

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



“Utilización de una dieta balanceada inerte como suplemento de microalgas vivas en la maduración gonadal de la almeja de sifón, *Panopea globosa*”

T E S I S

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias

Presenta

ANAYELI QUINTANA LÓPEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. SEPTIEMBRE DEL 2015

“Utilización de una dieta balanceada inerte como suplementos de microalgas vivas en la maduración gonadal de la almeja de sifón, *Panopea globosa*”



TESIS

Que para obtener el grado de


MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA


Presenta

ANAYELI QUINTANA LÓPEZ

Por:


DR. ZAUL GARCIA ESQUIVEL
DIRECTOR DE TESIS


DRA. LUS MERCEDES LOPEZ ACUÑA
SINODAL


DR. JUAN GABRIEL CORREA REYES
SINODAL

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó durante un periodo de 6 semanas el efecto del alimento vivo (*Isochrysis sp.* clone T-ISO, M) suplementado con alimento balanceado microparticulado (F) sobre la maduración gonadal de adultos de *Panopea globosa* (930 ± 92.04 g). Se utilizaron 5 proporciones de M y F (100:0, 50:50, 25:75, 0:100, 25:0) con raciones diarias equivalentes a 1.43×10^{10} cel *Isochrysis sp* (clon T-ISO) kg^{-1} almeja d^{-1} o 0.4 g kg^{-1} almeja d^{-1} . La biomasa total de las almejas se evaluó semanalmente. El peso de la carne, de la concha, de la gónada (PG), el índice de condición y gonadosomático (IG) se evaluaron cada 3 semanas. Al final del experimento se evaluó la fecundidad (F) y el porcentaje de eclosión de los huevos fertilizados. Se evaluó además el efecto del sistema experimental de recirculación sobre la disponibilidad del alimento para las almejas, y se validó la estimación gravimétrica de tasas de ingestión (IR) vs. la evaluación por conteo directo. Se encontró que el 80% de las micropartículas formuladas permanecieron en suspensión hasta 3 h, disminuyendo a 50% a las 5 h y a niveles cercanos a 0 después de 8 h. Se encontró una correlación positiva ($r^2 = 0.81$) y altamente significativa ($P=0.001$) entre las IR estimadas con el método de conteo directo de células vs. el gravimétrico, registrándose IR entre 320,000 (100:0 M) y 508,000 (50:50 M:F) cel T-ISO-equivalentes g^{-1} peso vivo $^{-1}$ h^{-1} . No se observaron diferencias significativas de la biomasa o el peso de la carne y concha de las almejas entre tratamientos, pero si en el PG e IG. Los organismos alimentados con 100% M y 50:50 M.F exhibieron los valores más altos de PG (37.6 ± 2.5 g y 35.0 ± 3 g) y el máximo índice gonadosomático. Los 5 tratamientos experimentales produjeron ovocitos viables y espermias activos al final del experimento, pero hubo un gradiente de fecundidad, donde los tratamientos 100:0 M y 50:50 M:F mostraron la mayor fecundidad (6.5×10^6 ovo hembra $^{-1}$ y 4.3×10^6 ovo hembra $^{-1}$ respectivamente) y % de eclosión de larvas "D" (69 y 42.6%). El presente estudio demostró que las microdietas balanceadas podrían ser potencialmente usadas como dieta complementaria del alimento vivo para el acondicionamiento de *P. globosa*, siempre que se utilice un sistema de recirculación con las características de velocidad del agua y recirculación como las del presente estudio.

Palabras clave: *Panopea globosa*, dietas inertes, acondicionamiento de reproductores, sistemas de recirculación, tasas de ingestión.

DEDICATORIA

A mi padre Fidencio y mi madre Fidelia, por ser mis mejores ejemplos de esfuerzo y superación, porque a pesar de todos los obstáculos siempre me han dado su apoyo incondicional. De no ser por ustedes no habría logrado ser la persona que hoy soy. Gracias por hacerme saber que siempre están ahí y sobre todo por haber creído en mí.

A mis hermanos Aarón, Kein, Lluvia y Anakaren, por su inmenso amor y consejos que me han ayudado a ser mejor persona en la vida.

A mis sobrinos, por hacer mi vida más divertida y darle un toque especial a nuestro hogar.

A mi compañero Luis, con quien he compartido los mejores días de mi vida. Todo este tiempo juntos he aprendido a valorar y admirar la persona que eres, pero sobre todo la persona que eres conmigo. Gracias por haber llegado a mi vida y por haberte quedado en ella.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Maestría en Oceanografía Costera por haberme aceptado y al Laboratorio de Biotecnología de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) por brindarme las facilidades, equipos y materiales necesarios para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado a través de una beca durante la realización de mis estudios.

Quiero agradecer de manera muy especial al Dr. Zaúl García Ezquivel, director del presente trabajo por su paciencia, su confianza y por haberme ayudado a salir adelante en este proceso aún en los momentos más difíciles, brindándome con toda su experiencia las herramientas para hacer todo esto posible.

A los miembros de mi comité de tesis: la Dra. Luz M. López Acuña y el Dr. Juan Gabriel Correa Reyes por sus acertados comentarios y enseñanzas en la ejecución de la tesis.

A Heraclio M. Espinoza por su disponibilidad y apoyo en el análisis de muestras en el laboratorio de Nutrición de la Facultad de Ciencias Marinas.

A mis compañeros de laboratorio: Ale, Itzel, Sandra, Profe Zaúl y Amada por su apoyo en las disecciones y experimentos de fecundidad y eclosión del presente trabajo. A Marco Aurelio por su apoyo en la parte del diseño del sistema experimental y a Gabriel y Chavira en el conteo de partículas y alimentación.

A mis compañeros de generación, por cada uno de sus consejos y por darme la oportunidad de compartir buenos y agradables momentos.

Quiero agradecerles a mis padres por todo su esfuerzo por darme un mejor futuro y un desarrollo académico tan importante para mi vida. A mis hermanos y hermanas que con su alegría y sonrisas me dan ánimos para hacer todo lo que hago en la vida. A Luis por haber estado conmigo en todo este proceso y por ser mi motor para seguir adelante.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	x
ANEXOS	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Reproducción de <i>Panopea globosa</i> en el hábitat natural	4
Reproducción y alimentación de moluscos bivalvos en el laboratorio.....	5
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS PARTICULARES	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Recepción de organismos y estabilización	11
Diseño experimental, mantenimiento y muestreo de organismos.....	11
Formulación y elaboración de dieta experimental.....	15
Evaluaciones.....	17
Crecimiento, índice de condición e índice gonadosomático.....	17
Composición bioquímica de las dietas.....	18
Tiempo de permanencia de las partículas en la columna de agua.....	19
Tamaño de partícula del alimento balanceado.....	19
Tasas de ingestión	20
Proporción de sexos, fecundidad y eclosión.....	21
Análisis de datos.....	23
RESULTADOS	24
Tiempo de permanencia en la columna de agua del alimento balanceado.....	24
Tamaño de partícula	25

Tasas de ingestión	29
Crecimiento, índice de condición y gonadosomático.....	30
Proporción de sexos, fecundidad y eclosión.....	34
DISCUSIONES	37
CONCLUSIONES	42
LITERATURA CITADA	43
APÉNDICES	49
BIOMÉTRIAS	49
GÓNADA	50
INDICE DE CONDICIÓN	51

LISTA DE FIGURAS

	TITULO	Página
Figura 1.-	Sistema experimental de <i>P. globosa</i> . Los 3 elementos principales son: tanque de 100 L (a), airlift (b) y sistema de biofiltro (c). En el interior del tambo están las canastas con organismos. Las flechas representan la dirección de flujo de agua.	12
Figura 2.-	Medidas biométricas registradas durante los muestreos en <i>P. globosa</i> en los 5 tratamientos experimentales (100:0, 50:50, 25:75, 0:100, 25:0 M:F). Peso total (A), peso de la carne (inciso B), peso de la gónada (C) y peso de la concha (D). Las líneas discontinuas describen la longitud total y ancho de la concha.	18
Figura 3.-	Representación gráfica del cambio de la cantidad de alimento balanceado (promedio \pm error estándar) presente en la columna de agua y en el fondo del tanque experimental durante 8 horas.	24
Figura 4.-	Cambios temporales (1, 2, 3, 4 y 5 horas) en la distribución del tamaño de las micropartículas formuladas (μm) en la columna de agua, cuando se dosificó el alimento utilizando garrafrones.	25
Figura 5.-	Cambios temporales (1, 2, 3, 4 y 5 horas) en la distribución del tamaño de las micropartículas formuladas (μm) en la columna de agua, cuando se agregó directamente el alimento al tanque experimental.	26
Figura 6.-	Registro fotográfico de las partículas en la columna de agua cuando se dosificó el alimento utilizando garrafrones. 1 hora (a), 2 horas (b), 3 horas (c), 4 horas (d) y 5 horas (e).	27
Figura 7.-	Registro fotográfico de las partículas en la columna de agua cuando se agregó directamente el alimento al tanque experimental. 1 hora (a), 2 horas (b), 3 horas (c), 4 horas (d) y 5 horas (e).	28
Figura 8.-	Relación entre la cantidad de células estimadas gravimétricamente y mediante conteo directo con el contador	29

	Multisizer 3.	
Figura 9.-	Tasas de ingestión (promedio \pm error estándar) estimadas para <i>P. globosa</i> alimentados con los tratamientos 100:0, 50:50, y 0:100 (alimento vivo: alimento formulado).	30
Figura 10.-	Cambios temporales (promedio \pm error estándar) del peso de gónada de hembras (A) y machos (B) de <i>P. globosa</i> durante el periodo de acondicionamiento. Los organismos fueron alimentados con los tratamientos 100:0, 50:50, 25:75, 0:100 y 25:0 (alimento vivo: alimento formulado).	33

LISTA DE TABLAS

	TITULO	Página
Tabla 1.-	Raciones experimentales y proporción de microalga viva (M): alimento microparticulado formulado (F) ofrecidas diariamente a los adultos de <i>P. globosa</i> durante el periodo de acondicionamiento. A= 100:0; B=50:50; C=25:75; D=0:100; E= 25% de A.	13
Tabla 2.-	Composición de las dietas (%) formulada (F) y microalga (M) usados para la alimentación de adultos de <i>P. globosa</i> durante el experimento.	16
Tabla 3.-	Cambio semanal del peso total de <i>P. globosa</i> alimentados con distintas proporciones de alimento vivo y alimento formulado: 100:0, 50:50, 25:75, 0:100 y 25:0 M:F. Valores promedio y error estándar.	31
Tabla 4.-	Cambio temporal (promedio \pm error estándar) del peso de la concha (PC), peso carne (PR), peso de la gónada (PG, sin sist. digestivo), índice de condición (IC) e índice gonadosomático (IG) registrados en la segunda y tercer fecha de muestreo para los tratamientos 100:0, 50:50, 25:75, 0:100 y 25:0 M:F. Al inicio del experimento (25-Oct) los organismos se encontraban indiferenciados y sus valores iniciales fueron: PC=193 \pm 13 g, PR=279 \pm 17 g, IC=144 \pm 6.	32
Tabla 5.-	Número de machos (M), hembras (H), organismos indiferenciados (I) y proporción de sexos de <i>P. globosa</i> registrados en cada fecha de muestreo. Los organismos fueron acondicionados bajos 5 tratamientos experimentales (100:0, 50:50, 25:75, 0:100 y 25:0 M:F).	34
Tabla 6.-	Fecundidad de hembras (H) y machos (M) de <i>P. globosa</i> después de 6 semanas de acondicionamiento y sometidas a 5 tratamientos experimentales (100:0, 50:50, 25:75, 0:100 y 25:0 M:F). Promedio \pm error estándar.	36
Tabla 7.-	Porcentaje de eclosión de adultos de <i>P. globosa</i> registrados en los 5 tratamientos experimentales (100:0, 50:50, 25:75, 0:100 y 25:0 M:F).	37

ANEXOS

	TITULO	Página
Anexo 1	ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el peso de la concha de <i>P. globosa</i> en la primer fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos).	49
Anexo 2	ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el peso de la carne de <i>P. globosa</i> en la primer fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos).	49
Anexo 3	ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el peso vivo de <i>P. globosa</i> en la segunda fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos)	49
Anexo 4	ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el peso vivo de <i>P. globosa</i> en la tercera fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos)	49
Anexo 5	ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el peso de la gónada de <i>P. globosa</i> en la segunda fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos).	50
Anexo 6	ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el peso de la gónada de <i>P. globosa</i> en la tercer fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos)	50
Anexo 7	ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el IG de <i>P. globosa</i> en la segunda fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos)	50
Anexo 8	ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el IG de <i>P. globosa</i> en la tercer fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos)	50
Anexo 9	ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el IC de <i>P. globosa</i> en la segunda fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos)	51
Anexo 10	ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el IC de <i>P. globosa</i> en la tercer fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos)	51

LISTA DE ABREVIACIONES

Lista de abreviaciones			
UABC	Universidad Autónoma de Baja California	IIO	Instituto de Investigaciones Oceanológicas
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados	ELN	Extracto libre de nitrógeno
M	Microalga	IR	Tasas de ingestión
F	Alimento balanceado	MT	Manto transparente
Pt	Peso total	Cel	Células
AC	Ancho de la concha	IC	Índice de condición
PCR	Peso de la carne	IG	Índice gonadosomático
PC	Peso de la concha	T-Iso	<i>Isochrysis</i>
Lbs	Libras	Vol	Volumen
F	Fecundidad	Gon	Gónada
H	Eclosión	Ovo	Ovocitos

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Panopea* se encuentran distribuidas geográficamente en todo el mundo. México cuenta con dos especies: *P. generosa* en la Costa del Océano Pacífico en Baja California y *P. globosa* en el Golfo de California. Ambas han tenido una demanda importante y un valor comercial considerable en el mercado nacional e internacional. Los registros de pesca indican que las capturas anuales se encuentran alrededor de las 1,200 toneladas por año lo cual ha generado una ganancia económica de más de 18 millones de dólares (Calderón-Aguilera *et al.*, 2010). Debido a su lento crecimiento y a la alta densidad de captura en la pesca, la disponibilidad de estas especies en los bancos naturales puede afectarse considerablemente. Una de las soluciones más viables es la producción de semilla en laboratorio con fines de acuicultura y repoblamiento, por lo que desde el año de 2007 en el Instituto de investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), se han realizado estudios enfocados al desarrollo de la biotecnología, reproducción y producción de semilla de *P. generosa* y *P. globosa*.

En condiciones naturales los moluscos bivalvos se alimentan filtrando partículas inorgánicas, microalgas, detritus, bacterias y otras micropartículas orgánicas (Bayne y Newell, 1983). Cuando se cultivan en laboratorio se utilizan dietas a base de microalgas, debido a que la producción de microalgas es muy costosa, en los últimos años también se han utilizado dietas microparticuladas inertes como dietas alternativas para reducir la dependencia del alimento vivo en el cultivo de moluscos bivalvos. Una dieta microparticulada es aquella con un intervalo de tamaño de 2-30 μm (Guillard, 1958). Las dietas inertes utilizadas hasta la fecha constan de almidón de maíz (Mazón-Suástegui, 1988), germen de trigo (Nevejan *et al.*, 2008), microalgas secas (Curatolo *et al.*, 1993), emulsiones lipídicas (Caers *et al.*, 1999), harina de Kelp (García-Esquivel y Felbeck,

2006), levaduras (Coutteau *et al.*, 1994a) y bacterias (Nell y Wisely, 1983). El problema en el uso de estas dietas es que es muy difícil obtener el tamaño de partícula adecuado para los bivalvos, su baja estabilidad en el agua, que se aglutinan fácilmente y en algunos casos pueden ser poco digeribles. Debido a lo anterior ninguna de las dietas inertes propuestas han logrado la sustitución total de alimento vivo, y por lo tanto solo han sido utilizadas como suplementos.

Más recientemente se han desarrollado micropartículas de composición específica para estudiar los requerimientos de los organismos, como microcápsulas de proteína microenzimada que sirven como medio para transportar lípidos, proteínas y carbohidratos (Langdon, 2003). Así como también cápsulas con cubierta lipídica, microesferas lipídicas y liposomas para transportar moléculas de bajo peso molecular y micronutrientes tales como vitaminas y minerales (Langdon y Waldock, 1981; Soudant *et al.*, 2000). El inconveniente en el uso de estas microcápsulas es que son nutricionalmente incompletas ya que solo aportan un nutriente a los organismos en cultivo, por lo que únicamente pueden utilizarse como suplemento del alimento vivo. No obstante, se han logrado importantes avances para hacer micropartículas de tamaño adecuado específicamente para larvas de moluscos bivalvos.

Una consideración adicional fundamental es que las dietas inertes tienden a la sedimentación, por lo que es necesario implementar sistemas de cultivo que mantengan las partículas en suspensión y disponibles para los moluscos bivalvos en cultivo (Langdon y Siegfried, 1984), considerando también que estos son sésiles y no pueden ir en busca del alimento. Las técnicas utilizadas hasta ahora para la suspensión de partículas inertes se basan en el suministro de aire en el fondo del tanque de cultivo (Langdon y Siegfried, 1984; Knauer y Southgate, 1997; Albentosa *et al.*, 1999; Badillo-Salas, 2009), en el uso de bombas centrifugas para la recirculación del agua (García-Esquivel *et al.*, 2013) o mediante bombas de agua por inyección de aire (“airlifts”) (Cotteau *et al.*, 1994a). Sin

embargo, ninguna de estas técnicas han sido reportadas en lograr la máxima eficiencia en la suspensión de las partículas, ni en otros aspectos importantes como: distribución uniforme de las partículas en el tanque de cultivo, limitación del lavado de nutrientes o acumulación de sólidos (heces y alimento) en zonas de bajo movimiento de agua. El hecho de no contar con un sistema de recirculación específico que asegure la suspensión del 100% de las partículas, posiblemente sea el motivo principal por lo que aún no se ha logrado la sustitución total del alimento vivo en el cultivo de moluscos bivalvos.

Por otra parte, se ha documentado que la temperatura y la alimentación son los principales factores exógenos que controlan la tasa de maduración gonadal de moluscos bivalvos (Utting y Millican, 1997). Por lo tanto, se requieren raciones alimenticias y regímenes de temperatura adecuados durante el periodo de acondicionamiento para asegurar la provisión de nutrientes para la formación y maduración de ovocitos (Fearman *et al.*, 2009). La ración diaria de alimento para bivalvos marinos se ha estimado entre 2 y 6% del peso de tejido seco (Helm *et al.*, 1973). La cantidad correcta generalmente se determina con la medición de tasas de ingestión. *Panopea globosa* requiere una ración relativamente baja de alimento vivo equivalente al 0.04% del peso vivo d^{-1} (García-Esquivel *et al.*, 2013). Durante los últimos 3 años en el laboratorio del IIO-UABC se ha producido larva y semilla de las dos especies de *Panopea* con resultados exitosos, sin embargo, aún existe el problema de los elevados costos de producción debido a la alta cantidad de alimento vivo que demandan los reproductores en la fase de acondicionamiento, por lo cual existe la necesidad de encontrar una dieta inerte alternativa de bajo costo y con las mismas cualidades nutritivas de las microalgas como otra opción de alimentación a los reproductores. La presente investigación se llevó a cabo con el fin de evaluar la efectividad de una dieta balanceada microparticulada sobre la madurez gonadal de *P. globosa* utilizando un sistema de recirculación como método para ofrecer la máxima disponibilidad del alimento.

ANTECEDENTES

Reproducción de Panopea globosa en el hábitat natural

Los bivalvos llevan a cabo un ciclo reproductivo anual que incluye un período de gametogénesis seguido por eventos de desove que puede presentarse una sola vez de manera extendida o varias veces durante el ciclo, seguido por un período de restitución gonadal (Gosling, 2003). *P. globosa* tiene un ciclo reproductivo muy corto de 3 a 5 meses y una fase extendida de descanso en donde las almejas no presentan características reproductivas (Calderón-Aguilera *et al.*, 2010). Las almejas del género *Panopea* son organismos dioicos y no presentan dimorfismo sexual. La gónada forma un conjunto de órganos con el intestino, el estómago y la glándula digestiva (Arámbula-Pujol, 2008).

En organismos de *P. globosa* del Golfo de California se ha reportado la madurez sexual con una talla promedio de 14-15 cm de longitud de la concha (Aragón-Noriega *et al.*, 2007; Arámbula-Pujol *et al.*, 2008). Estos autores mediante análisis histológicos observaron 5 fases de desarrollo gonádico en esta especie: 1) Actividad temprana, 2) Actividad tardía, 3) Madura, 4) Parcialmente desovado y 5) Desovado. El desarrollo gametogénico inicia cuando la temperatura superficial del mar es alta (28°C). Los desoves ocurren entre enero y febrero (invierno) cuando la temperatura es la más baja (18°C) (Aragón-Noriega *et al.*, 2007). Otro estudio reportó que el desove intenso de esta especie ocurre a principios de diciembre, cuando la temperatura se estabiliza alrededor de 18.5 - 19 °C por un período aproximado de 20 días en organismos de San Felipe, B.C. México (Sánchez León-Hing, 2012). En esta misma zona Tapia-Morales (2014) observó un desfase en el inicio y término de la gametogénesis de *P. globosa* en el periodo comprendido de septiembre de 2011 a febrero 2012, donde las hembras desovaron en noviembre y los machos en diciembre, un mes antes de lo reportado. El autor sugiere que dicho desfase se debió principalmente a la temperatura, debido a la condición anómala

“La Niña” presentado en ese periodo de trabajo. Calderón-Aguilera *et al.* (2010) observaron que la actividad productiva de *P. globosa* comenzó con la disminución de la temperatura y con la alta productividad de microalga en el alto Golfo de California. Más recientemente, se estudió el desarrollo gametogénico de esta especie y se realizó por primera vez la caracterización histológica, histoquímica y el perfil de diferentes componentes bioquímicos incluyendo el de la proteína tipo vitelogenina/vitelina de diversos tejidos de *P. globosa* de San Felipe, B.C. México (Arcos-Ortega *et al.*, 2015). Estos autores determinaron que la vitelogenina presente en la hemolinfa y la gónada es un indicador sensible del grado de madurez de los ovocitos de esta especie. Y que el nivel de carbohidratos en hemolinfa y ovocitos se puede utilizar como una alternativa para determinar el grado de madurez de *P. globosa*. También Tapia-Morales (2014) en organismos muestreados en la misma zona determinó que el glucógeno es movilizado para ser utilizado durante la maduración gonadal de *P. globosa* y propuso el porcentaje de cobertura de esperma como indicador cuantitativo del estadio de desarrollo gonadal de esta especie.

Reproducción y alimentación de moluscos bivalvos en el laboratorio

Diversas técnicas se han utilizado en laboratorio para lograr el desove de moluscos bivalvos (Utting y Millican 1997). La temperatura del agua influye en el desarrollo gonadal mientras que la cantidad/calidad de alimento determina la fertilidad y calidad de los gametos (Loosanoff y Davis, 1963). En estudios previos se ha logrado incrementar el desarrollo gametogénico y reducir el tiempo de acondicionamiento utilizando un régimen de temperatura y dietas monoalgales o mixtas de microalgas vivas en distintas especies de bivalvos, como en *Tapes philippinarum* (Mann, 1979b), *Crassostrea gigas* (Robinson, 1992) y *Ostrea edulis* (Mann, 1979a). En el caso de las especies de *Panopea* solo hay dos trabajos previos de maduración y reproducción en

laboratorio. Marshall *et al.* (2012) acondicionaron reproductores de *P. generosa* durante 20 semanas a temperaturas de 7, 11 15 y 19 °C, utilizando *Isochrysis* sp. (Clon T-Iso) y *Chaetoceros muelleri* como alimento. El mayor índice gonadosomático y porcentaje de ovocitos maduros se obtuvo a una temperatura de 7 °C en un periodo de 15 semanas. Así mismo, García-Esquivel *et al.* (2013) acondicionaron adultos de *P. globosa* durante 8 semanas (22-18 °C) y determinaron el efecto de la alimentación con microalga sola (T-Iso) y suplementada con harina de Kelp (70% T-Iso + 30% Kelp) y aceite de pescado (70% T-ISO + 30% aceite) en el desarrollo gonádico de esta especie. Las almejas alimentadas solamente con microalga además de que tendieron a madurar primero tuvieron gónadas más pesadas y el mayor porcentaje de desove. Por lo que en dicho estudio se concluyó que es posible madurar en laboratorio a adultos de *P. globosa* en un plazo de 6 a 8 semanas utilizando la microalga *Isochrysis* sp. (Clon T-ISO) como dieta única.

En cuanto al uso de dietas microparticuladas inertes en el acondicionamiento de reproductores de moluscos bivalvos se han utilizado diversos suplementos, pero aún el reto principal en su uso radica en que deben tener tamaño adecuado para los bivalvos y que deben mantenerse en suspensión en el sistema de cultivo.

Se han utilizado suplementos en forma de emulsiones lipídicas, microcápsulas (paredes lipídicas, gelatina-acacia y micro-gel) y microesferas (Robert y Trintignac, 1997). Estos por si solos no son adecuados para la alimentación de reproductores, pero pueden aumentar el porcentaje de desove de bivalvos cuando se combinan con microalgas vivas (Nevejan *et al.*, 2003b). En almejas *Argopecten purpuratus* cultivadas en tanques cilíndricos (50 L) con bombas de acuario para la recirculación del agua, el uso de microalgas suplementadas con ácidos grasos saturados mejoró la fecundidad, redujo el periodo de acondicionamiento, y aumentó los niveles de ácidos grasos esenciales en la gónada en comparación con las almejas no suplementadas (Nevejan *et al.*, 2003b). Del mismo modo, reproductores de *Crassostrea gigas* acondicionados con la microalga

Dunaliella tertiolecta (pobre en ácidos grasos esenciales) tuvieron casi el doble de fecundidad y porcentaje de larvas “D” cuando se complementó con emulsiones de EPA y DHA (Caers *et al.*, 2002), en este estudio solo se utilizaron piedras difusoras para el movimiento de las partículas. En cuanto a las microcápsulas, estas se han logrado fabricar de tamaño adecuado para bivalvos, el cual se ha reportado que va de 20 hasta 75 μm (Dunphy *et al.*, 2006) en etapa adulta. Por ejemplo, Langdon, (1989) elaboró microcápsulas de proteína compuestas de proteína purificada de cangrejo, carboximetil celulosa y lecitina de soya con tamaño de partícula de $6.06 \pm 2.37 \mu\text{m}$. Mediante experimentos in vitro este autor indicó que las cápsulas eran susceptibles a la digestión por la actividad de las proteasas, por lo que podrían utilizarse para transportar y suministrar proteínas en dietas para *C. gigas*. Del mismo modo, Heras *et al.*, (1994) fabricaron microesferas lipídicas compuestas de aceite de pescado, lecitina de soya, aceite vegetal y vitamina E, con tamaño de partícula de 1-20 μm para la alimentación de adultos de *Ostrea edulis*, En este caso las partículas se mantuvieron en movimiento con aireación y en vasos de precipitado (2 L, 1 ostra por vaso). Ya que las ostras fueron capaces de ingerir y digerir las microesferas, se propusieron como alternativa para suplementar las microalgas, principalmente como fuente de ácidos grasos poliinsaturados. Aunque este tipo de microcápsulas tienen la ventaja de tener tamaño adecuado y de no lixiviarse ni aglutinarse en el agua, son nutricionalmente deficientes por lo que solo se han utilizado a nivel experimental como complemento del alimento vivo en el cultivo de moluscos bivalvos.

En el caso de suplementos a base de harinas y microalgas secas aún no se cuenta con la tecnología de molienda adecuada para obtener el tamaño de partícula que requieren los bivalvos. Generalmente los estudios realizados con estas dietas no evalúan el tamaño de partícula del alimento, pero realizan el tamizado de las micropartículas a través de una luz de malla de 100 μm . Se han obtenido resultados muy variables, por

ejemplo, la fecundidad de *Tapes philippinarum* alimentadas con microalgas secas (*Tetraselmis suecica*) fue de 25 a 50% menor que la fecundidad de las almejas alimentadas con microalgas vivas (Laing y López-Alvarado, 1994). Así mismo, Arney *et al.* (2015) reportó que la sustitución de 25 y 50% de alimento vivo por la microalga seca *Schizochytrium* sp. y la cianobacteria *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) resultó en una disminución significativa del crecimiento de juveniles de *P. generosa*. Por otra parte, los suplementos a base de granos generalmente no son eficientes en mejorar el desarrollo gonádico de bivalvos. Por ejemplo, la harina de germen de trigo (rica en Ac. linoleico) en la alimentación de adultos de *Mytilus galloprovincialis* causó una alta reducción de DHA y EPA en los tejidos de esta especie (Pirini *et al.*, 2007). El almidón de maíz como suplemento de microalgas vivas incrementó el consumo de energía en *Ruditapes decussatus* (Albentosa *et al.*, 2003). En adultos de *A. purpuratus*, el almidón de maíz también produjo un porcentaje de organismos maduros similar a los alimentados con microalgas (*I. galbana* y *C. gracilis*) y con microalgas + lípidos (emulsiones de DHA) (Martínez *et al.*, 2000a). Sin embargo, el estudio realizado por Martínez *et al.* (2000a) encontró que la calidad de los huevos de *A. purpuratus* no fue tan alto con la dieta suplementada con almidón, y a pesar de las altas tasas de fertilización (88-89%), la sobrevivencia de larvas "D" fue menor (50%) en comparación con los controles de microalgas vivas (88%). El almidón tiene el inconveniente de ser nutricionalmente incompleto, pero puede ser importante como fuente de alimento en las primeras etapas de acondicionamiento de bivalvos cuando la acumulación de reservas de carbohidratos es importante (Gabbott, 1983). Las técnicas utilizadas para la suspensión de las partículas de los estudios mencionados anteriormente solo se basan en el suministro de aire en el fondo del tanque de cultivo, pero algunos autores también han utilizado otras técnicas, como Laing (1987), quien realizó el cultivo de 5 especies de larvas de bivalvos en tanques de 50 L alimentadas con dietas microencapsuladas y con microalga. La recirculación del

agua consistió en columnas de surgencia en conjunto con un sistema de airlift interno. La dieta de microalga dio un mejor incremento de peso diario, equivalente al 32% del peso inicial. Con la dieta artificial, el incremento en peso diario varió de 13,3% a 7,5% del peso inicial. Así mismo, juveniles de *Mercenaria mercenaria* fueron cultivadas por Coutteau *et al.* (1994a) en un sistema de recirculación con airlifts. Se utilizó una dieta a base de levadura. La sustitución de 50% y 80% de la ración de microalga por levaduras no resultó en una disminución significativa de crecimiento en relación a los controles alimentados con microalgas. Estos dos estudios tampoco hacen mención del grado de eficiencia del sistema de recirculación en mantener las partículas disponibles para los organismos, ni evaluaron el comportamiento de las mismas dentro del tanque de cultivo. En las especies de *Panopea* también existe la necesidad de implementar un sistema de recirculación eficiente en mantener la mayor cantidad de partículas en la columna de agua sin que se acumulen en alguna zona específica del tanque de cultivo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de una dieta balanceada microparticulada sobre la maduración gonadal de adultos de *P. globosa* bajo condiciones controladas de laboratorio.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Implementar y probar un sistema de recirculación que permita mantener disponibles y en suspensión las partículas inertes microparticuladas para adultos de *P. globosa*.
- Evaluar un método gravimétrico para la medición de tasas de ingestión de *P. globosa*.
- Determinar el efecto de la alimentación con distintas proporciones de alimento vivo (M) y alimento formulado (F) (100:0, 50:50, 25:75, 0:100 M:F) sobre el peso total, peso de gónada, índice de condición e índice gonadosomático de adultos de *P. globosa*.
- Determinar el efecto de la alimentación con microalgas vivas o suplementadas con alimento microparticulado formulado sobre el porcentaje de eclosión y fecundidad de adultos de *P. globosa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recepción de organismos y estabilización

Para el presente estudio, se adquirieron 100 organismos adultos de *Panopea globosa* (930 ± 92.04 g) de una planta empacadora ubicada en Ensenada B.C., los cuales fueron trasladados al laboratorio de Biotecnología de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Una vez en el laboratorio fueron colocados en cajas de plástico perforadas (55 x 38 cm, alto x ancho) con 10 compartimientos internos cada una. Las cajas (5 por tanque) fueron distribuidas dentro de dos tanques rectangulares de fibra de vidrio de 700 L (50 orgs por tanque) donde permanecieron durante 5 días para la estabilización de los organismos. Durante este periodo se usó un 100% de renovación de agua de mar por día y aireación constante, se redujo la temperatura gradualmente ($1^{\circ}\text{C día}^{-1}$) de 26 a 19 °C usando un enfriador de agua (Cyclone, 0.5 Hp) por tanque. Las almejas se alimentaron con la microalga *Isochrysis sp.* (clon T-ISO) a una ración del 0.04% del peso corporal vivo de los organismos (García-Esquivel *et al.*, 2013). Una vez estabilizados los organismos fueron transferidos a los sistemas experimentales.

Diseño experimental, mantenimiento y muestreo de organismos

Un total de 90 adultos de *P. globosa* (936.6 ± 104.5 g) fueron distribuidos de forma aleatoria en 15 unidades experimentales consistentes en canastas de plástico perforadas (30 x 42 cm, alto x ancho) colocadas dentro de tambos de plástico de 100 L (77 x 52 cm, alto x ancho) y de fondo plano (6 orgs por canasta, una canasta por tambor). En cada unidad experimental se incluyó un biofiltro que consistió en un costal cebollero con coral y gravilla, además de un sistema de airlift. El biofiltro fue activado antes de iniciar el experimento durante cuatro semanas con agua de mar cruda, con el fin de promover el crecimiento de bacterias nitrificantes (Simmonel *et al.*, 2002). El sistema airlift hecho con

tubo de PVC de 1 ½" estaba conformado por una base cuadrada apoyada en el fondo del tanque y un tubo de descarga (Fig. 1). La base del airlift tenía orificios alternados orientados hacia el centro y el fondo del tanque, lo cual permitió succionar el agua desde el fondo hasta la zona de descarga en la parte superior del tanque. El efluente del airlift fue colocado en posición tangencial a la pared del tanque para mantener un movimiento uniforme de la columna de agua (Timmons y Ebeling, 2007).

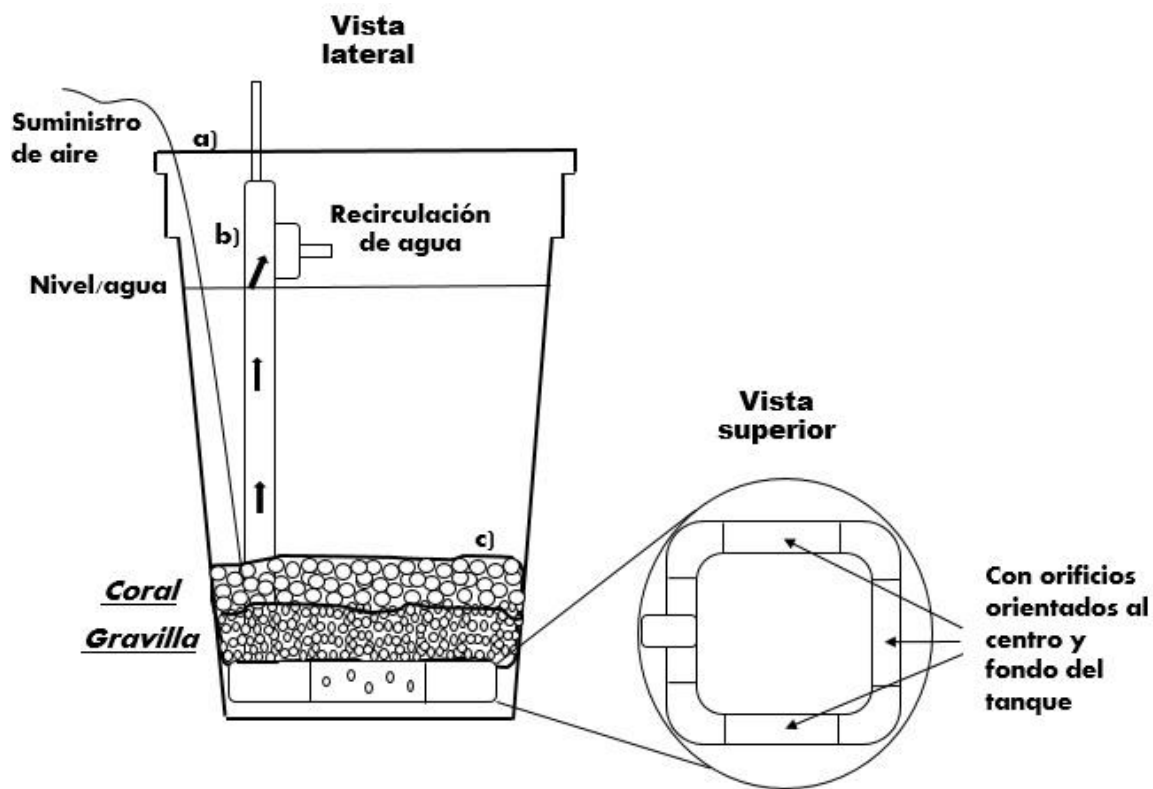


Fig. 1 Sistema experimental de *P. globosa*. Los 3 elementos principales son: tanque de 100 L (a), airlift (b) y sistema de biofiltro (c). En el interior del tanque están las canastas con organismos. Las flechas representan la dirección de flujo de agua.

Se utilizaron 5 tratamientos por triplicado de la combinación microalga *Isochrysis* sp. clon T-ISO (M) y alimento formulado (F): dieta A= 100:0 M:F; dieta B= 50:50 M:F; dieta C= 25:75 M:F, y dieta D= 0:100 M:F. Se incluyó un tratamiento como control, que

consistió en 25% de la ración correspondiente a la dieta A, la cual representa una ración sub-óptima (Albentosa *et al.*, 1999) (Tabla 1). Las unidades experimentales se mantuvieron a temperatura constante de 18 °C (± 1 °C) dentro de un área con aire acondicionado. A lo largo del experimento se monitoreó la temperatura (°C), oxígeno (mg L⁻¹) y amonio (NH₄, mg l⁻¹) antes de realizar los recambios de agua diario. Por medio de sifoneo diariamente se retiraban los desechos sólidos (heces y alimento microparticulado remanente) depositados en el fondo del tanque y entre los espacios del coral y la gravilla. Después se retiraba el biofiltro y se enjuagaba levemente con agua de mar. Se hizo un 20% de recambio de agua diario. El tiempo dedicado para la limpieza de los tanques y alimentación fue aproximadamente de 1 a 2 hrs diarias. El resto del tiempo los organismos estuvieron bajo oscuridad total.

Tabla 1. Raciones experimentales y proporción de microalga viva (M): alimento microparticulado formulado (F) ofrecidas diariamente a los adultos de *P. globosa* durante el periodo de acondicionamiento. A= 100:0; B=50:50; C=25:75; D=0:100; E= 25% de A.

Tratamiento M:F	Número de repeticiones	Cantidad de T- Iso (cel kg ⁻¹ almeja d ⁻¹)	Cantidad de T- Iso (g cel kg ⁻¹ almeja d ⁻¹)	Cantidad de alimento formulado (g kg ⁻¹ almeja d ⁻¹)
A. 100:0	3	1.43 x10 ¹⁰	0.4	0.0
B. 50:50	3	7.15 x10 ⁹	0.2	0.2
C. 25:75	3	3.57 x10 ⁹	0.1	0.3
D. 0:100	3	0.0	0.0	0.4
E. 25% de A	3	3.57 x10 ⁹	0.1	0.0

Los organismos se mantuvieron 6 semanas (octubre-diciembre) en los sistemas experimentales y se alimentaron con una ración diaria equivalente a 1.43 x 10¹⁰ cel T-ISO kg⁻¹ (0.4 g cel almeja⁻¹ d⁻¹), que corresponde al 0.04% del peso vivo de los organismos (García-Esquivel *et al.*, 2013). Solamente al tratamiento de organismos sub-alimentados se le dio menor ración (Tabla 1). El alimento fue dividido en 2 raciones diarias. Cada

ración se mezcló y diluyó en agua de mar, se vertió y aforó a 11 L en garrafones invertidos y se ofreció por goteo durante 10 horas diarias (1/2 ración cada 5 horas, 2 raciones día⁻¹). Este método de alimentación se descartó a partir del día 15 debido a que la dieta balanceada taponaba la válvula del garrafón disminuyendo o deteniendo eventualmente el flujo. A partir del día 16 el esquema de alimentación consistió en dividir la cantidad total de alimento diario en 5 raciones, vertiendo estas directamente en el sistema experimental aproximadamente cada 2 horas. Los horarios de alimentación no fueron exactos iniciando con la primer ración de 10 a 11 am y terminando con la última ración de 6 a 7 pm, esto por los distintos tiempos de demora en la limpieza de los tanques experimentales.

El esquema de alimentación mencionado se estableció a partir de resultados de un experimento preliminar realizado sobre el tiempo de permanencia del alimento en la columna de agua (ver adelante). En la cuarta semana del experimento también se cuantificaron tasas de ingestión con el fin de corroborar la ingesta tanto de microalga como de alimento balanceado microparticulado (ver adelante).

Semanalmente se pesaron los organismos experimentales para evaluar el cambio de biomasa o peso total (Pt). La disección de organismos se llevó a cabo al inicio (25 oct) (6 organismos) y a las 3 (15 nov) y 6 semanas (4 dic) (3 organismos por cada unidad experimental y cada fecha de muestreo) con el fin de evaluar el peso de la concha (PC), peso de la carne (PR, tejido diseccionado sin concha) y el peso de la gónada (PG). Al final del experimento también se realizó el raspado de las gónadas y se fertilizaron los óvulos obtenidos de cada una de las hembras con el fin de evaluar la fecundidad y porcentaje de eclosión larval.

Formulación y elaboración de dieta experimental

El alimento microparticulado se preparó utilizando como referencia los ingredientes de una dieta balanceada utilizada en abulón *Haliotis rufescens* (García-Esquivel y Felbeck, 2009). Se utilizaron dos fuentes principales de proteínas (Tabla 2): harina de pescado y harina de soya en una proporción de 2:1 (García-Esquivel y Felbeck, 2009). El aceite de pescado y aceite de maíz fueron usados como fuente de lípidos en una proporción de 7:1 (García-Esquivel y Montes-Magallón, 2007). Se agregó harina de Kelp (*Macrocystis pyrifera*) como fuente de celulosa, almidón como fuente de carbohidratos, gelatina y alginato como agentes aglutinantes, así como concentrado de microalga (*Isochrysis sp. clon T-ISO*) como atrayente para los organismos. Mezclas de vitaminas y minerales también fueron añadidos a la dieta. La cantidad de proteínas y carbohidratos totales fue similar a la de *Isochrysis sp.* (clon T-ISO), solo en el caso de los lípidos la cantidad agregada a la dieta fue menor que lo reportado en *Isochrysis spp* para evitar problemas de secado y molienda.

Los ingredientes fueron homogeneizados en una mezcladora Kitchen Aid (Hobar, Troy, OH, USA) y se agregaron en el siguiente orden (Badillo-Salas, 2006): los componentes mayoritarios en seco (harina de pescado, soya y harina de kelp), después se agregó agua caliente. Por separado se disolvieron las vitaminas, la metionina y el cloruro de colina. Después se mezclaron los aceites, BTH, tocoferol, stay C y gelatina (previamente hidratados en agua caliente). Posteriormente la mezcla con vitaminas, metionina y cloruro de colina, más la mezcla de gelatina con los aceites fueron vaciados inmediatamente con los componentes mayoritarios. Finalmente se peletizó la muestra a un tamaño de 5 mm. Los pellets obtenidos fueron secados a una temperatura de 65 ± 5 °C durante 18 h en un horno de convección. Después de enfriados los pellets se trituraron en un molino de café más una molienda extra con un mortero y después se registró el

tamaño de partícula bajo el microscopio. La dieta seca fue almacenada a -20 °C en bolsas de plástico ziploc®.

Tabla 2. Composición de las dietas (%) formulada (F) y microalga (M) usados para la alimentación de adultos de *P. globosa* durante el experimento.

Ingredientes	F	M
H. Pescado ¹	33.9	-
H. proteína de soya ²	17.0	-
Nutrikelp ³	5.0	-
H. Kelp ⁴	4.0	-
Aceite de pescado ⁵	12.9	-
Aceite de maíz ⁶	1.8	-
Almidón ⁷	11.4	-
Microalga seca ⁸	2.5	-
Microalga viva ⁹	-	100
Ingredientes comunes ¹⁰	11.5	-
Composición		
Materia seca	98.5 ± 0.3	99.3 ± 0.1
Proteína cruda	44.3 ± 0.2	46 ± 0.4
Lípido crudo	22.9 ± 1.6	30.6 ± 0.4
Carbohidratos	22.4 ± 1.1	13 ± 0.3
Ceniza total	10.7 ± 0.2	10.5 ± 0.06
Energía bruta (Kcal g ⁻¹)	6.0 ± 0.8	5.6 ± 0.8

Valores expresados en base seca; carbohidratos= extracto libre de nitrógeno (ELN). ¹Harina de pescado Rangen (proteína: 72%, lípidos: 12%, cenizas: 16%), ²concentrado de proteína de soya (proteína: 71%, lípidos: 5%, cenizas: 5%), ³ Nutrikelp de Albiomar México (proteína: 2%, lípidos: 0.1%, fibra: 1%, cenizas: 4%, ELN: 92.9%), ⁴*Macrocystis pyrifera* proporcionado por Productos del Pacífico, S.A. de C.V., ⁵aceite de pescado (100%), Rangen U.S.A., ⁶ Mazola (100%), México, ⁷ Fanpage Maizena ® (97%), México, ⁸microalga seca y ⁹viva (*Isochrysis spp.* clon T-ISO), ¹⁰celulosa, 4.2, mezcla de vitaminas, 1.3 (ICN Biomedical, cat. #904654), mezcla de minerales, 2.0 (ICN Biomedicals, Inc. Cat. #905455), Stay-C, 0.4 (DSM productos nutricionales Inc.), metionina 0.2 (Sigma, cat. #M-9500), benzoato de sodio, 0.2 (Sigma, cat. #C-7527), cloruro de colina, 0.1 (Sigma, cat. #T-3634), BTH, 0.1 (Sigma, cat. #B-1378), alfa-tocoferol, 0.01 (Sigma, cat. #T-3634), gelatina, 3.0 (275 bloom, Duche).

Evaluaciones

Crecimiento, índice de condición e índice gonadosomático

Durante los muestreos cada organismo se pesó vivo en una balanza electrónica (CE 5200 \pm 0.1g). Posteriormente se disectaron y drenaron para obtener el peso de la carne y peso de la concha. La masa visceral (gónada +sistema digestivo) también se pesó separadamente (Fig. 2). Con los datos obtenidos se estimó el índice de condición (IC) y gonadosomático (IG) utilizando las ecuaciones reportadas por García-Esquivel., *et al* (2013) para *P. globosa*:

- Índice de condición (IC, %) = (peso de la carne x 100) / peso seco de la concha
- Índice gonadosomático (IG, %) = (peso de la gónada x 100) /peso seco de la concha.

Es importante notar que García-Esquivel *et al.* (2013) reportaron el PG en conjunto con el sistema digestivo, ya que al situarse adyacentes uno con el otro hace muy difícil su separación. Sin embargo, al inicio del presente estudio las almejas estaban inmaduras y no tenían gónada visible. Por lo mismo, se consideró que el peso inicial de gónada + sistema digestivo representaba solamente el peso del último. Con este dato, se decidió eliminar el ruido del sistema digestivo en muestreos subsecuentes restando el peso inicial del mismo al peso de gónada + sistema digestivo de tal forma que:

$$PG = (PG + sistema digestivo) - (sistema digestivo inicial)$$

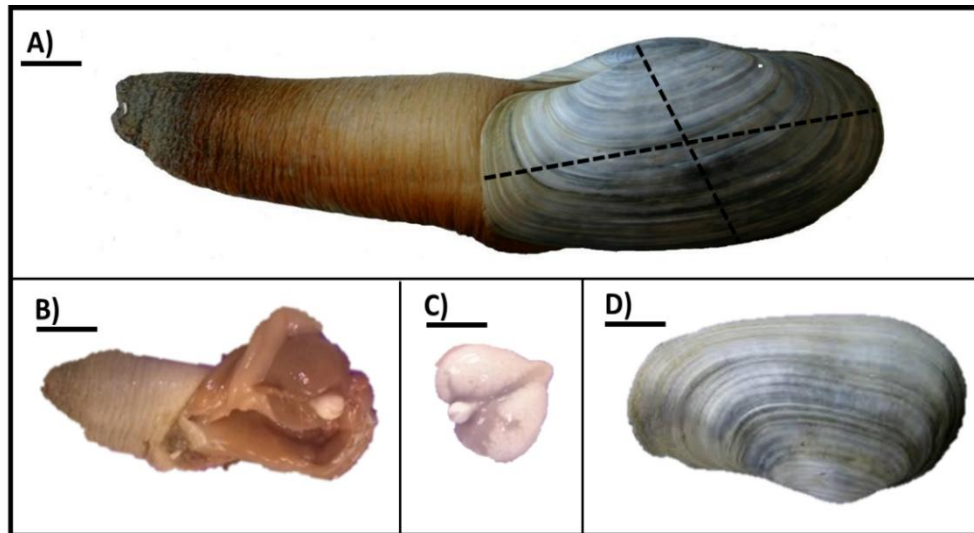


Fig. 2 Medidas biométricas registradas durante los muestreos en *P. globosa* en los 5 tratamientos experimentales (100:0, 50:50, 25:75, 0:100, 25:0 M:F). Peso total (A), peso de la carne (inciso B), peso de la gónada (C) y peso de la concha (D). Las líneas discontinuas describen la longitud total y ancho de la concha.

Composición bioquímica de las dietas

El contenido de proteínas se estimó a partir del nitrógeno determinado por el método de microKjeldahl, utilizando un factor 6.25. Los lípidos totales se determinaron por el método de Folch *et al.* (1957). La humedad se determinó secando las muestras a 105 °C a peso constante (AOAC, 1995) y el contenido de cenizas calcinando las muestras a 550 °C durante 6 hrs (AOAC, 1995). El extracto libre de nitrógeno (ELN) se consideró como contenido de carbohidratos y se obtuvo después de restarle al 100% de la muestra, la suma de los porcentajes de humedad, proteína, lípidos y cenizas (FAO, 1993). El contenido calórico de las dietas se estimó a partir de la composición proximal del alimento, utilizando los siguientes equivalentes calóricos (Brett y Groves, 1979): 5.64 Kcal g⁻¹ (proteínas), 9.44 Kcal g⁻¹ (lípidos) y 4.11 Kcal g⁻¹ (carbohidratos).

Tiempo de permanencia de las partículas en la columna de agua

El tiempo de permanencia del alimento balanceado en la columna de agua se determinó con el fin de establecer el esquema de alimentación que sería utilizado durante el experimento. Para ello se utilizaron dos tanques experimentales de 100 L con airlifts, uno con biofiltro y el otro sin biofiltro (control), ambos sistemas sin organismos. Se aforaron los tanques a 80 L con agua de mar y se agregaron 2 g de alimento ($0.4 \text{ g kg}^{-1} \text{ org}^{-1}$) en la orilla del tanque. Del centro y del fondo del tanque se tomaron muestras de 100 ml de agua en los siguientes tiempos: 1 min, 180 min (3 hrs), 300 min (5 hrs) y 480 min (8 hrs), utilizando una manguera de 0.8 cm de diámetro previamente fijada a los puntos de muestreo. Las muestras de agua se filtraron con una bomba manual de vacío (NALGENE) a 5 lbs de presión con filtros de $0.45 \mu\text{m}$ (Whatman®) previamente secados y pesados. Los filtros con muestra se secaron durante 24 hrs a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ y el peso de la muestra seca se estimó por diferencia entre el peso del filtro y el peso del filtro más muestra.

Tamaño de partícula del alimento balanceado

Se evaluó el tamaño de partícula presente en los tanques experimentales dosificados con el garrafón invertido (método 1) y sin garrafón (método 2). La evaluación se realizó en cubetas de 20 L. En el primer caso se colocó el airlift (tubo PVC 1") dentro de la cubeta y el garrafón dosificador (11 L), sin organismos. La cubeta se aforó a 16 L con agua de mar filtrada. Se colocó el garrafón invertido en la parte superior de la cubeta conteniendo 11 L de mezcla de agua de mar + 0.32 g de alimento microparticulado previamente mezclado y diluido en agua de mar. Una vez agregado el alimento se abrió la válvula del garrafón y se ajustó el flujo que descargaba hacia la cubeta. Cada hora durante 5 horas se tomaron muestras de agua (300 ml aprox.) por medio de succión con una manguera colocada en el centro de la cubeta. En caso de que la válvula del garrafón estuviese obstruida por el alimento, esta se abría para desfogar y se tomaba la muestra.

Con este procedimiento se trató de emular la forma de alimentación utilizada durante el acondicionamiento de las almejas. Para el método 2, el alimento balanceado (0.32 g) previamente mezclado y diluido en agua de mar se agregó directamente a la cubeta, cada hora se tomaron muestras de agua (300 ml aprox.) con una manguera colocada en el centro por medio de succión. El tamaño de partículas presentes en las muestras se midió directamente bajo el microscopio (10x).

Tasas de ingestión

Se midieron las tasas de ingestión (IR) de *P. globosa* directamente en los tanques de acondicionamiento aplicando el siguiente protocolo:

1. Se limpiaron los tanques experimentales, se llenaron con agua de mar filtrada y se activó el sistema de recirculación (airlift) dentro de los tanques. Se utilizó aireación adicional para asegurar la homogeneización completa del alimento dentro de los tanques experimentales.
2. La canasta con organismos experimentales fue colocada dentro de cada tanque y se dejó estabilizar durante 15 min.
3. Se añadió el alimento vivo (*Isochrysis sp.* clon T-ISO) a una concentración final de $100 \text{ cel } \mu\text{l}^{-1}$. Después de 10 min se tomó una muestra de 100 ml con una manguera fijada en el centro del tanque. La muestra se tamizó por $41 \mu\text{m}$ y la concentración celular fue cuantificada con un contador de partículas Coulter Multisizer 3 (Beckman). Muestras adicionales se tomaron cada 10 min durante 40 min (T_{10} , T_{20} , T_{30} y T_{40} min). Las tasas de ingestión promedio (IR, $\text{No. cel g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) se calcularon a partir de los datos obtenidos entre cada intervalo de tiempo con la ecuación de Paffenhofer (1971) indicada abajo. Solamente se consideraron datos

en los que el consumo disminuyó la concentración de alimento entre el 10 y 30% del valor inicial.

$$IR = (V / Wt) (C_1 - C_2)$$

Donde V= volumen del tanque, W = peso vivo de los organismos, y C_1 y C_2 = concentración del alimento en el intervalo de tiempo (t) transcurrido.

4. Se realizó una prueba preliminar con el fin de validar un método gravimétrico para medir IR de la siguiente manera: se tomaron muestras simultaneas del tratamiento 100:0 M:F (solamente microalga) en los tiempos indicados arriba. Una de las muestras se trató de acuerdo a la metodología descrita arriba (1 a 3). La otra muestra se retuvo en filtros de membrana de 0.45 μ m (Whatman®), previamente secados y pesados utilizando una bomba manual de vacío. Los filtros con muestra se secaron a 60 °C durante 24 hrs y el peso seco de la muestras se convirtió a número de células *Isochrysis*-equivalente utilizando la siguiente relación: 1 cel= 28 picogramos. Los datos gravimétricos obtenidos se graficaron vs. las muestras cuantificadas directamente en el contador de partículas y se verificó el grado de correlación entre ambas.
5. Con el paso anterior se validó la aproximación gravimétrica para estimar las IR de los organismos sometidos a las mezclas de microalga y alimento formulado (50:50 y 0:100 M:F), expresando los resultados obtenidos como *Isochrysis*-equivalente.

Proporción de sexos, fecundidad y eclosión

El último muestreo también se aprovechó para evaluar la fecundidad de los organismos de todos los tratamientos así como el porcentaje de eclosión larval. Primero se disectó la gónada + sistema digestivo y se determinó su peso con una balanza electrónica (Scout PRO 200g). El volumen total de la gonada + sistema digestivo se

determinó después de sumergir el tejido en agua de mar contenida en una probeta graduada y medir el volumen desplazado. Con los datos anteriores se estimó el volumen corregido de la gónada restándole el del tejido digestivo. Una sección de la gónada (aprox. 1 cm) se colocó dentro un tubo cónico volumétrico 15 ml (Falcon®), sin agua y se determinó el volumen del tejido + gametos. El tejido se raspo y los gametos obtenidos de la sección de gónada se concentraron en el tubo y se transfirieron a un recipiente de plástico más grande, aforándolos un volumen final de 500 ml. Se tomaron submuestras de 1 ml y se contabilizaron los óvulos bajo el microscopio con el fin de estimar el total de óvulos presentes en los 500 ml, que correspondía a la sección de gónada muestreada. Una vez conocida la cantidad de óvulos presentes, se diluyeron estos a una densidad de 10 óvulos ml⁻¹ en un volumen total de 500 ml para proceder a su fertilización con una mezcla de esperma, utilizando una relación de 5-10 espermatozoides por ovocito. En el caso de los machos, los espermatozoides de las submuestras se contabilizaron directamente en el contador de partículas Multisizer III. Los recipientes con óvulos fertilizados se incubaron en baño María (23 °C) durante 24h, tiempo después del cual se fijaron y se estimó el porcentaje de eclosión (H, %) utilizando la ecuación de García-Esquivel *et al.* (2013).

- $H (\%) = (\text{No. de larvas "D"} \times 100) / \text{No. inicial de ovocitos}$

La fecundidad estimada en la muestra (F_m , No. ovocitos ml⁻¹ gónada) de la sección de gónada muestreada se estimó de la siguiente manera:

- $F_m = (\text{total de óvulos o esperma}) / \text{vol. de la sección de gónada.}$

La fecundidad total por individuo (F , No. ovocitos o espermatozoides org⁻¹) se estimó con la siguiente ecuación:

- $F = (\text{vol. total corregido de la gónada}) \times (\text{total de ovocitos o espermatozoides ml}^{-1} \text{ gonada})$

Análisis de datos

Antes del análisis estadístico se efectuó la prueba de normalidad y homocedasticidad de la varianza. Para comparar el efecto de los tratamientos sobre las variables biométricas, índice de condición e índice gonadosomático, se aplicó ANOVA de una vía. De igual manera para el desarrollo gonádico y sexo (machos y hembras) se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Se utilizó una prueba a posteriori Tukey con un nivel de significancia de 0.05 para detectar diferencias específicas entre medias.

Para el manejo de todos los datos se utilizaron software estadísticos (SigmaStat versión 3.5 y SigmaPlot versión 10.0).

RESULTADOS

La temperatura de los sistemas experimentales fluctuó entre los 18 °C y los 19 °C, mientras que las concentraciones de oxígeno tuvieron variaciones entre los 7 - 7.5 mg l⁻¹. Los niveles de amonio se mantuvieron en un intervalo de 0-0.1 mg l⁻¹ en todas las unidades experimentales.

Tiempo de permanencia en la columna de agua del alimento balanceado

Las partículas de alimento balanceado tuvieron un comportamiento inversamente proporcional en la superficie y el fondo del sistema de acondicionamiento. Una alta cantidad de alimento balanceado (1.5 - 2 g) se mantuvo en la columna de agua durante las primeras 3 hrs aproximadamente. Después de 5 hrs el 50% (1 g) de las partículas se encontraba en el fondo y en 8 hrs se precipitó totalmente (2 g) (Fig. 3).

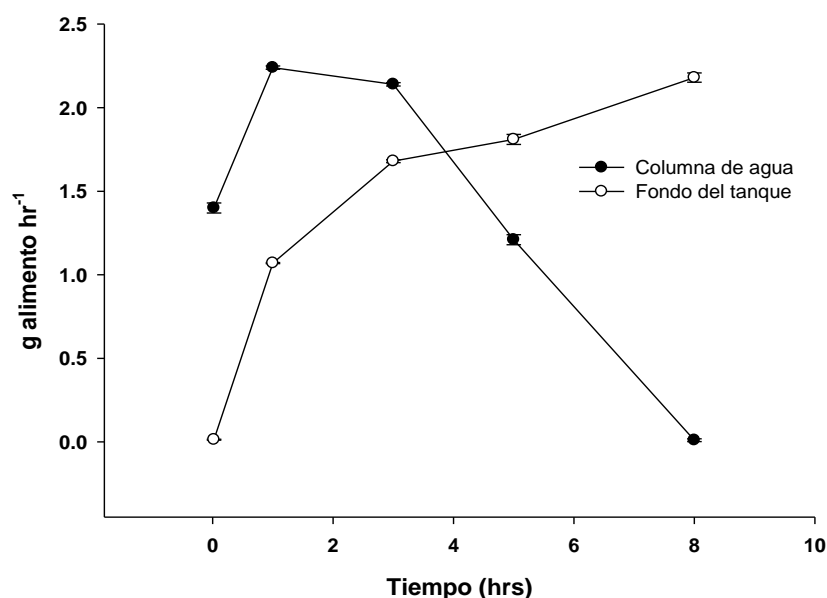


Fig. 3 Representación gráfica del cambio de la cantidad de alimento balanceado (promedio ± error estándar) presente en la columna de agua y en el fondo del tanque experimental durante 8 horas.

Tamaño de partícula

Se registró un amplio rango de tamaño de partícula de alimento balanceado (1-900 μm) durante las 5 horas de su permanencia en el garrafón dosificador. En el primer muestreo (hora 1) predominaron partículas en el rango de 1-100 μm de diámetro, a partir de las dos horas el tamaño de partícula predominante fue de 301-500 μm (Fig. 4 y 6).

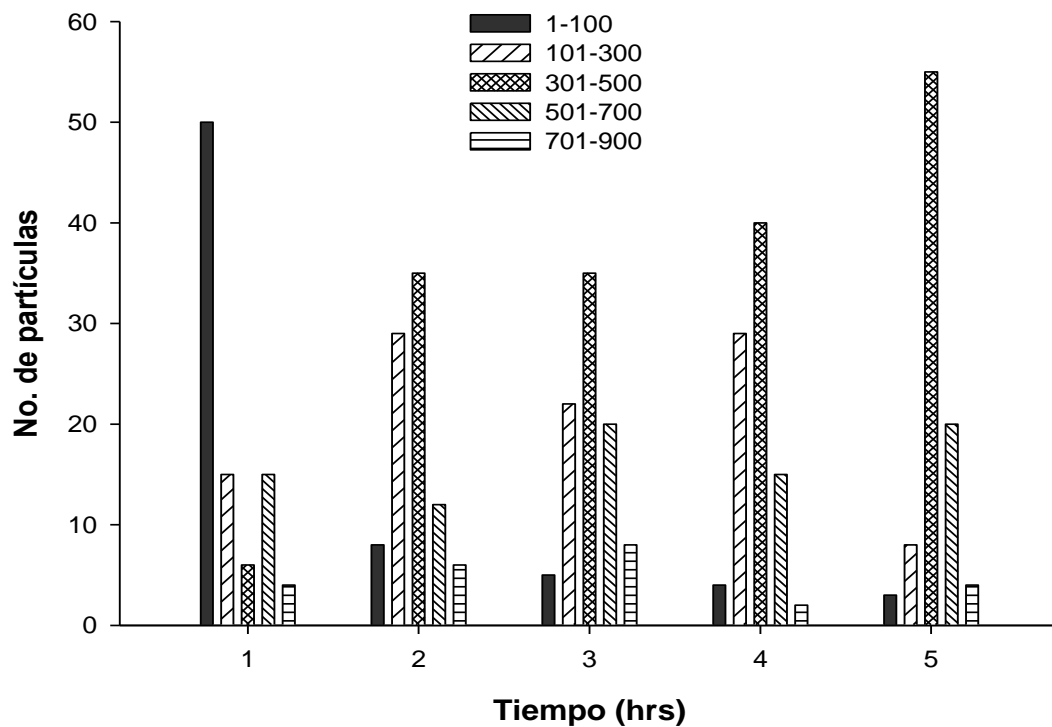


Fig. 4 Cambios temporales (1, 2, 3, 4 y 5 horas) en la distribución del tamaño de las micropartículas formuladas (μm) en la columna de agua, cuando se dosificó el alimento utilizando garrafones.

El rango de tamaño de las partículas en el tanque experimental también fue muy amplio (1-900 μm), sin embargo, el mayor número de partículas registradas en cada hora de muestreo fue del rango de 1-100 μm , el cual se mantuvo relativamente constante a lo largo de las 5 horas de su inclusión en el agua (Fig. 5 y 7).

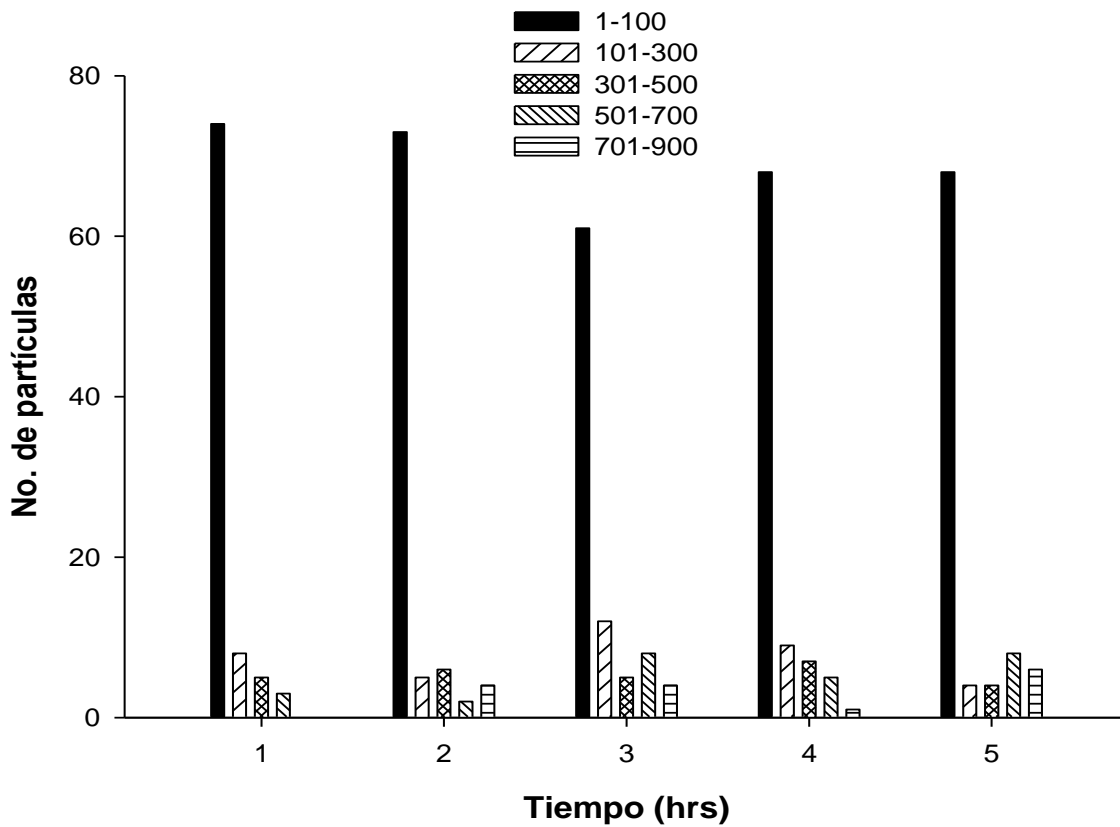


Fig. 5 Cambios temporales (1, 2, 3, 4 y 5 horas) en la distribución del tamaño de las micropartículas formuladas (μm) en la columna de agua, cuando se agregó directamente el alimento al tanque experimental.

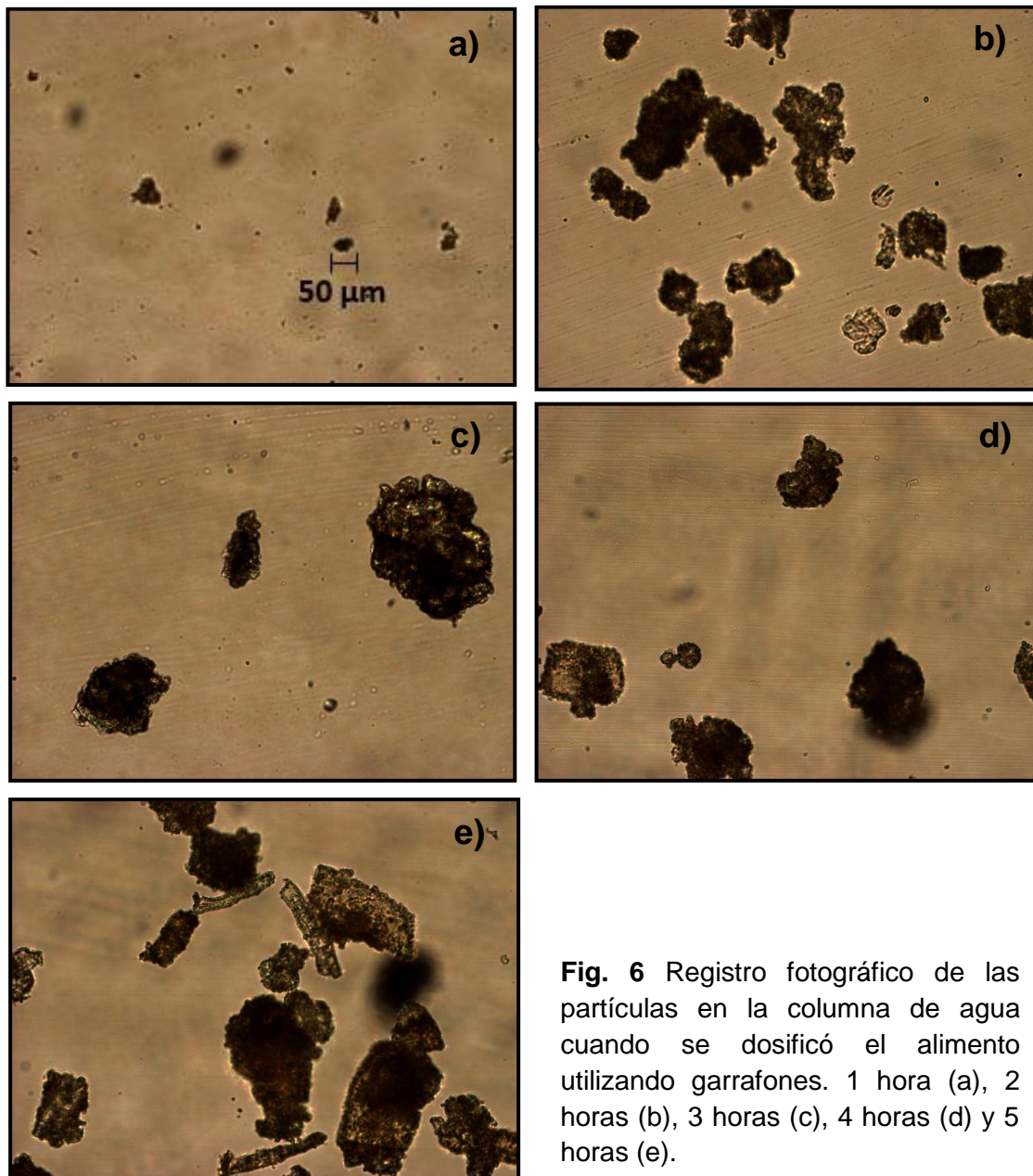


Fig. 6 Registro fotográfico de las partículas en la columna de agua cuando se dosificó el alimento utilizando garraones. 1 hora (a), 2 horas (b), 3 horas (c), 4 horas (d) y 5 horas (e).

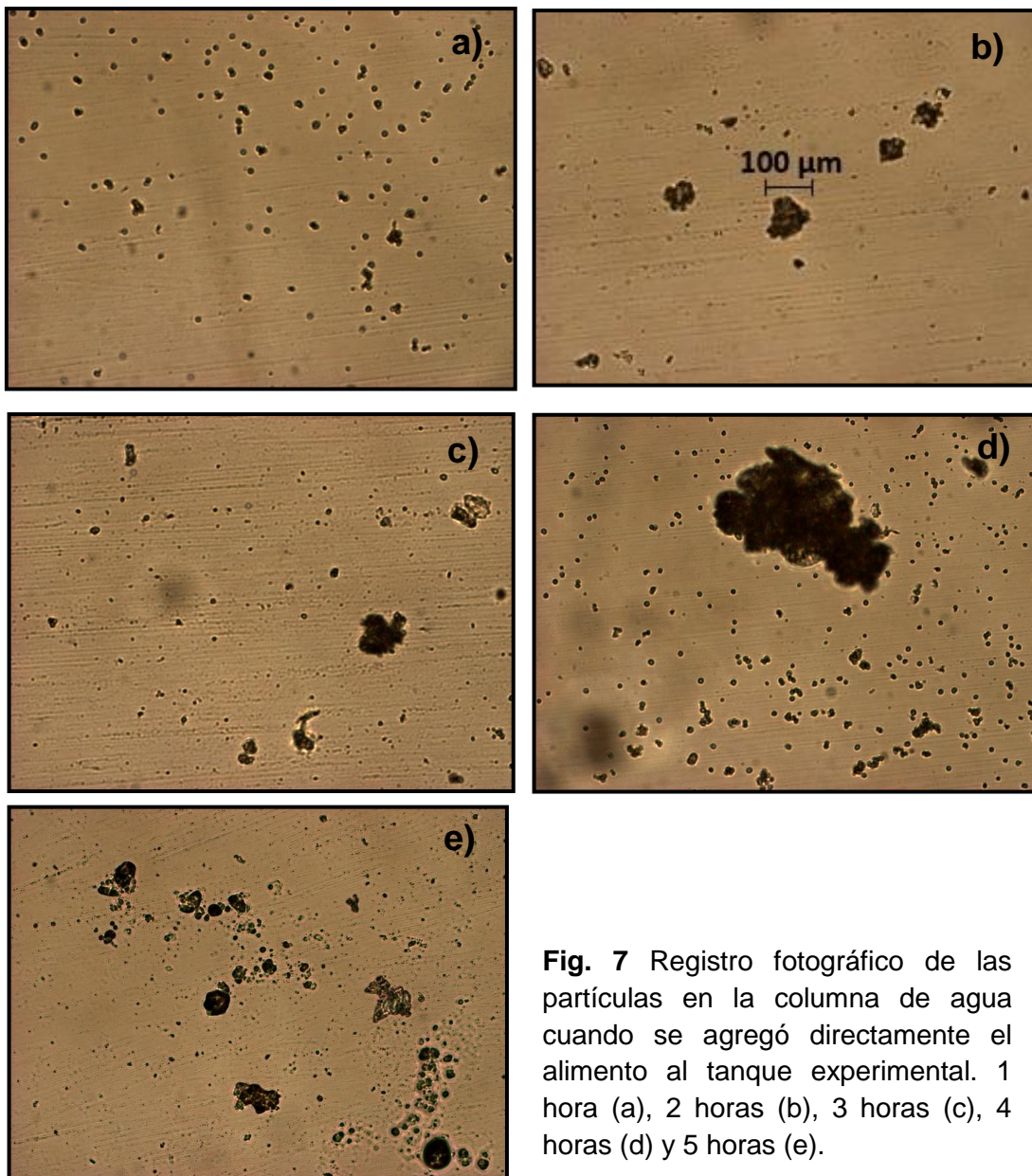


Fig. 7 Registro fotográfico de las partículas en la columna de agua cuando se agregó directamente el alimento al tanque experimental. 1 hora (a), 2 horas (b), 3 horas (c), 4 horas (d) y 5 horas (e).

Tasas de ingestión

Se encontró una correlación positiva ($r^2 = 0.81$) y altamente significativa ($P=0.001$) entre el método de conteo de células directo y el método gravimétrico (Fig. 8). Las IR promedio entre los tratamientos variaron de 320,000 a 508,000 cel T-ISO-equivalentes g^{-1} peso vivo $^{-1} h^{-1}$ sin diferencias significativas entre los tratamientos cuando se expresaron como Isochrysis-equivalente ($P=0.525$) (Fig. 9).

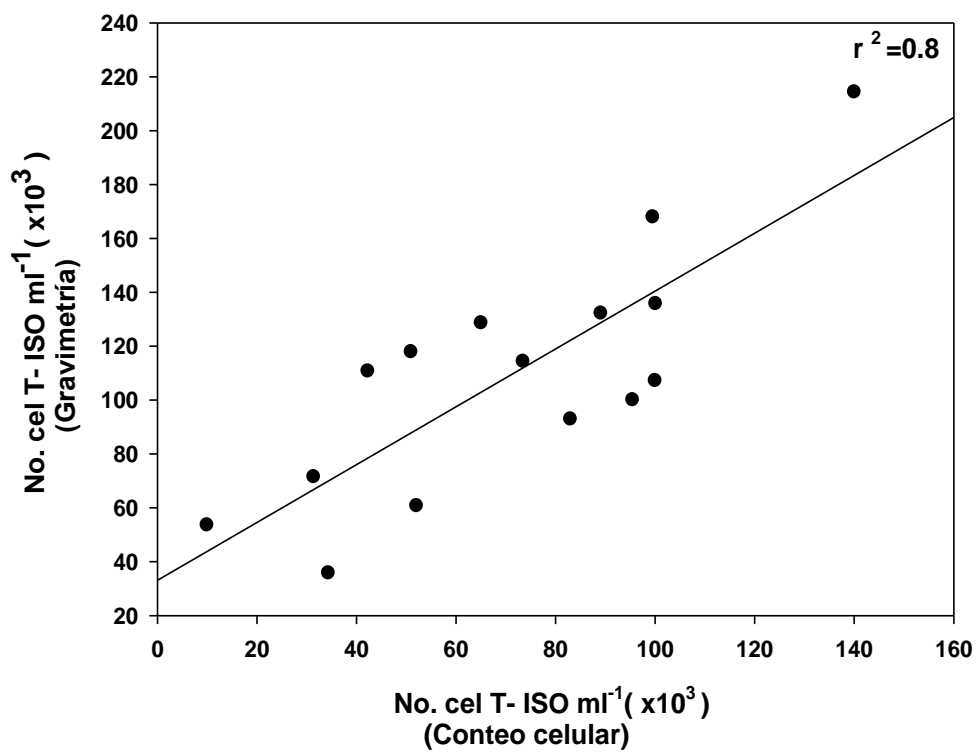


Fig. 8 Relación entre la cantidad de células estimadas gravimétricamente y mediante conteo directo con el contador Multisizer 3.

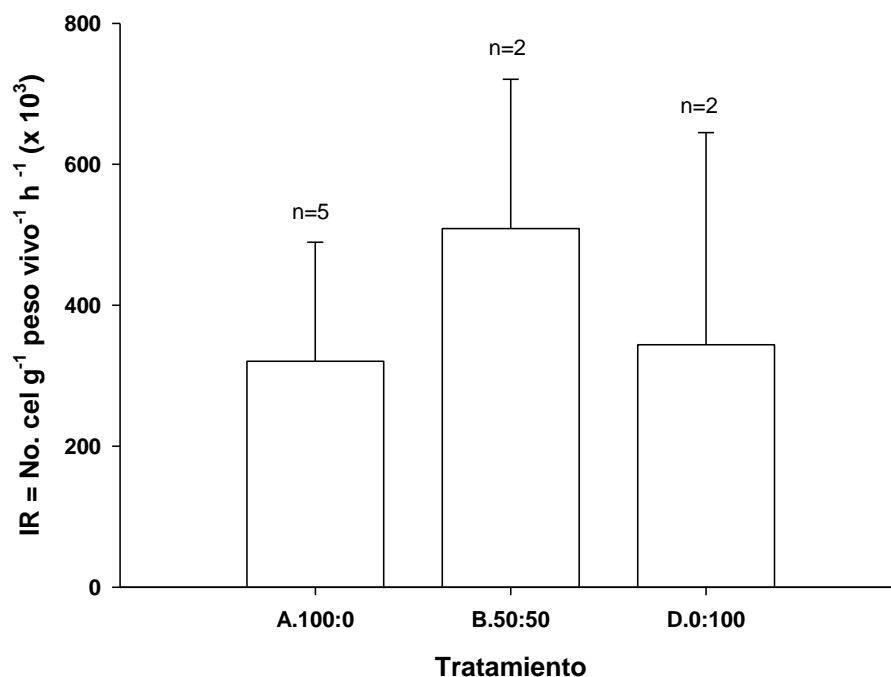


Fig. 9 Tasas de ingestión (promedio \pm error estándar) estimadas para *P. globosa* alimentados con los tratamientos 100:0, 50:50, y 0:100 (alimento vivo: alimento formulado).

Crecimiento, índice de condición y gonadosomático

Durante el acondicionamiento se obtuvo el 100% de sobrevivencia y no se observaron diferencias significativas del peso total promedio (Pt) de los organismos sometidos a los distintos tratamientos ($P > 0.05$), aunque esta variable tendió a disminuir en la última semana del experimento en todos los tratamientos (Tabla 3).

Tabla 3. Cambio semanal del peso total de *P. globosa* alimentados con distintas proporciones de alimento vivo y alimento formulado: 100:0, 50:50, 25:75, 0:100 y 25:0 M:F. Valores promedio y error estándar.

Fecha de muestreo	Tratamientos				
	100:0 M	50:50 M:F	25:75 M:F	0:100 F	25:0 M
25-oct	978 ^a ± 30.2	953 ^a ± 52.6	934 ^a ± 20.1	943 ^a ± 31.1	1000 ^a ± 46.1
31-oct	976 ^a ± 37.8	949 ^a ± 38.2	973 ^a ± 19.5	964 ^a ± 39.1	994 ^a ± 47.4
07-nov	969 ^a ± 38.4	925 ^a ± 25.3	973 ^a ± 16.4	929 ^a ± 31.5	980 ^a ± 48.5
15-nov	1024 ^a ± 14.5	974 ^a ± 22	966 ^a ± 42.7	957 ^a ± 43.9	985 ^a ± 45.5
21-nov	1000 ^a ± 17.2	977 ^a ± 20	963 ^a ± 48.7	939 ^a ± 50.2	1036 ^a ± 113
28-nov	1145 ^a ± 38.7	975 ^a ± 56	968 ^a ± 32.4	972 ^a ± 44	1028 ^a ± 132
04-dic	980 ^a ± 44.2	927 ^a ± 22.5	818 ^a ± 169	900 ^a ± 27.3	952 ^a ± 125

Tampoco se detectaron diferencias significativas entre tratamientos con respecto al peso de la concha ($P= 0.588$) o el peso de la carne ($P= 0.868$) a lo largo del experimento. Los valores de estas variables mostraron valores finales promedio de 176.2 ± 6.1 a 191.8 ± 2.7 g y de 356.5 ± 21.8 a 364.0 ± 8.1 g respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Cambio temporal (promedio \pm error estándar) del peso de la concha (PC), peso carne (PR), peso de la gónada (PG, sin sist. digestivo), índice de condición (IC) e índice gonadosomático (IG) registrados en la segunda y tercer fecha de muestreo para los tratamientos 100:0, 50:50, 25:75, 0:100 y 25:0 M:F. Al inicio del experimento (25-Oct) los organismos se encontraban indiferenciados y sus valores iniciales fueron: PC=193 \pm 13 g, PR=279 \pm 17 g, IC=144 \pm 6.

Variable	Tratamientos				
	100:0 M	50:50 M:F	25:75 M:F	0:100 F	25:0 M
15-nov					
PC (g)	189.2 ^a \pm 5.3	188.6 ^a \pm 6.3	186.1 ^a \pm 3.8	177.7 ^a \pm 7.3	186.5 ^a \pm 6.0
PR (g)	344.0 ^a \pm 23.6	318.8 ^a \pm 23.6	351.1 ^a \pm 11.6	328.7 ^a \pm 7.4	300 ^a \pm 11.0
PG (g)	23.9 ^a \pm 0.93	15.5 ^a \pm 5.6	19.4 ^a \pm 2.1	16.7 ^a \pm 4.1	9.6 ^a \pm 2.4
IC	180.8 ^a \pm 16.5	170.1 ^a \pm 1.0	188.7 ^a \pm 6.9	185.5 ^a \pm 5.0	161.2 ^a \pm 7.8
IG	12.7 ^a \pm 0.8	8.4 ^a \pm 3.1	10.3 ^a \pm 0.9	9.4 ^a \pm 2.1	5.1 ^a \pm 1.3
04-dic					
PC (g)	191.8 ^a \pm 2.7	176.2 ^a \pm 6.1	184.5 ^a \pm 7.1	185.6 ^a \pm 9.6	189.5 ^a \pm 7.4
PR (g)	360.2 ^a \pm 6.1	363.6 ^a \pm 8.1	363.0 ^a \pm 5.4	356.5 ^a \pm 21.8	387.6 ^a \pm 24.14
PG (g)	37.6 ^a \pm 2.5	35.0 ^a \pm 3	21.6 ^b \pm 1.8	22.0 ^b \pm 3.2	17.2 ^b \pm 1.5
IC	187.8 ^a \pm 3.9	206 ^a \pm 3.3	197.5 ^a \pm 10.9	194.2 ^a \pm 20.7	203.8 ^a \pm 16.9
IG	19.6 ^a \pm 1.7	19.9 ^a \pm 2.8	11.7 ^b \pm 0.5	11.8 ^b \pm 1.0	9.0 ^b \pm 0.5

El peso de la gónada fue significativamente diferente entre tratamientos en la última fecha de muestreo ($P < 0.001$), de tal forma que el valor promedio más alto (37.6 \pm 2.5 g) se observó en el tratamiento 100:0 M, seguido del tratamiento 50:50 M:F (35.0 \pm 3) y el más bajo (17.2 \pm 1.5 g) en los organismos expuestos a sub-alimentación (25:0 M) (Tabla 4). El IG también mostró diferencias significativas hasta la última fecha de muestreo (6 semanas), así el IG de los organismos alimentados con 100:0 M y 50:50 M:F (19.6 a 19.9) fue significativamente mayor ($P < 0.001$) que el del resto de los tratamientos (Tabla 4). Por el contrario, el índice de condición mostró valores relativamente constantes

y sin diferencias significativas durante el transcurso del experimento ($P=0.503$, 3^{er} semana y $P=0.855$ 6^{ta} semana). Cuando el peso de la gónada se graficó en función del sexo se observó un rápido crecimiento en las primeras 3 semanas de experimentación, así como un efecto significativo de los tratamientos en hembras y machos ($P=0.005$ y $P=0.001$) en la última fecha de muestreo. Los organismos alimentados con 100:0 M y 50:50 M:F mostraron gónadas más pesadas, en los tratamientos 25:75 M:F, 0:100 M y 25:0 M el peso de la gónada se mantuvo relativamente constante en ambos sexos a partir de la segunda fecha de muestreo (Fig. 10).

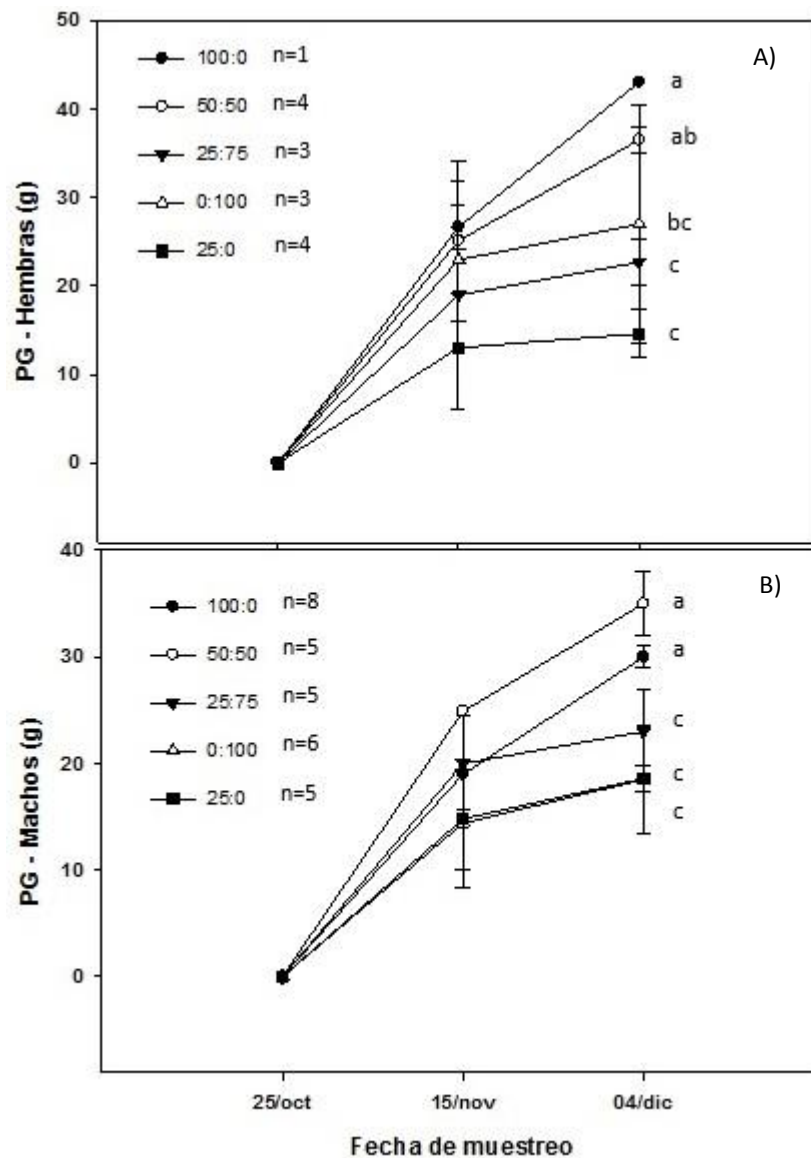


Fig. 10 Cambios temporales (promedio \pm error estándar) del peso de gónada de hembras (A) y machos (B) de *P. globosa* durante el periodo de acondicionamiento. Los organismos fueron alimentados con los tratamientos 100:0, 50:50, 25:75, 0:100 y 25:0 (alimento vivo: alimento formulado).

Proporción de sexos, fecundidad y eclosión

Considerando el total de organismos experimentales, se observó una proporción de sexos de 1.5:1 (100:0 M), 1.5:1 (50:50 M:F), 2.2:1 (25:75 M:F), 0.9:1 (0:100 M:F) y 2.5:1 (25:0 M) (Tabla 5).

Tabla 5. Número de machos (M), hembras (H), organismos indiferenciados (I) y proporción de sexos de *P. globosa* registrados en cada fecha de muestreo. Los organismos fueron acondicionados bajo 5 tratamientos experimentales (100:0, 50:50, 25:75, 0:100 y 25:0 M:F).

FECHA DE MUESTREO	VARIABLE	TRATAMIENTOS				
		100:0 M	50:50 M:F	75:25 M:F	0:100 F	25:0 M
15-nov	M	1	4	6	2	5
	H	5	2	2	6	0
	I	2	3	1	1	3
04-dic	M	8	5	5	6	5
	H	1	4	3	3	4
	I	0	0	0	0	3
Razón M:H		1.5:1	1.5:1	2.2:1	0.8:1	2.5:1

A la mitad del experimento, solo 10 organismos de los 45 muestreados se encontraban indiferenciados (Tabla 5). Al final del experimento los organismos de todos los tratamientos se encontraban maduros, con ovocitos viables y espermias activos. Solo en los organismos del tratamiento control (25:0 M) se registró un total de 3 organismos inmaduros en los cuales también se observó flacidez y transparencia del manto. Estas características en el manto también se observó en 2 organismos del tratamiento 0:100 F.

La fecundidad de las hembras de los distintos tratamientos varió de 1.7 a 6.5 millones de huevos mientras que la de machos varió de 15×10^9 a 22×10^9 espermias org^{-1} (Tabla 7). La eclosión de ovocitos, medida como porcentaje de huevos que alcanzaron la fase larval de charnela recta o "D" varió de 69 a 13% (Tabla 6). No se observaron eventos de desove natural durante el transcurso del experimento.

Tabla 6. Fecundidad de hembras (H) y machos (M) de *P. globosa* después de 6 semanas de acondicionamiento y sometidas a 5 tratamientos experimentales (100:0, 50:50, 25:75, 0:100 y 25:0 M:F). Promedio \pm error estándar.

TRATAMIENTO	SEXO	n*	VOL. TOTAL GÓNADA (ML)	VOL. TOTAL CORREGIDO O GÓNADA (ML)	VOL. MUESTRA GÓNADA (ML)	NO. OVO/ESPERMA MUESTRA ⁻¹ GÓNADA	FECUNDIDAD MUESTRA ⁻¹ GÓNADA	FECUNDIDAD ORGANISMO ⁻¹
A.100:0	H	1	55.0	33.3	0.2	39×10^3	195×10^3	6.5×10^6
	M	8	44.9 ± 2.3	21.58 ± 1.2	0.38 ± 0.02	$32 \times 10^7 \pm 10 \times 10^7$	$79 \times 10^7 \pm 24 \times 10^7$	$15 \times 10^9 \pm 42 \times 10^8$
B.50:50	H	4	45.3 ± 5.0	23.3 ± 2.5	0.4 ± 0.04	$73 \times 10^3 \pm 3 \times 10^4$	$184 \times 10^3 \pm 6 \times 10^4$	$4.3 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$
	M	5	36.2 ± 5.4	17.97 ± 3.4	0.35 ± 0.05	$45 \times 10^7 \pm 10 \times 10^7$	$12 \times 10^8 \pm 22 \times 10^7$	$22 \times 10^9 \pm 51 \times 10^8$
C.25:75	H	3	38.3 ± 4.4	18.0 ± 3.0	0.4 ± 0.03	$66 \times 10^3 \pm 3 \times 10^3$	$153 \times 10^3 \pm 1 \times 10^4$	$2.7 \times 10^6 \pm 7 \times 10^5$
	M	5	40.8 ± 2.5	17.3 ± 2.3	0.33 ± 0.02	$30 \times 10^7 \pm 75 \times 10^6$	$97 \times 10^7 \pm 25 \times 10^7$	$15 \times 10^9 \pm 46 \times 10^8$
D.0:100	H	3	49 ± 7.9	24.2 ± 8.9	0.3 ± 0.06	$46 \times 10^3 \pm 9 \times 10^3$	$149 \times 10^3 \pm 1 \times 10^4$	$3.6 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$
	M	6	39.2 ± 4.6	16.6 ± 3.9	0.28 ± 0.07	$26 \times 10^7 \pm 71 \times 10^6$	$95 \times 10^7 \pm 17 \times 10^7$	$16 \times 10^9 \pm 46 \times 10^8$
E.25:0	H	4	49.5 ± 4.1	17.9 ± 2.7	0.2 ± 0.02	$21 \times 10^3 \pm 4 \times 10^3$	$90 \times 10^3 \pm 2 \times 10^4$	$1.6 \times 10^6 \pm 5 \times 10^5$
	M	5	39 ± 3.5	15.83 ± 2.8	0.17 ± 0.01	$22 \times 10^7 \pm 23 \times 10^6$	$13 \times 10^8 \pm 20 \times 10^7$	$20 \times 10^9 \pm 41 \times 10^8$

*Número de organismos disectados.

Tabla 7. Porcentaje de eclosión de adultos de *P. globosa* registrados en los 5 tratamientos experimentales (100:0, 50:50, 25:75, 0:100 y 25:0 M:F).

TRATAMIENTOS	n*	NO. OVO FERTILIZADOS HEMBRA ⁻¹	NO. LARVAS RECUPERADAS	% ECLOSIÓN
A. 100:0	1	5,000	3,451	69.0
B. 50:50	4	5,000	2056 ± 750	42.6 ± 12.6
C. 25:75	3	5,000	1264 ± 744	25.2 ± 14.8
D. 0:100	3	5,000	1903 ± 795	38.0 ± 15.9
E. 25:0	4	5,000	654 ± 209	13.0 ± 4.19

*Número de organismos disectados.

DISCUSIONES

Durante las 6 semanas que estuvieron acondicionándose las almejas experimentales se obtuvo un incremento en peso vivo y en peso de la gónada así como una sobrevivencia del 100%, lo cual sugiere que los organismos fueron capaces de ingerir el alimento microparticulado gracias a que este se mantuvo en suspensión. Esto se pudo comprobar no solamente por el incremento en peso sino también por el tiempo de permanecía del alimento en la columna de agua. Por lo tanto, el diseño específico del sistema de recirculación utilizado en el presente estudio parece ser eficiente en mantener las partículas en suspensión durante 5 horas, aunque después tendían a sedimentarse de forma natural. Dicha eficiencia del sistema se debió a que los orificios de la base cuadrangular del airlift orientados en distintas direcciones logró succionar la mayor parte

de las partículas que llegaban al fondo del tanque, llevarlas hasta la zona de descarga del airlift y regresarlas nuevamente a la columna del agua, logrando así mantener las partículas en suspensión con una velocidad del agua de 18 cm min^{-1} . Esta velocidad se encuentra dentro del rango de $15\text{-}30 \text{ cm min}^{-1}$ para mantener un movimiento uniforme y homogéneo de las partículas en la columna del agua (Timmons y Ebeling, 2007).

En el presente estudio además del biofiltro de roca también se incluyó un biofiltro de coral con el fin de aumentar la superficie de colonización bacteriana. Esta combinación permitió mantener los niveles de amonio por debajo de 0.1 mg l^{-1} . Hasta donde sabemos esta es la primera vez que se utiliza este sistema de recirculación en moluscos bivalvos, y se demostró que este fue eficiente en mantener las partículas de alimento balanceado en suspensión y disponibles para los organismos en cultivo. El diseño del sistema de recirculación con el biofiltro de roca fue diseñado originalmente por Malone y Burden (1988b) para el cultivo de cangrejo. Otros autores han utilizado el sistema de airlift para la recirculación del agua en el cultivo de otros moluscos bivalvos, pero sin incluir una base, un biofiltro de coral y roca y utilizando solamente microalga viva (Widman, 1998; Christophersen *et al.*, 2006; Pfeiffer y Rusch, 2000).

Por otra parte, esta es la primera vez que se utiliza y valida el método gravimétrico para evaluar IR en moluscos bivalvos. El hecho de obtener una correlación positiva ($r^2=0.81$) entre el método directo de conteo de células y el gravimétrico nos permite sugerir que este último podría ser una alternativa para evaluar tasas de ingestión cuando se utilizan alimentos inertes. Los valores de IR obtenidos con ambos métodos fue similar a lo reportado por García-Esquivel *et al.* (2013), quienes evaluaron IR en almejas de la misma especie con peso similar, en las mismas condiciones de cultivo, (ración alimenticia, temperatura) y en tanques de forma cilíndrica (200 L). Lo anterior sugiere que los valores obtenidos en el presente estudio con el método gravimétrico y directo fueron consistentes con lo reportado anteriormente. Otros autores han cuantificado IR en otros moluscos

bivalvos (Albentosa *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 1991; Wilson, 1980). Sin embargo sus datos no son comparables con el presente estudio ya que además de que utilizaron solamente microalga, las especies de bivalvos y microalgas, y el tamaño de los organismos fueron diferentes a los del presente estudio.

A pesar que las IR se evaluaron correctamente con ambos métodos se obtuvieron diferencias en crecimiento. Lo anterior se debió a dos posibles causas: a) por la sedimentación natural de las partículas inertes, b) porque las partículas no estuvieron 100% disponibles para los organismos por la parte que se aglutinó (Figs. 4 y 5). En relación al primer punto, las partículas inertes estuvieron disponibles para los organismos solamente durante un periodo de 5 horas mientras que las microalgas estuvieron disponibles todo el tiempo ya que son organismos flagelados vivos. Por lo anterior, es probable que la falta de movilidad de las partículas inertes sea la posible causa de que se utilicen generalmente solo como suplemento sustituyendo un 50% al alimento vivo (Castell y Trider, 1974; Masson, 1977; Badillo *et al.*, 2009). En relación al segundo punto las partículas tendían al proceso de aglutinación una vez que se disolvían en el agua, registrándose partículas hasta de 800 μm cuando se alimentó con los garrafones dosificadores. Después el proceso de aglutinación disminuyó cuando se agregó el alimento directamente al tanque experimental, predominando partículas con tamaños de 10-100 μm . Se ha reportado que los adultos de moluscos bivalvos pueden ingerir partículas hasta de 75 μm (Dunphy *et al.*, 2006). Por lo tanto, el hecho de que en el presente estudio predominaran partículas en el rango de tamaño de 10 a 100 μm (excepto los primeros 15 días) pero que también se registran partículas mayores a 100 μm , sugiere que los organismos solamente ingirieron una parte del total de la ración alimenticia. Dado lo anterior, algunos autores han utilizado el doble de la ración de alimento inerte basado en el peso seco de los organismos (Jones, 1979; Badillo *et al.*, 2009) considerando que parte de las partículas obtenidas no serían de tamaño adecuado para moluscos bivalvos.

Otros estudios mencionan que la mayor eficiencia de retención de partículas en etapa adulta de bivalvos marinos se encuentra en el rango de 3 a 20 μm (Haven y Morales-Álamo, 1970), por lo que en el presente estudio también es probable que las partículas más grandes se hayan rechazado como pseudoheces antes de la ingestión. Algunos autores mencionan que partículas mayores a 30 μm (Bernard, 1974) o 40 μm (Defosse y Hawkins, 1997) posiblemente se asienten en el manto y sean expulsadas como pseudoheces en moluscos bivalvos. En nuestro grupo de trabajo, Badillo *et al.*, (2009) lograron obtener partículas menores a 30 μm de alimento balanceado triturándolo con un molidor analítico para la alimentación de postlarvas de *C. gigas*. En el presente estudio no fue posible utilizar este tipo de molidor debido al alto contenido de lípidos de la dieta.

En el presente estudio se trató de simular la cantidad de proteínas, lípidos y carbohidratos presentes en *I. galbana*, con el objetivo de obtener una dieta de alta calidad nutricional. Se utilizaron dos fuentes de lípidos y proteínas para garantizar la disponibilidad de ácidos grasos y aminoácidos esenciales para *P. globosa*. Así la dieta tal vez estaría limitada en cantidad pero no en calidad. Se sabe que el aceite de maíz es rico en ácido linoleico (18:2n-6), mientras que el aceite de pescado es rico en ácido eicosapentanoico (EPA 20:6n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) pero contiene ácido linoleico bajo (Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000). Del mismo modo el perfil de aminoácidos de la harina de pescado y harina de soya incluida en la dieta fueron complementarios, la típica deficiencia de metionina y lisina en la proteína de soya estuvo cubierto por la alta cantidad de estos aminoácidos presentes en la harina de pescado (Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000). En las formulaciones de dietas balanceadas generalmente se utilizan una o dos fuentes de aglutinantes, en el presente estudio además de almidón y gelatina también se añadió alginato (Nutrikelp[®]) con el fin de aumentar la hidroestabilidad de las micropartículas en el agua. En las especies del género *Panopea spp.* no se conocen los requerimientos nutricionales, pero se ha reportado que

crecen y maduran mejor cuando son alimentadas con la microalga *Isochrysis sp* (clon T-ISO) (García-Esquivel *et al.*, 2013).

En el presente estudio el tiempo de acondicionamiento no fue suficiente para detectar un efecto significativo de las dietas sobre el peso vivo durante las 6 semanas de acondicionamiento. Esto coincide con estudios anteriores donde se ha observado un incremento significativo en peso vivo solo a partir de la 7^a semana de acondicionamiento (García-Esquivel *et al.*, 2013). En contraste, el efecto de las dietas se vio reflejado en el peso de la gónada (PG) y fecundidad, así como en el grosor del manto. Así los organismos alimentados con los tratamientos 100:0 M y 50:50 M:F tuvieron el mayor PG y fecundidad que el resto de los tratamientos. Por otra parte, algunos organismos alimentados con 100% alimento inerte exhibieron un manto delgado y transparente. Esta característica en el manto también se observó en los organismos del tratamiento control (25:0 M), en este caso comprobándose que realmente estuvieron sub-alimentados y que la inadecuada ración de alimento resultó en la utilización de reservas corporales, viéndose reflejado en el bajo peso de la gónada y en la obtención de algunos organismos inmaduros al final del experimento. Es importante notar que los organismos del tratamiento 0:100 F desarrollaron gónadas más pequeñas que aquellos alimentados con microalgas, sin embargo lograron desovar, lo cual indica que la dieta inerte fue ingerida aunque no en cantidades suficientes.

En resumen, el presente estudio mostró que las dietas balanceadas microparticuladas podrían representar una importante alternativa como fuente de alimentación para el acondicionamiento de adultos de bivalvos en laboratorio. Aún es necesario eficientizar el método de preparación del alimento para que este no se aglutine y también para obtener un tamaño de partícula más uniforme. Es probable que algún esquema de alimentación alternativo pudiera mejorar la disponibilidad del alimento para los organismos.

CONCLUSIONES

- 1.- El sistema de recirculación utilizado permitió mantener el alimento balanceado microparticulado en suspensión y disponible para *P. globosa* durante 3 a 5 hrs.
- 2.- Se validó el método gravimétrico para medir tasas de ingestión en *P. globosa*, lo que representa una nueva alternativa para cuantificar IR en moluscos bivalvos cuando se utilizan dietas inertes o mezclas.
- 3.- Los organismos alimentados con 50% o 100% microalga exhibieron mayor peso de gonada y el mayor índice gonadosomático que el resto de los tratamientos.
- 5.- La mayor fecundidad y porcentaje de eclosión de *P. globosa* se obtuvo en los tratamientos 100:0 M y 50:50 M:F.
6. Se necesitan estudios más detallados sobre esquemas de alimentación con micropartículas inertes para moluscos bivalvos.

LITERATURA CITADA

- Albentosa, M., Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., Labarta, U. 1999. Growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussatus* (L.) spat fed on microalgal and wheatgerm flour diets. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 232: 23–37.
- Albentosa, M., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., Pérez-Camacho, A., 2003. Absorption of biochemical components and feeding behaviour with natural and carbohydrate-rich diets in *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra* clams. *J. Shellfish Res.* 22: 443-449.
- Aragón-Noriega, E.A., Chávez-Villalba, J., Gribben, P.E., Alcantara-Razo, E., Maeda-Martínez, A.N., Arámbula-Pujol, E.M., García-Juárez, A.R., Maldonado-Amparo, R. 2007. Morphometric relationships, gametogenic development and spawning of the geoduck clam *Panopea globosa* (Bivalvia: *Hiattellidae*) in the central Gulf of California. *J. Shellfish Res.* 26: 423–431.
- Arámbula-Pujol, E.M., García-Juárez, A.R., Alcántara-Razo, E., Aragón-Noriega, E.A. 2008. Aspects of reproductive biology of the geoduck clam *Panopea globosa* (Dall 1898) in the Gulf of California. *Hidrobiológica*. 18: 89-98.
- Badillo-Salas, C.E., Valenzuela-Espinoza, E., González-Gómez, MA., Pares-Sierra, G., Ley-Lou, F., García-Esquivel, Z. 2009. Comparative growth of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) postlarvae with microfeed and microalgal diets. *Aquacult.* 17: 173–186.
- Bayne, B.L., Newell, R.C. 1983. Physiological energetics of marine mollusks. En: Wilbur, K.M y Saleuddin, A.SM. (eds.). *The Mollusca*, Vol. 4, Academic Press, N.Y. 523 pp.
- Brett, J.R y Groves, T.D. 1979. Physiological energetics. In: *Fish Physiology*. (Ed. By W.S. Hoar, D.J. Randall y J.R. Brett). Vol. 8, Academic Press, N. Y. 279-350 pp.
- Brenko, M.H., Calabrese, A., 1969. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 4, 224-226.
- Caers, M., Coutteau, P., Cure, K., Morales, V., Gajardo, G., Sorgeloos, P., 1999b. The Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819): II. Manipulation of the fatty acid composition and lipid content of the eggs via lipid supplementation of the broodstock diet. *Comp. Biochem. Physiol. B* 123: 97-103.
- Caers, M., Coutteau, P., Cure, K., Morales, V., Gajardo, G., Sorgeloos, P. 1999. The Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819): II. Manipulation of the fatty acid composition and lipid content of the eggs via lipid supplementation of the broodstock diet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: B. and Mol. Biol.* 123: 97–103.

- Caers, M., Utting, S.D., Coutteau, P., Millican, P.F., Sorgeloos, P., 2002. Impact of the supplementation of a docosahexaenoic acid-rich emulsion on the reproductive output of oyster broodstock, *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 140: 1157–1166.
- Caers, M., Coutteau, P., Sorgeloos, P., Gajardo, G., 2003. Impact of algal diets and emulsions on the fatty acid composition and content of selected tissues of adult broodstock of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquacult* 217: 437–452.
- Calderón-Aguilera, L.E., Aragón-Noriega, E.A., Reyes-Bonilla, H., Paniagua-Chávez, C.G., Romo-Curiel, A.E., Moreno-Rivera, V.M. 2010. Reproduction of the Cortes geoduck. *Panopea globosa* (Bivalvia, Hiatellidae) and its relationship with temperature and ocean productivity. *J. Shellfish Res.* 29: 135–141.
- Castell, J.D. y Trider, D.J. 1974. Preliminary feeding trials using artificial diets to study the nutritional requirements of oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Fish. Res. Bd. Can.* 31: 95-99.
- Christophersen, G., Torkildsen, L., Meeren, T. 2006. Effect of increased water recirculation rate on algal supply and post-larval performance of scallop (*Pecten maximus*) reared in a partial open and continuous feeding system. *Aquacult. Eng.* 35: 271-282.
- Coutteau, P., Castell, J. D., Ackman, R.G., Sorgeloos, P. 1996. The use of lipid emulsions as carriers for essential fatty acid in bivalves, a test case with juvenile *Placopecten magellanicus*. *J. Shellfish Res.* 15: 259-264.
- Coutteau, P., Hadley, N. H., Manzi, J., Sorgeloos, P. 1994a. Effect of algal ration and substitution of algae by manipulated yeast diets on the growth of juvenile *mercenaria mercenaria*. *Aquacult.* 120: 135-150.
- Curatolo, A., Ryan, M. J., Mercer, J. P. 1993. An evaluation of the performance of Manila clam spat (*Tapes philippinarum*) fed on different rations of spray-dried algae (*Tetraselmis suecica*). *Aquacult.*, 112: 179-186.
- Curatolo, A., Ryan, M. J., Mercer, J. P. 1993. An evaluation of the performance of manila clam spat *Tapes philippinarum* fed on different rations of spray-dried algae *Tetraselmis suecica*. *Aquacult.* 112: 179-186.
- Defosse, J.M., Hawkins, A.J.S, 1997. Selective feeding in shellfish: size-dependent rejection of large particles within pseudofaeces from *Mytilus edulis*, *Ruditapes philippinarum* and *Tapes decussatus*. *Mar. Biol.* 129: 139-147
- Dunphy, B.J., Hall, J.A., Jeffs, A.G., Wells, R.M. 2006. Selective particle feeding by the Chilean oyster, *Ostrea chilensis* implications for nursery culture and broodstock conditioning. *Aquacult.* 261: 594-602.
- FAO (1993). Estado mundial de la pesca y la acuicultura *Food and Agriculture Organization of United Nations*. Rome.

- Fearman, J., Bolch, C.J.S., Moltschaniwskyj, N.A. 2009. Energy storage and reproduction in mussels, *Mytilus galloprovincialis*: the influence of diet quality. *J. Shellfish Res.* 28: 305–312.
- Foe, C.G. y Knight, A.W., 1985. The effect of phytoplankton and suspended sediment on the growth of *Corbicula fluminea* (bivalvia). *Hydrobiologia*, 127: 105-115.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biological Chem.* 226: 497-509.
- Gabbott, P.A., 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs, in: Hochachka, P.W. (Ed.), *The Mollusca*, Vol. 2, *Environmental Biochemistry and Physiology*. Academic Press, New York, pp. 165-217.
- García-Esquivel, Z., Montes-Magallón, S., González-Gómez, A. 2007. Effect of temperatura and photoperiod on the growth, feed consumption, and biochemical content of juvenile Green abalone, *Haliotis fulgens*, fed on a balanced diet. *Aquacult.* 262: 124-141.
- García-Esquivel, Z., Felbeck, H. 2009. Comparative performance of juvenile red abalone *Haliotis rufescens*, reared in laboratory with fresh kelp and balanced diets. *Aquacult Nutrit.* 15: 209-217.
- García-Esquivel, Z., Valenzuela-Espinoza, E., Buitimea, M., Searcy-Bernal, R., Anguiano-Beltrán, C., Ley-Lou, F. 2013. Effect of lipid emulsion and kelp meal supplementation on thematuration and productive performance of the geoduck clam, *Panopea globosa*. *Aquacult.* 396: 25–31.
- Gosling, E. 2003. *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*, Blackwell Science. United Kingdom. 439 p.
- Guillard, R.R. 1958. Some factors in the use of nanoplankton cultures as food for larval and juvenile bivalves *Proc. natn. Shellfish. Ass.* 48: 134-142.
- Haven, D.S. y Morales-Alamo, R. 1970. Filtration of particles from suspension by the American oyster *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull.* 139: 248-264.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual., *FAO Fisheries Technical Paper No. 471*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 177 pp.
- Helm, M.M., Holland, D.L., Stephenson, R.R. 1973. The effect of supplemental algal feeding of a hatchery breeding stock of *Ostrea edulis* on larval vigour. *J. mar. Biol. Ass. U.K.* 53: 673–684.
- Heras, H., Kean-Howie, J., Ackman, R.G. 1994. The potential use of lipid microspheres as nutritional supplements for adult *Ostrea edulis*. *Aquacult.* 123: 309-322.

- Hertrampf, J.W., Piedad-Pascual, F. 2000. Handbook on ingredients for aquaculture feeds. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 573 pp.
- Hendriks, I.E., Van Duren, L.A., Herman, P.M.J., 2003. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 296: 199–213.
- Ideq (Idaho Division of Environmental Quality), 1988. Idaho Waste Management Guidelines for Aquaculture Operations. Idaho Department of Health and Welfare, Division of Environmental Quality, Twin Falls, ID.
- Jones, D.A., Kanazawa, A., Rahman, S. 1979. Studies on the presentation of artificial diets for rearing the larvae of *Penaeus japonicus* bate. *Aquacult.* 17: 33-43.
- Knaeur, J., Southgate, C. 1997 Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a spray-dried freshwater microalga (*Spongiococcum excentricum*) and microencapsulated lipids. *Aquacult.* 154: 293-303.
- Laing, I. 1987. The use of artificial diets in rearing bivalve spat. *Aquacult.* 65: 243-249.
- Laing, I. y Verdugo, C.G. 1991. Nutritional value of spray-dried *Tetraselmis suecica* for juvenile bivalves. *Aquacult.* 92: 207-218.
- Laing, I., López-Alvarado, J. 1994. Effect of dried algae diets on conditioning and fecundity of Manila clam, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve). *Aquacult. Fish. Manage.* 25: 157-166.
- Langdon, C. J y Waldock M. J. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. mar. Biol. Ass. U.K.* 61: 431-448.
- Langdon, C. J. 2003. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. *Aquacult.* 227: 259-27.
- Langdon, C. J. y Siegfried, C. A., 1984. Progress in the development of artificial diets for bivalve Filter feeders. *Aquacult.* 39: 135-153.
- Langdon, C.J., 1989. Preparation and evaluation of protein microcapsules for a marine suspensión-feeder, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 102: 217-224.
- Loosanof, V. L., Davis H. C. 1963. Rearing of bivalve mollusks. *Adv. Marine Biol.* 1: 1-136.
- Sánchez-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. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. 102 pp.
- Malone, R.F. y Burden, D.G. 1988b. Design of Recirculating Blue Crab Shedding Systems Louisiana Sea Grant College Program.

- Mann, R., 1979a. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *Journal of the Marine J. mar. Biol. Ass. U.K.* 59, 95–110.
- Mann, R., 1979b. The effect of temperature on growth, physiology, and gametogenesis in the Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 296. 38, 121–133
- Manthe, D.P., Malone, R.F., Kumar, S. 1988. Submerged Rock Filter Evaluation Using an Oxygen Consumption Criterion for Closed Recirculating Systems". *J. of Aquacult Eng.* 7: 97-111.
- Martínez, G., Aguilera, C., Mettifogo, L., 2000a. Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquacult* 183: 149-159.
- Marshall, R., McKinley, R., Pearse, C.M. 2012. Effect of temperature on gonad development of the Pacific geoduck clam (*Panopea generosa* Gould, 1850). *Aquacult* 40: 338-341.
- Masson, M. 1977. Observations sur la nutrition des larves de *Mytilus galloprovincialis* avec des aliments inertes. *Mar. Biol.* 40:157-164.
- Mazón-Suastegui, J.M., 1988. Acondicionamiento y desove de cuatro especies de moluscos bivalvos, alimentados con dietas artificiales. *Revista Latinoamericana de Acuicultura* 35: 4–12.
- Navarro, E., Iglesias, J., Pérez-Camacho, A., Labarta, U., Beiras, R. 1991. The physiological energetics of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from different cultivation rafts in the Ria de Arosa (Galicia, N.W. Spain). *Aquacult.* 94: 197-212.
- Nell, J.A. y Wisely, B. 1983. Experimental feeding of Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*).II. Protein supplementation of artificial diets for adult oysters. *Aquacult.* 32: 1-9.
- Nevejan, N., Courtens, V., Hauva, M., Gajardo, G., Sorgeloos, P., 2003b. Effect of lipid emulsions on production and fatty acid composition of eggs of the scallop *Argopecten purpuratus*. *Mar. Biol.* 143: 327-338.
- Nevejan, N. M., Pronker, A.E., Peene, F. 2008. Hatchery broodstock conditioning of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758). Part II. New formulated feeds offer new perspectives to commercial hatcheries. *Aquacult.* 232: 23–37.
- Pirini, M., Manuzzi, M.P., Pagliarani, A., Trombetti, F., Borgatti, A.R., Ventrella, V.2007. Changes in fatty acid composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) fed on microalgal and wheat germ diets. *Comp. Biochem. Physiol. B* 147: 616-626.
- Pfeiffer, T.J., Rusch, K.A. 2000. An integrated system for microalgal and nursery seed clam culture. *Aquacult. Eng.* 24, 15–31.

- Robert, R., Trintignac, P., 1997. Substitutes for live microalgae in mariculture: a review. *Aquat. Living Resour.* 10: 315-327.
- Robinson, A. 1992. Dietary supplements for the reproductive conditioning of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg). II. Effects on glycogen, lipid and fatty acid content of broodstock oysters and eggs. *J. Shellfish Res.* 11: 443-447.
- Rosowsky JR. 2003. Photosynthetic Euglenoids. En: Wehr, J.; Sheath, R (Eds). *Freshwater algae of North America ecology and classification.* Academic Press, EUA.
- Simmonel, I., Boardman, G.D., Waten, B.J., Brazil, B.L. 2002. Factor influencing the nitrification efficiency of fluidized bed filter with plastic bead medium. *Aquacult. Eng.* 26: 41-59.
- Soudant, P., Sanles, M.V, Quere, C., Le Coz, J.R, Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., Sorgeloos, P. 2000. The used of lipid emulsions for esterol supplementation of spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquacult.* 184: 315-326.
- Southgate, P.C., Lee, P. S., Lucas, J. S. 1997. Development of artificial diets for bivalve larvae. *Proceedings of the Aquacult Nutrit Workshop.* 156-164 pp.
- Tapia-Morales, S. 2014. Movilización de reservas bioquímicas y expresión del gen de la vitelina (mRNA VT/VTG), durante el desarrollo gonádico de la almeja de sifón, *Panopea globosa*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. 94 pp.
- Timmons, M., Ebeling, J. (2010). *Recirculating Aquaculture.* 2nd ed. Cayuga Aqua Ventures.
- Utting, S.D., Millican, P.F., 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquacult.* 155, 45–54.
- Uriarte, I., Farías, A., Hernandez, J., Schäfer, C., Sorgeloos, P., 2004. Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): effects of enriched diets. *Aquacult* 230, 349–357.
- Velasco, L.A., Barros, J., 2007. Potential for hatchery broodstock conditioning of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. *Aquacult* 272, 767–773.
- Widman, J.C., 1998. Design of a recirculating nursery culture system for the bay scallop, *Argopecten irradians irradians*. *J. Shellfish Res.* 17, 364 (abstract only).
- Wilson, J.H. 1980. Particle retention and selection by larvae and spat of *Ostrea edulis* in algal suspensions. *Mar. Biol.* 57: 135-145.

APÉNDICES

BIOMÉTRIAS

Anexo 1. ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el peso de la concha de *P. globosa* en la segunda fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos).

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Peso	4	273.813	0.830	0.536
Residual	10	825.041		
Total	14	1098.854		

Anexo 2. ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el peso de la carne de *P. globosa* en la segunda fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos).

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Peso	4	4938.974	0.825	0.538
Residual	10	14957.852		
Total	14	19896.826		

Anexo 3. ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el peso vivo de *P. globosa* en la segunda fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos)

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Peso	4	5402.922	0.435	0.783
Residual	39	121186.05		
Total	43	126588.97		

Anexo 4. ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el peso vivo de *P. globosa* en la tercera fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos)

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Peso	4	11855.085	0.780	0.563
Residual	10	38009.852		
Total	14	49864.937		

GÓNADA

Anexo 5. ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el peso de la gónada de *P. globosa* en la segunda fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos).

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Desarrollo gonadal	4	332.608	2.310	0.129
Residual	10	359.964		
Total	14	692.573		

Anexo 6. ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el peso de la gónada de *P. globosa* en la tercer fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos)

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Desarrollo gonadal	4	977.105	21.507	0.001
Residual	10	113.579		
Total	14	1090.684		
Prueba de Tukey 100:0 50:50				

Anexo 7. ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el IG de *P. globosa* en la segunda fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos)

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Desarrollo gonadal	4	91.453	2.106	0.155
Residual	10	108.537		
Total	14	199.990		

Anexo 8. ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el IG de *P. globosa* en la tercer fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos)

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Desarrollo gonadal	4	301.964	21.361	0.001
Residual	10	35.341		
Total	14	337.304		
Prueba de Tukey 100:0 50:50 M:F				

INDICE DE CONDICIÓN

Anexo 9. ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el IC de *P. globosa* en la segunda fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos)

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Peso	4	1561.907	0.892	0.503
Residual	10	4375.354		
Total	14	5937.261		

Anexo 10. ANOVA de una vía para probar el efecto de los tratamientos sobre el IC de *P. globosa* en la tercer fecha de muestreo (los datos incluyen ambos sexos)

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Peso	4	673.512	0.325	0.855
Residual	10	5182.039		
Total	14	5855.551		