fue hasta el término del desarrollo larva que se presentaron larvas deformes.

Los tratamientos alimentados con la dieta de *Isochrysis* cultivada en medio f/2 presentaron un 27% total de larvas deformes a diferencia del tratamiento en medio con fertilizantes agrícolas con un 21% (Fig. 13). En cambio los tratamientos con *Chaetoceros calcitrans* en medio f/2 y fertilizantes agrícolas presentaron 20 y 32% total de larvas deformes. El porcentaje total de larvas deformes en los tratamientos alimentados con la mezcla de microalgas en los dos medio de cultivo fue del 25% (Fig. 13).

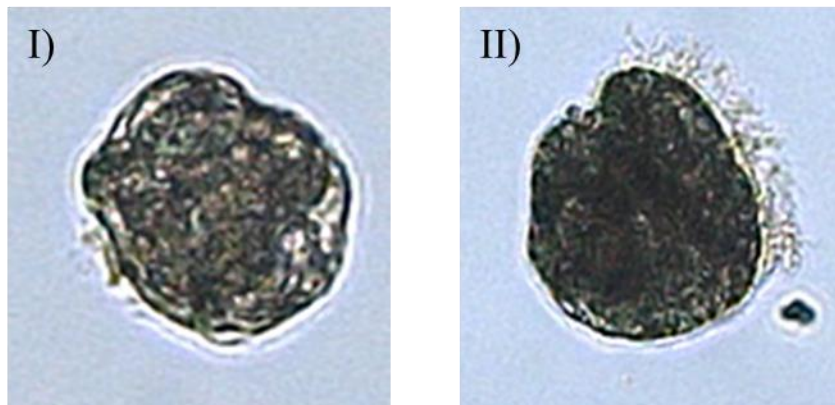


Figura 12. Larvas deformes presentes en el cultivo de *Panopea globosa* alimentadas con diferentes dietas de microalgas.

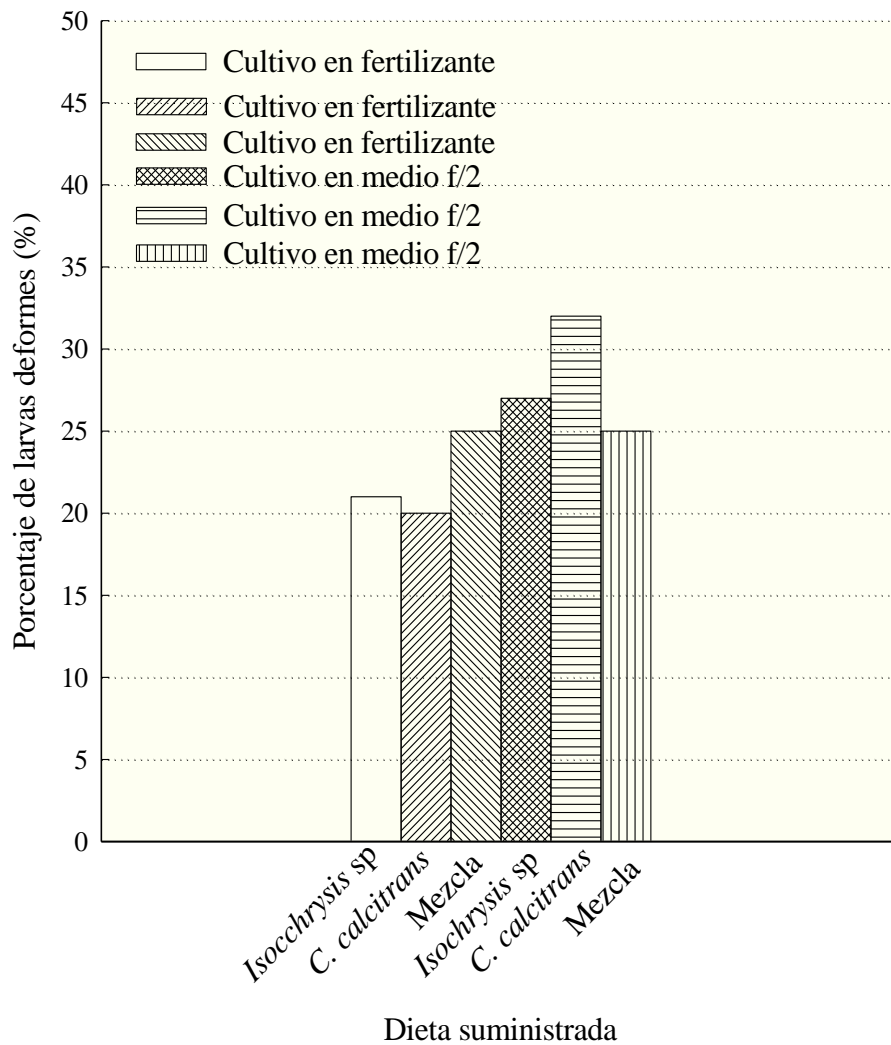


Figura 13. Porcentaje total de larvas deformes presentes en los diferentes tratamientos del cultivo de *Panopea globosa*.

## 8. Discusión

Actualmente los estudios de *Panopea globosa* se han centrado en la evaluación de las poblaciones naturales así como de las diferencias genéticas entre dichas poblaciones y las diferencias entre las especies del género *Panopea*. Pero pocos estudios han evaluado el uso

de medios alternativos para conocer la factibilidad del uso de nutrientes agrícolas y el efecto del alimento en el desarrollo ontogénico de esta especie.

En este estudio se observó que el desarrollo embrionario de *Panopea globosa* tiene una duración de 14 horas a una temperatura de 22°C. En comparación con otros moluscos bivalvos el tiempo de fecundación de *P. globosa* es relativamente rápido, debido que en *Mytilus galloprovincialis* este desarrollo dura 29 horas (Ruiz et al., 2008) y en la almeja *Gari solida* el tiempo del desarrollo embrionario es de 23-24 horas (Contreras et al., 2014). Es importante señalar la diferencia de temperatura de los estudios citados ya que *P. globosa* se cultivó a 22°C, *Mytilus galloprovincialis* a 17°C y *Gari solida* a 15°C. El incremento en la temperatura modifica la actividad metabólica por lo tanto los organismos se desarrollan más rápidamente, sin embargo, Arney et al. (2015) indica que durante el desarrollo embrionario se tiene la capacidad de tolerar cambios, pero si estos cambios son con temperatura baja alargara el proceso de desarrollo embrionario. Por otra parte, el tamaño del óvulo de *Panopea globosa* presentado en este estudio coincide con las características morfológicas que describe Goodwind y Pease (1989) en *P. generosa* lo cual indica que entre las dos especies no se presentan características morfológicas diferentes entre ambas especies.

En el cultivo larval de *Panopea globosa* la fuente primaria de alimentación son microalgas, por ello diferentes investigaciones se han dedicado a la búsqueda de microalgas que satisfagan la demanda nutricional que estos organismos requieren, no obstante, es necesario que cumplan ciertos requerimientos nutricionales pero que a su vez sea un cultivo rentable, es por ello que el uso de fertilizantes agrícolas como fuente de nutrientes para el cultivo de diferentes especies de *Isochrysis* spp y *Chaetoceros* spp utilizadas para la

alimentación larval de *Panopea globosa* han sido comparado por autores como Valenzuela et al. (1999) y Pacheco-Vega et al. (2010), los cuales afirman que el uso de fertilizantes agrícolas no altera la densidad celular obtenida en cultivo. Por su parte Breezy et al. (2000) y González-Reyes (2000) evaluaron el cultivo de *Isochrysis* sp y *Chaetoceros calcitrans* utilizando como fuente de nitrógeno, urea y nitrato de amonio. Los resultados de dichos autores difieren entre sí, debido a que Breezy et al. (2000) registró densidades celulares para ambas especies de microalgas muy similares a las registradas en esta investigación y González-Reyes (2000) obtuvo menor densidad celular. Sin embargo, la diferencia entre los estudios antes mencionados y el presente es la adición de CO<sub>2</sub>, siendo este un componente fundamental para el proceso de fotosíntesis celular. En un estudio reciente, García-Vicente (2010) menciona que la ausencia de dióxido de carbono afecta la división celular debido principalmente a la disposición de carbono inorgánico para la fotosíntesis algal, ya que, al incrementar la densidad celular, las células microalgales consumen mayor cantidad de CO<sub>2</sub> y la ausencia de éste modifica la composición celular.

Por otra parte, Hernández-Reyes (2010) y Nieves-Soto et al. (2011) mencionan que la fuente de nitrógeno influye directamente en la concentración celular, siendo el amonio un nutriente que puede ser consumido con mayor rapidez y convertido a nitrógeno orgánico por la células debido al bajo costo energético de asimilación que éste presenta, no obstante, en el presente trabajo se encontró que la fuente de nitrógeno no ocasiona cambios significativos en la densidad celular de *Isochrysis* sp y *C. calcitrans*, por lo tanto, la fuente del nutriente puede promover o disminuir el crecimiento celular pero esto depende del estado de oxidación de la fuente de nitrógeno usada para el cultivo. También, estudios realizados por Christine y Band (1997) y Pacheco-Vega et al. (2010) indican que

*Chaetoceros* sp, *Chaetoceros muelleri*, *Nannochloropsis* sp y *Dunaniella* sp no tienen cambios en la concentración y tipo de lípidos, carbohidratos y proteínas al ser cultivadas con medio f/2 de Guillard y fertilizantes agrícolas.

Así mismo, Ochoa-Castillo (2006), Valenzuela-Espinoza et al. (1999) y McAnally-Salas et al. (1992); analizaron el cultivo de microalgas en fertilizantes agrícolas y su efecto en el cultivo larval de *Oreochromis* sp, *Litopenaeus vannamei* y *Mytilus edulis* (respectivamente). Los resultados de estos estudios fueron positivos, registrando que el uso de fertilizantes agrícolas no altera la supervivencia larval de dichos organismos acuáticos y mencionan porcentajes de supervivencia superiores al 80%. Además McAnally-Salas et al. (1992) menciona que la cantidad de lípidos, proteínas y carbohidratos no se ve afectada por el uso de fertilizantes agrícolas, permitiendo esto proporcionar a los organismos en cuestión la nutrición adecuada para llevar a cabo actividades fundamentales y llegar a la etapa de metamorfosis.

Información acerca del efecto de proporcionar dietas mixtas de microalgas al cultivo de *P. globosa* es limitada. Montes-Orozco (2014) estudio el efecto de estas dietas en *P. generosa*, registró que el uso de dietas mixtas de microalgas (*Isochrysis* sp y *Chaetoceros calcitrans*, igual a este estudio) son aptas para el uso en la alimentación de esta especie, sin embargo, citado estudio menciona que la dieta monoalgal de *Isochrysis* sp se generó mayor crecimiento en larvas. Estos resultados difieren con lo encontrado en el presente estudio, ya que la dieta que brindó mayor crecimiento en longitud de concha y mayor sobrevivencia fue la dieta mixta de *Isochrysis* sp y *C. calcitrans* cultivadas con fertilizantes agrícolas (21%), en cambio la dieta con *Isochrysis* sp tuvo valores inferiores (14%). Por otra parte Ren et al. (2015) Evaluó en juveniles de *P. generosa* el efecto de dietas mixtas de *Isochrysis* (T-Iso) y *Chaetoceros muelleri*, concluye que el uso de dietas mixtas es apto

para el cultivo de estas especie y que produce mayor crecimiento y supervivencia debido a la proporción de ácidos grasos que las microalgas contienen, siendo estos resultaos similares a los presentados en este estudio.

Además de suministrar dietas mixtas de microalgas, en este estudio también se evaluó el efecto de dietas unialgales de *Isochrysis* sp y *Chaetoceros calcitrans* sobre el desarrollo de *P. globosa*. En el tratamiento donde se usó como alimento *C. calcitrans* cultivado con fertilizantes agrícolas obtuvo el menor porcentaje de supervivencia y en longitud dorso-ventral (1% y  $290 \pm 40 \mu\text{m}$ ). Resultados similares a este estudio, también han sido reportados por Montes-Orozco (2014) en *P. generosa* (4% de supervivencia y  $294 \pm 9.8 \mu\text{m}$  de longitud dorso-ventral), con la diferencia que el autor antes citado cultivo *C. calcitrans* en medio f/ de Guillard (1975) y en el presente trabajo el mismo tratamiento tuvo mejores resultados, aunque estos resultados son menores a los registrados para las dietas unialgales de *Isochrysis* sp y las mezclas 1:1 en este estudio. El uso de la especie *Chaetoceros* sp ha sido utilizada para la alimentación de diversos moluscos bivalvos proporcionando resultados que otras especies de microalgas (Helm et al., 2006), Ren et al. (2015) menciona que una microalga para proveer calidad nutricional debe tener ciertas características de digestibilidad dictadas por su tamaño celular, presencia o ausencia de espículas o diversas cualidades celulares que impidan que se sea digestible para los organismo. En este caso *C. calcitrans* presenta 4 setas y una capa de sílice en la membrana celular pudiendo ser esta la razón de su baja digestibilidad y probablemente esto ocasiona el retraso en crecimiento longitudinal y supervivencia de *P. globosa*.

De acuerdo a Aranda-Burgos et al. (2014) y Marshall et al. (2010) una forma para comprobar la calidad nutricional presente en microalgas como alimento es evaluar la supervivencia larval, crecimiento en concha y metamorfosis en organismos bivalvos. Por

esta razón se evaluaron estas tres características en el presente estudio, obteniendo un porcentaje de supervivencia máxima del 21% y una longitud dorso-ventral de  $339\pm 40\mu\text{m}$ . Al comparar los resultados de este trabajo con otros estudios de *Panopea globosa*, Buitimea-Álvarez registró un 28% de supervivencia y Ferreira-Arrieta un 38% siendo estos mayores a los del presente estudio, no obstante, es importante aclarar que Ferreira-Arrieta (2012) evaluó la capacidad digestiva en larvas de *P. globosa*, por lo que estas fueron alimentadas a saciedad durante tiempos determinados a diferencia de Buitimea-Álvarez (2011) quien alimento larvas de *Panopea globosa* de la misma manera como se realizó en este estudio aumentando la ración alimenticia conforme a los estadios larvales que presentaba el cultivo. De igual manera fueron evaluadas la longitud dorso, siendo el presente estudio el que coincide con la longitud dorso-ventral previo a la metamorfosis con Ferreira-Arrieta (2012) ( $339\ \mu\text{m}$  y  $332\ \mu\text{m}$  respectivamente).

Por otra parte, el tiempo del desarrollo larval de *Panopea globosa* fue 15 días en este estudio. Sin embargo, ha sido reportado que para esta especie el tiempo de desarrollo larval es de 14 días pudiéndose extender a 15 días dependiendo de las condiciones en las que se encuentre el cultivo. También, se indica que la temperatura optima de cultivo es de  $26^{\circ}\text{C}$  (Buitimea-Álvarez, 2011 y Ferreira-Arrieta, 2012).

La presencia de larvas deformes en un cultivo puede ser indicador de deficiencia nutricional en los organismos. En el presente estudio se reporta la presencia de larvas deformes, las cuales fueron apreciadas hasta la etapa de larva pediveliger temprana y su presencia termino una vez culminada la fase de metamorfosis. Pocos estudios han reportado estas observaciones relacionadas con la especie. De estas observaciones se infiere que la presencia de estos organismos son debidos a la nutrición de los reproductores, ya que García-Esquivel et al. (2013) señala que la nutrición en los reproductores es fundamental

para la obtención de gametos de buena calidad y por lo tanto larvas en buen estado. Así como también el tiempo de reproducción es un factor crítico para la obtención de gametos viables (Arámbula et al., 2008) y si se considera que el producto gonadal de los organismos se este estudio se realizó durante el mes de enero, tiempo en el cual *P. globosa* se encuentra al final de su periodo reproductivo.

## 9. Conclusiones

- Desarrollo embrionario de *Panopea globosa* tiene una duración de 19 horas a 22°C y es similar que otros moluscos bivalvos.
- El uso de fertilizantes agrícolas produce densidades celulares similares de *Isochrysis* sp y *C. calcitrans* que el medio f/2.
- El costo de producción con fertilizantes agrícolas es 56% menor que el medio f/2 de Guillard (1975).
- Dietas mixtas de *Isochrysis* sp y *C. calcitrans* cultivadas con fertilizantes agrícolas y medio f/2 de Guillard produce mayor supervivencia que dietas unialgales.

## 10. Referencias

Aragón–Noriega A., Chávez–Villalba J., Gribben P., Alcántara–Razo E., Maeda–Martínez A., Arambula–Pujol E., García–Juárez A., Maldonado–Amparo R. 2007. Morphometric relationships, Gametogenetic Development and Spawning of the Geoduck clam *Panopea globosa* (BIVALVIA: HIATELLIDAE) in the central Gulf of California. J. Shellfish Res. 26. 423-431pp.

- Aragón-Noriega E., Pérez-Valencia S. 2012. Determinación de biomasa y bancos de la almeja de sifón *Panopea globosa* (Dall, 1898) en una zona virgen del Alto Golfo de California Interciencia, vol. 37, núm. 9, septiembre, 2012, 651-656 pp.
- Arambula E., García-Juárez A., Alcántara-Razo E., Aragón-Noriega E. 2008. Aspectos de biología reproductiva de la almeja de sifón *Panopea globosa* (Dall 1898) en el Golfo de California. Hidrobiología, 18 (2): 89-98 pp.
- Aranda-Burgos J., Costa F., Nóvoa S., Ojea J., Martínez-Patiño D. 2014. Effects of microalgal diet on growth, survival, biochemical and fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* larvae. Elsevier Aquaculture January 2014, Volumes 420-421, Pages 38-48.
- Arney B., Liu W., Foster I., McKinley S. y Pearce C. 2015. Temperature and food-ration optimization in the hatchery culture of juveniles the pacific geoduck *Panopea generosa*. Journal of Shellfish research, 34 (1) 39-53p.
- Band C. 1999. Efecto de efecto de composición bioquímica de microalgas sobre el valor nutritivo de dos cepas de *Artemia*. Instituto Politécnico Nacional. 78pp.
- Buitimea-Álvarez, M. 2011. Efecto de la salinidad y temperatura sobre el desarrollo larval de *Panopea* spp. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California. 42pp.
- Breezy G., Buitrago E. y Frontano K. 1999. Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura. Fundación La Salle de Ciencias Naturales. Tomo LIX, número 151, enero / junio 1999. 10pp.

- Coronado-Rosas E. 1994. Evaluación de *Isochrysis* var *galbana* aff. *Tahitiana* (Green) (Clon T-Iso) producidas mediante fertilizantes comerciales como alimento para larvas de ostión japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg). Universidad Autónoma de Baja California. 33pp.
- Christine, J. y Band, S. 1997. Generación biotecnológica para la producción de microalgas. Instituto de Industrias-Ciencias del Mar UMAR, México. 6 pp.
- Contreras R., Pacheco E. y Puebla C. 2014. Desarrollo embrionario y larval de *Gari solida* (Gray, 1828) (Bivalvia: Psammobiidae). Lat. Am. J. Aquat. Res. vol.42 no.1 Valparaíso.
- Díaz M., Martínez G. 1992. Efecto de diferentes dietas sobre el balance energético en juveniles de *Argopecten purpuratus* L. Rev. Bio. Mar. Valparaíso 27(2):163-173pp.
- Farías, A. 2008. Nutrición y alimentación en moluscos bivalvos. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte. Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 297–308 pp.
- Ferreira-Arrieta A. 2012. Crecimiento y tasas de alimentación de la almeja de sifón, *Panopea globosa* durante el desarrollo larval. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California. 33 pp.
- García-Esquivel Z., Valenzuela-Espinoza E., Buitimea M., Searcy-Bernal R., Anguiano-Beltrán C., y Ley-Lou F. 2013. Effect of lipid emulsion and kelp meal

supplementation on the maturation and productive performance of the geoduck clam, *Panopea globosa*. *Aquaculture* 2013 v.396-399 pp. 25-31.

García-Vicente, M. 2010. Captura de CO<sub>2</sub> mediante algas unicelulares. Escuela técnica superior de ingenieros agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. 49pp.

Goodwin L. y Pease B. 1989. Species Profiles: Life Histories and Environmental Requirements of Coastal Fish and Invertebrates (Pacific Northwest). Biological Report 82(11.120).

González-Peláez S., Morales-Bojórquez E., Lluch-Cota E. y Bautista-Romero J. 2015. Application of a gnomonic model to estimate the life span and natural mortality in *Panopea globosa*. *Journal of Shellfish Research*, Vol. 34, No. 1, 113-118p.

González-Reyes, A. 2000. Alternativas en el cultivo de microalgas. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil. Ecuador. 81 pp.

Guadamud-Mejía. T. 2012. Desarrollo gonadal de la almeja generosa en Punta Canoa, Baja California, México. Centro de Estudios Superiores de Ensenada. (CICESE). 17pp.

Guillard R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Smith, W.L. and M.H. Chandley (ed.) Culture of marine invertebrates animals. Plenum publishing Corp. New York, 29-60 pp.

Helm M., Borune N., Lovatelli A. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero, un manual práctico. FAO documento técnico de pesca. No. 771. Roma, FAO. 184pp.

Hendrickx, M. E., R. C. Brusca y LL. T. Findley. 2005. Listado y Distribución de la Macrofauna del Golfo de California, México. Parte 1, Invertebrados. 15 Mollusca. Arizona Sonora Desert Museum. ISBN-1-886679-32-0. 429 pp.

- Hernández-Reyes, B. 2010. Remoción de ortofosfato y amonio de agua residual municipal por tres cultivos libres e inmovilizados de microalgas. Universidad Autónoma Metropolitana, México. 57pp.
- Khan A. 2006. Sustainability challenges in the geoduck clam fisheries of British Columbia: Policy perspectives. *Coastal Management Journal* 34(4): 443-453pp.
- León-Hing S. 2012. Cambios histológicos y bioquímicos asociados al ciclo de maduración de la almeja de sifón, *Panopea globosa* en San Felipe, B.C. México. Universidad Autónoma de Baja California-Instituto de Investigaciones Oceanológicas. 86pp.
- McAnally-Salas L., Ocampo-Aranda F. y García-Pámanes L. 1992. Efecto of the microalga *Pavlova lutheri* (DROP) hibberd cultured with agricultural fertilizers on the growth and survival of larvae and postlarvae of the mussel *Mytilus edulis* (L). *Ciencias Marinas*, 18 (4): 57-54p.
- Marshall, R., McKinley, S. y Pearce, C. M. 2010. Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture* 2(1), 33-35.
- Mazón-Suastegui J. 1984. Evaluación de cinco dietas microalgales en el crecimiento larval de *Modiolus capax* INCORAD 18371 y *Pinctada mazatlanica* (HANLEY, 1845). (*MOLLUSCA BIVALVIA*). Instituto Politécnico Nacional Interdisciplinario de Ciencias Marinas. 78pp.
- Montes-Orozco V. 2014. Efecto de dietas monoalgales y mixtas de *Isochrysis* sp y *Chaetoceros calcitrans* en el desarrollo larval de la almeja *Panopea generosa*. Centro de Investigaciones Superiores de Ensenada. 54pp.

- Nieves-Soto M., Cortés-Altamirano R., Gutiérrez-Corona C. y Pacheco-Marges, M. 2011. Producción de fitoplancton a bajo costo. 1. Aislamiento y cultivo de *Monoraphidium* sp. (*Chlorophyceae*) en un sistema estático medio F y cuatro a base de fertilizantes agrícolas. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Autónoma de Mazatlán, México. 10pp.
- Ochoa-Castillo E. 2006. Utilización de dos fertilizantes: orgánicos e inorgánicos en la etapa de alevinaje de la tilapia roja (*Oreochromis* sp) en el Instituto Nacional de Pesca. Universidad Nacional de Loja, Ecuador. 99pp.
- Orensanz J., HandC., Parma A., Valero J. y Hilborn R. 2004. Precaution in the harvest of Methuselah's clams the difficulty of getting timely feedback from slow-paced dynamics. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 61: 1355-1372pp.
- Pacheco-Vega J., Cadena-Roa M., Sánchez-Saavedra M., Tovar-Ramírez D. y Rangel-Dávalos C. 2010. Effects of culture medium and nutrient concentration on fatty acid content of *Chaetoceros muelleri*. Rev. Latinamerican Biotechnology ambiental algal. 1(1):6-15.
- Pauly D. 1996. ITQ: The assumptions behind a meme. Reviews in Fish and Fisheries Biology 6: 109-112pp.
- Pérez-Valencia L. 2011. Variabilidad genética de la almeja de sifón *Panopea globosa* (Dall, 1898) en el noroeste de México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 61 pp.
- Piña P., Medina A., Nieves M., Leal S., López - Elías J., Guerrero M. 2007. Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura.

- Facultad de Ciencias del Mar, Universidad de Sinaloa. Rev., Invest, Mar. 225-236pp.
- Ramírez-Félix E., Márquez-Farías J., Masso-Rojas J., Vázquez-Solórzano E., Castillo-Vargasmachuca S. 2012. La pesca de almeja *Panopea* spp. En el noroeste de México. Ciencia Pesquera 20(2): 57-66pp.
- Ramírez-Félix, E. 2011. Características de la pesquería y aspectos demográficos de la almeja *Panopea globosa* (DALL, 1898) en San Felipe, Baja California, México. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias. UAN. 121 p.
- Ren Y., Liu W., Pearce C., Forster I. y Mckinley R. 2015. Effects of selected mixed – algal diets on growth and survival of early postset juveniles of Pacific Geoduck clam, *Panopea generosa* (Gould, 1850). Aquaculture nutrición. Doi: 10.1111/anu.12145.
- Ruiz M., Tarifeño E., Llanos-Rivera A., Padget C. y Campos B. 2008. Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y larval del mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Revista de biología marina y oceanografía 43(81): 51-61p.
- Secretaría de Ganadería, Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) 2007. Plan de manejo para la pesquería de Almeja Generosa (*Panopea* spp.) en las Costas de Baja California México. 57 pp.
- Tijero-Rojas R. y Salgado-Cabrera H. 2007. Efectos de largo plazo de instrumentos de regulación pesquera: Caso de la pesquería del jurel *Trachurus murphyi* (Nichols, 1920) en la zona centro sur de Chile. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras 36: 49-62pp.

Valenzuela-Espinoza E., Lafarga-De la Cruz F., Millán-Núñez R., Núñez-Cebrero F. 2004.

Crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Rhodomonas* sp  
Cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Ciencias marinas, 31 (1A): 79-  
89pp.

Valenzuela-Espinoza E., Millán-Núñez R. y Núñez-Cebrero F.1999. Biomass production  
and nutrient uptake by *Isochrysis* aff *galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low  
cost alternative to the f/2 medium. Aquacultural Engineering 20: 135–147.