

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA
CALIFORNIA**



FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**"EVALUACIÓN DE *Navicula incerta*, *Amphipora paludosa* var. *hyalina*,
Nitzschia thermalis var. *minor* COMO ALIMENTO PARA POSTLARVAS DE
ABULÓN AZUL (*Haliotis fulgens*) SUMINISTRADA DE FORMA MONO Y POLI-
ESPECÍFICA".**



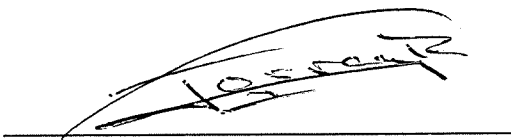
**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE OCEANÓLOGO PRESENTA:
ROGER JAVIER FRÍAS DÍAZ**

Ensenada, B.C., Junio del 2005.

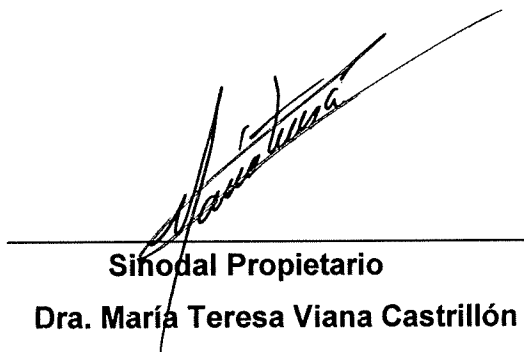
“EVALUACIÓN DE *Navicula incerta*, *Amphipora paludosa* var. *hyalina*, *Nitzschia thermalis* var. *minor* COMO ALIMENTO PARA POSTLARVAS DE ABULÓN AZUL (*Haliotis fulgens*) SUMINISTRADA DE FORMA MONO Y POLI-ESPECIFICA”

**TESIS
QUE PRESENTA:
ROGER JAVIER FRÍAS DÍAZ**

Aprobada por:



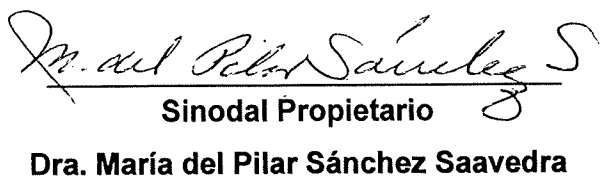
**Presidente del Jurado
Dr. Juan Gabriel Correa Reyes**



**Sinodal Propietario
Dra. María Teresa Viana Castrillón**



**Sinodal Propietario
Dr. Luís Fernando Bückle Ramírez**



**Sinodal Propietario
Dra. María del Pilar Sánchez Saavedra**

AGRADECIMIENTOS.

A mi familia, por apoyarme durante todo este tiempo, por ser mi ejemplo y por inculcarme los valores que hoy me hacen tener la dicha de concluir esta etapa de mi vida.

A mis hermanos por ser parte de mi inspiración, ¡Ahora les toca a ustedes!

A la familia Millán Aguiñaga por adoptarme, apoyarme y soportarme todo este tiempo, gracias por todos los regaños y consejos.

A mi chiquilla (Yoli) por ser tú, por quererme y soportarme, por tu amor y comprensión.

Al Dr. Juan Gabriel Correa Reyes y su familia, por el apoyo, conocimiento y sobretodo por permitirme trabajar a su lado.

A la Dra. Maria Teresa Viana Castrillón por abrirme las puertas de su laboratorio y por todo el apoyo y gratos momentos que me brindó durante todo este tiempo.

Al Dr. Luís Fernando Bükle Ramírez y la Dra. Maria del Pilar Sánchez Saavedra por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A mis rumiantes Miguel, Edgar y Adrián, por acompañarme en toda la trayectoria de la carrera y por estar ahí apoyando la causa.

A todos los salvavidas por haberme hecho vivir tan buenos momentos. ¡Por la vida!

A los compañeros de la gloriosa Facultad de Ciencias Marinas, por los gratos momentos que viví con ustedes.

A los cuates de las fiestas y de gratos momentos, Dani, Yes, Marrana, Juanito, Edgar, Nay, Caro, Karina, Lupita, Francisco, Luís y Bruno, gracias por todo y espero que la amistad y los gratos momentos sigan siendo.

A los compañeros del Laboratorio de Nutrición y Fisiología por los gratos momentos y ricos pasteles.

Al Dr. Ricardo Searcy Bernal y la Dra. Casandra Anguiano Beltrán por permitirme utilizar su equipo y su laboratorio para concluir parte de mis ensayos.

A la granja "BC Abalone S. de R. L. de C. V." por la donación de las postlarvas de abulón utilizadas para este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Baja California, por ser mi casa de estudios, gracias a todos los que hacen que esta universidad sea lo que es.

A la Facultad de Ciencias Marinas, por todo el apoyo que sus maestros y personal administrativo me brindaron durante mi paso por esta facultad.

A mis maestros, que compartieron conmigo y mis compañeros sus vastos conocimientos y que hoy nos dan las herramientas suficientes para continuar con nuestro crecimiento profesional.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas, por el apoyo otorgado y por permitirme trabajar en sus instalaciones.

Y a todos aquellos que de una u otra manera me apoyaron y acompañaron a lo largo de mi trayectoria en Ensenada.

CONTENIDO.

	Pagina
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Antecedentes	6
2.- HIPÓTESIS	10
3.- OBJETIVOS	10
3.1.- Objetivo General	10
3.1.1Objetivos Particulares	11
4.- METODOLOGÍA	13
4.1.- Selección de cepas	13
4.2.- Mantenimiento de cepas	13
4.3.- Evaluación de la calidad nutricional de los cultivos de diatomeas bentónicas	15
4.3.1.- Descripción del sistema	15
4.3.2.- Muestreo de diatomeas	16
4.3.3.- Análisis de la composición proximal de las diatomeas	17
4.3.3.1.- Proteína cruda	17
4.3.3.2.- Lípidos	18
4.3.3.3.- Extracto libre de nitrógeno	18
4.3.4.- Calorimetría	18
4.3.5.- Peso seco y contenido de cenizas	19
4.3.6.- Pigmentos	19
4.3.5.1.- Clorofila "a" en cultivo	19
4.4.- Evaluación del crecimiento de postlarvas de abulón azul (<i>Haliotis fulgens</i>)	20
4.4.1.- Bioensayo de crecimiento	20

4.4.1.1.- Muestreo de postlarvas de abulón	21
4.4.1.2.- Medición	22
4.4.1.3.- Mortalidad	22
4.5.- Tasa de ingestión	22
4.5.1.- Clorofila "a" y Feofitina en las heces	24
4.6.- Medición del consumo de oxígeno	25
4.7.- Calculo del balance energético	26
4.8.- Análisis estadístico	27
5.- RESULTADOS	28
5.1.- Concentración celular	28
5.2.-Composición proximal y bioquímica de las diatomeas Bentónicas	28
5.2.1.- Peso de las cenizas	29
5.2.2.- Contenido de proteínas	29
5.2.3.- Contenido de lípidos	30
5.2.4.- Extracto libre de nitrógeno (ELN)	30
5.2.5.- Calorías	30
5.3.- Bioensayo de crecimiento de postlarvas de abulón	34
5.3.1.- Crecimiento	34
5.3.2.- Ganancia en peso	35
5.3.3.- Eficiencia alimenticia	36
5.3.4.- Mortalidad	37
5.4.- Digestibilidad aparente	39
5.4.1.- Concentración de pigmentos	39
5.4.1.1.- Concentración de clorofila "a" en el Cultivo	39
5.4.1.2.- Concentración de clorofila "a" en Heces	39
5.4.1.3.- Concentración de feofitina en las heces	40
5.4.2.- Digestibilidad aparente en peso orgánico seco	40
5.4.3.- Digestibilidad aparente en peso seco total	41

5.5.- Medición de consumo de oxígeno	43
5.5.1.- Postlarvas alimentadas con diatomeas bentónicas	43
5.5.1.1.- Postlarvas alimentadas día 1	43
5.5.1.2.- Postlarvas alimentadas día 2	43
5.5.1.3.- Postlarvas alimentadas día 3	44
5.5.2.- Postlarvas sin alimentar (24 horas)	45
5.4.2.1.- Postlarvas sin alimentar día 1	45
5.4.2.2.- Postlarvas sin alimentar día 2	45
5.4.2.3.- Postlarvas sin alimentar día 3	46
5.6.- Evaluación de la tasa de ingestión	48
5.6.1.- Ingestión día 1	48
5.6.2.- Ingestión día 2	48
5.6.3.- Ingestión día 3	49
5.7.- Balance energético	51
6.- DISCUSIONES	54
7.- CONCLUSIONES	64
8.- RECOMENDACIONES	65
9.- LITERATURA CITADA	66

LISTA DE FIGURAS.

	Pagina
Figura 1. -Sistema de mantenimiento de cepas donde se muestran los matraces con las diferentes especies de diatomeas bentónicas utilizadas.	14
Figura 2. -Sistema de cultivo de diatomeas bentónicas utilizado para la producción de biomasa para análisis proximales.	16
Figura 3. -Sistema utilizado para la medición del consumo de oxígeno de las postlarvas de abulón azul (<i>Haliotis fulgens</i>).	26
Figura 4. -Crecimiento promedio por día de las postlarvas de abulón azul (<i>Haliotis fulgens</i>) expuestas a cuatro tratamientos nutrimentales diferentes. T1 = <i>Amphiprora paludosa</i> var. <i>hyalina</i> , T2 = <i>Navicula incerta</i> , T3 = <i>Nitzschia thermalis</i> var. <i>minor</i> y T4 = Mezcla de cepas.	37

LISTA DE TABLAS.

	Pagina
Tabla I. Valores promedio de la concentración de células en los cultivos monoespecíficos de <i>Amphiprra paludosa</i> var. <i>hyalina</i> (T1), <i>Navicula incerta</i> (T2) y <i>Nitzschia thermalis</i> var. <i>minor</i> (T3) y cultivos poliespecíficos (T4).	32
Tabla II.- Composición proximal en base seca de los cuatro tratamientos experimentales utilizados para alimentar a postlarvas de abulón azul (<i>Haliotis fulgens</i>). Subíndices diferentes (a > b > c) indican diferencias estadísticas entre los tratamientos experimentales $\alpha = 0.05$.	33
Tabla III.- Crecimiento, utilización del alimento y mortalidad de las postlarvas de abulón azul (<i>Haliotis fulgens</i>) alimentadas con los cuatro tratamientos experimentales. Subíndices diferentes (a > b > c) indican diferencias estadísticas entre los tratamientos* $\alpha = 0.05$.	38
Tabla IV.- Concentración de pigmentos en cultivo y en heces utilizados como un marcador interno para la determinación de digestibilidad aparente en postlarvas de abulón azul (<i>Haliotis fulgens</i>). Subíndices diferentes (a > b > c) indican diferencias estadísticas entre los tratamientos experimentales $\alpha = 0.05$.	42
Tabla V.- Consumo de oxígeno por las postlarvas de abulón azul (<i>Haliotis fulgens</i>) alimentadas con los cuatro tratamientos experimentales. Subíndices diferentes (a > b > c) indican diferencias estadísticas entre los tratamientos $\alpha = 0.05$.	47
Tabla VI.- Ingestión de células por las postlarvas de abulón azul (<i>Haliotis fulgens</i>) alimentadas con los cuatro tratamientos. Subíndices diferentes (a > b > c) indican diferencias estadísticas entre los tratamientos experimentales $\alpha = 0.05$.	50
Tabla VII.- Cálculo del balance energético de las postlarvas de abulón azul (<i>Haliotis fulgens</i>) alimentadas bajo los cuatro tratamientos experimentales. Subíndices diferentes (a > b > c) indican diferencias estadísticas entre los tratamientos $\alpha = 0.05$.	53

“EVALUACIÓN DE *Navicula incerta*, *Amphipora paludosa* var. *hyalina*, *Nitzschia thermalis* var. *minor* COMO ALIMENTO PARA POSTLARVAS DE ABULÓN AZUL (*Haliotis fulgens*) SUMINISTRADA DE FORMA MONO Y POLI-ESPECÍFICA”

1.- INTRODUCCIÓN

El abulón (*Haliotis ssp.*) es un gasterópodo marino herbívoro que vive en sustratos rocosos se alimenta principalmente de la microflora bentónica (juveniles) y algas marinas (adultos) (Leighton, 2000). Se tienen registradas 80 especies de abulón (*Haliotis sp.*) que habitan en las costas de climas templados y semi-tropicales del mundo, con una gran demanda como alimento en el mercado mundial, por lo que constituye un recurso que ha sido sometido a una intensa extracción pesquera (Guzmán de Prío, 1992). La explotación comercial de este recurso en México se ha dado desde hace 145 años y la intensificación y eficiencia de la captura comercial, junto con la baja tasa de crecimiento que presenta, ha resultado en un decremento de sus poblaciones a nivel mundial (Ebert y Houk, 1989).

En la década de los sesentas México fue el principal productor de abulón del mundo (3000 ton año⁻¹) y durante las siguientes dos décadas la producción tuvo un decremento significativo (menos de 1000 ton año⁻¹) (Secretaría de Pesca, 1994). Debido al decremento de las capturas de abulón se inició su cultivo (Searcy, *et al.*, 1988). En 1984 el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) en Baja California inició un programa de investigación y hasta la fecha, se realizan estudios sobre distintos aspectos

de la producción y nutrición de postlarvas, juveniles y adultos de abulón en el laboratorio, así como experimentos para mejorar su cultivo (Searcy, *et al.*, 1988).

Actualmente en las costas de Baja California existen en funcionamiento, dos empresas privadas dedicadas al cultivo y comercialización del abulón. Ambas granjas se encuentran ubicadas en el Ejido Erendira, y son: "Abulónes Cultivados S. de R. L. de C. V." y "Productores Marinos Baja S.A. de C.V."

Además de estas dos granjas existen cinco Cooperativas de pescadores dedicadas a la producción de postlarvas y juveniles con fines de repoblación en bancos naturales. Estos laboratorios se encuentran localizados en: Isla de Cedros (Sociedad Cooperativa Pescadores Nacionales de Abulón), Punta Eugenia (Sociedad de Cooperación la Purísima), Isla Natividad (Sociedad Cooperativa Buzos y Pescadores), La Bocana (Sociedad Cooperativa Progreso) y Bahía Tortugas (Sociedad Cooperativa Bahía Tortugas) (McBride, 1998).

El éxito de las granjas de abulón se encuentra directamente relacionado con la eficiencia y maximización del crecimiento y la sobrevivencia de cada uno de sus estadios de vida. Durante la última década se han desarrollado estudios en el área de nutrición los cuales involucran ambos aspectos. Una de las principales líneas de investigación

que se han venido desarrollando en el área de la nutrición es la de caracterizar los requerimientos alimenticios de cada una de las especies de abulón y de cada uno de sus estadios de vida (Viana, *et al.*, 1994; Watsson, *et al.*, 2004; Durazo, *et al.*, 2004).

Al hablar de requerimientos alimenticios de un organismo se deben considerar varios aspectos tales como: hábitos alimenticios y aspectos de tecnología del alimento (Forma y tamaño), requerimientos nutricionales (proteínas, ácidos grasos y energía, entre otros), dureza y palatabilidad del mismo (McShane, 1994, Rivero y Viana, 1996). Dentro de estos aspectos, resulta importante distinguir a aquellos nutrientes que pueden ser digestibles de aquellos que pueden ser aprovechados físicamente.

En la actualidad, las diatomeas bentónicas son consideradas la fuente principal de alimento para las etapas tempranas de desarrollo del abulón, sin embargo, se conoce muy poco sobre su valor nutrimental (Takami *et al.*, 1997, Kawamura *et al.*, 1998, Daume *et al.*, 2000). A su vez es contrastante ver que existan un gran número de trabajos que mencionan y/o caracterizan el valor nutrimental de las microalgas planctónicas (Epifanio *et al.*, 1976; Epifanio *et al.*, 1979; Laing y Verdugo, 1991; Fidalgo *et al.*, 1994; D'Souza y Loneragan, 1999; Jimmy *et al.*, 2002). En estos estudios se abordan diferentes aspectos sobre el crecimiento y calidad de las microalgas al ser suministradas como alimento a otros organismos acuáticos (larvas, juveniles y adultos de moluscos, crustáceos, peces, entre otros).

Un factor importante para obtener un régimen dietético adecuado es la comprensión y el estudio de la energética nutricional, lo cual genera una mejor eficiencia entre lo que se ingiere, utiliza y pierde (Cho, 1987). Para esto es necesario conocer la proporción de energía bruta contenida en una dieta que es catabolizada como combustible y liberada en forma de calor o anabolizada para constituir reservas de tejido y la que es perdida (Cho, 1987).

La energía contenida en el alimento (energía bruta) y que es ingerida por un organismo se puede dividir en energía digestible (o metabólica) y la no metabólica. La energía digestible es aprovechada y absorbida para su utilización y la energía no metabólica es la energía que se elimina como heces (Smith, 1989). La energía más importante es la energía que se utiliza para la producción de tejido (crecimiento) y para la producción de gametos, esta es obtenida del alimento y retenida para estos procesos (Montaño, 2003)

La energía metabolizable representa la energía digestible menos aquella que se pierde por diversas causas como: compuestos absorbidos pero no utilizados (heces), excreción de productos nitrogenados (orina), calor corporal y formación de mucus (organismos acuáticos) (Montaño, 2003). La pérdida de calor ocurre como resultado de las actividades necesarias para mantenimiento (metabolismo basal), además de las actividades asociadas con la locomoción, termorregulación y por el incremento de calor producido por la digestión del alimento y las subsecuentes transformaciones

moleculares de los nutrientes digeridos por el organismo (acción dinámica específica) (Smith, 1989).

No es fácil conocer la digestibilidad en organismos acuáticos ya que involucra la recolección de heces para cuantificar la cantidad de alimento que fue ingerido y retenido. Existen métodos indirectos para medir la digestibilidad (digestibilidad aparente) donde se utiliza como referencia un marcador interno este indica el grado de digestibilidad de acuerdo al porcentaje de dicho marcador encontrado en las heces. En este método, no se requiere la recolección total de las heces lo cual facilita su determinación. Debido a que las heces deben recolectarse del agua, hace que los marcadores puedan ser disueltos en el medio, provocando una sub o sobrestimación de los valores de digestibilidad (Cuenca y García, 1987; De la Higuera, 1987). Otra problemática asociada con la evaluación de la digestibilidad es que no se obtenga una cantidad adecuada de heces para realizar los estudios de digestibilidad, ya que en muchas investigaciones se trabaja con organismos pequeños que dificultan la recolección o que no se cuenta con la cantidad de muestra necesaria para conocer este valor (Montaño *et al.*, 2002).

En general, la distribución de la energía bruta consumida por un organismo puede representarse en términos del balance energético (Lucas, 1996). La cual está integrada por lo siguientes componentes:

$$C = P + R + F + U$$

donde: C = Consumo, P = Producción, R = Respiración, F = Heces y U = excreción de compuestos nitrogenados.

La ventaja de evaluar el balance energético, es que permite estimar el crecimiento potencial de un organismo a partir de mediciones fisiológicas y expresarlo en porcentaje del total de energía ingerida al alimentarse y así poder comparar la eficiencia de un alimento de una manera directa. La magnitud relativa de cada componente del balance energético permite identificar la dirección en que un organismo está utilizando la energía ingerida. Con la información obtenida de los balances energéticos de organismos, bajo condiciones controladas y basándose en el consumo, perdida y recuperación de la energía, se pueden llegar a realizar cálculos empíricos de los requerimiento de energía de estos organismos (Gómez, 2002).

1.1.- Antecedentes

Las etapas de larva y postlarva de abulón, son los estadios de vida en los que se registran los mayores índices de mortalidad, estas etapas han sido precisamente las menos estudiadas a nivel de nutrición. De los pocos antecedentes que existen en esta materia el trabajo de Correa (2001) evalúa el valor nutrimental de diferentes especies de diatomeas bentónicas, aisladas

de zonas cercanas a las granjas de abulón en México, que son suministradas como alimento a las postlarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*).

Simental *et al.* (2004) mencionan que el enriquecimiento de láminas de *Macrocystis pyrifera* colonizadas con la diatomea bentónica *Navicula incerta* aumenta significativamente el valor nutrimental y que suministradas como alimento tiene un efecto positivo en el crecimiento y sobrevivencia de los juveniles de abulón rojo.

En trabajos donde se ha medido el crecimiento de las postlarvas de abulón evalúan distintas microalgas bentónicas pero sin examinar su composición proximal. Kawamura (1996) el cual considera que el crecimiento y la sobrevivencia de las postlarvas de abulón dependen de la cantidad de alimento disponible y no de la calidad alimenticia de la especie de diatomea bentónica suministrada como alimento. Se sabe que una nutrición deficiente del abulón retrasa el crecimiento del organismo (Hahn, 1989) y los hace más susceptibles a contraer enfermedades y parásitos (Friedman *et al.*, 1995). El historial alimenticio de los organismos es de suma importancia porque en casos graves de desnutrición los organismos no se recuperan aun después de ser mantenidos bajo un régimen de alimentación óptimo. Por esta razón la alimentación en las primeras etapas de vida es de suma importancia para desarrollar organismos sanos y con un crecimiento deseable.

En los estudios de moluscos donde se utilizan microalgas planctónicas como aporte de alimento vivo compuesto por la mezcla de dos o más especies, se ha podido demostrar una mayor eficiencia en el crecimiento que en las dietas mono-específicas (Epifanio, 1979). El uso de cultivos mixtos también ha sido suministrado como alimento en otros organismos acuáticos, tales como camarón (D'Souza, 1999) y erizo (Jimmy *et al.*, 2002) y también se ha observado un mejor crecimiento y tasa de metamorfosis.

Los estudios relacionados con el valor nutrimental de las microalgas, han demostrado que los cultivos mono-específicos en muchas ocasiones no favorecen el crecimiento de los organismos alimentados con ellos. Se obtienen mejores resultados al utilizar cultivos mixtos debido a que con una mezcla de especies la composición proximal así como los perfiles de nutrientes se enriquece (Phatarpekar *et al.*, 2000; Carbajal, 2002).

Existen muy pocos antecedentes de cultivos mixtos de diatomeas bentónicas, Daume *et al.* (2000) experimentó con cultivos mixtos de tres diferentes diatomeas bentónicas (*Navicula* sp./ *Amphora* sp. y *Cocconeis* sp./ *Amphora* sp.) para el asentamiento de larvas de *Haliotis rubra*, donde se demuestra que hay un mayor asentamiento de larvas en las bio-películas de diatomeas compuestas por una mezcla con respecto a las mono-específicas. Sin embargo estos autores no evalúan nada con respecto a la ingestión de las especies de diatomeas utilizadas ni el efecto en el crecimiento de las postlarvas.

Searcy *et al.* (1992), mencionan que la diatomea *Navicula incerta* ha dado buenos resultados para la alimentación de las postlarvas de abulón rojo, Correa (2001) señala que además de *Navicula incerta*, las cepas de *Amphipora paludosa* var. *hyalina* y *Nitzschia thermalis* var. *minor* tienen un interés potencial para su utilización en las granjas de producción de abulón, ya que su grado de adhesión, la tasa de crecimiento y las características nutrimentales son buenas (o excelentes) para alimentar las postlarvas de abulón.

Existen trabajos donde se ha estudiado la digestibilidad aparente de los juveniles de abulón azul (*H. fulgens*). Montaña, (2002) se refiere a la digestibilidad aparente considerando las cenizas insolubles en ácido y menciona que uno de los problemas es la cantidad de muestra necesaria para obtener buenos resultados. Las cenizas insolubles en ácido cuantifican de manera específica a aquellos minerales que no son absorbidos por el organismo. Esta técnica es gravimétrica por lo que requiere de la medición de una cierta cantidad de muestra. Otro marcador interno que ha sido documentado (Church, 1985) es la clorofila, pigmento característico de la materia vegetal su medición es muy sensible y las técnicas fluorométricas requieren de muy poca cantidad de muestra (Arar y Collins, 1997).

Kawamura *et al.* (1995) evaluaron la digestibilidad aparente de las postlarvas de *H. discos hannai* y observaron células rotas y completas en las heces. De la misma forma Takami *et al.* (1997) refieren la digestibilidad de

postlarvas de *H. iris* midiendo las diatomeas rotas y no rotas presentes en las heces y suponen que las diatomeas rotas significan el número de células aprovechadas o digeridas. Hasta el momento, no se tiene registro de ningún trabajo donde se utilice la clorofila/feofitina como marcador interno para poder conocer la digestibilidad aparente de postlarvas de abulón.

El objetivo del presente trabajo fue utilizar las tres cepas de diatomeas reportadas por Correa (2001) (*Navicula incerta*, *Nitzschia thermalis* var. *minor* y *Amphipora paludosa* var. *hyalina*) que fueron definidas como un alimento potencial para el cultivo de abulón ya sea como cultivos mono-específicos o la mezcla de estas tres especies. Con esta investigación se trató de evaluar alguna probable diferencia significativa en el crecimiento de las postlarvas de abulón por el efecto del alimento.

2.- HIPÓTESIS

La calidad y tipo de diatomeas suministradas como alimento para las postlarvas de abulón azul (*Haliotis fulgens*), es determinante para el crecimiento y el metabolismo.

3.- OBJETIVOS

3.1.-Objetivo general

Evaluar el crecimiento y el metabolismo del abulón azul (*Haliotis fulgens*) al suministrar como alimento tres dietas mono-específicas y una mezcla de ellas.

3.1.1.- Objetivos particulares

1. Realizar cultivos mono-específicos de tres diatomeas bentónicas (*Navicula incerta*, *Amphipora paludosa* var. *hyalina* y *Nitzschia thermalis* var. *minor*) consideradas potencialmente útiles como alimento de las postlarvas de abulón.
2. Realizar un cultivo poli-específico mediante la mezcla en proporciones iguales de cada uno de los cultivos mono-específicos de las cepas antes mencionadas.

3. Determinar el crecimiento de las postlarvas de abulón alimentadas con las cuatro diferentes dietas utilizadas.
4. Con base en el contenido proximal y los resultados de crecimiento, determinar cual de las dietas presenta un mejor rendimiento.
5. Determinar la tasa de ingestión de las postlarvas de abulón azul mediante un sistema de evaluación de pastoreo.
6. Utilizar la concentración de la clorofila/feofitina como un indicador interno para medir digestibilidad aparente en las postlarvas de abulón azul.
7. Determinar el balance energético de cada una de las dietas ensayadas a través del cálculo de energía consumida, energía de crecimiento, respiración y pérdida de energía en heces en postlarvas de abulón azul.

4.- METODOLOGÍA

4.1.- Selección de cepas

Para el presente trabajo se seleccionaron tres especies de diatomeas bentónicas aisladas de diferentes puntos en la península de Baja California (Ejido Eréndira, Isla de Cedros y Puerto Nuevo) por Correa, et al., (2001). Las diatomeas bentónicas seleccionadas fueron: *Navicula incerta*, *Amphipora paludosa* var. *hyalina* y *Nitzschia thermalis* var. *minor*. Estas diatomeas bentónicas presentan un gran potencial para el cultivo de abulón debido a su alta tasa de crecimiento, su composición proximal y su grado de adhesión, además de que en un trabajo previo presentaron un alto nivel de crecimiento y sobrevivencia en postlarvas de abulón rojo (*H. rufescens*) (Correa, 2001).

4.2.- Mantenimiento de cepas

Las tres cepas de diatomeas bentónicas se cultivaron por triplicado de forma mono-específica en sistema estático en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 150 ml de medio de cultivo f/2 (Guillard y Rhyter, 1962) y una doble concentración de silicatos (Figura 1). El agua de mar utilizada para la preparación de estos medios de cultivo se obtuvo del sistema de suministro de agua de mar del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California, el cual cuenta con un filtro rápido de arena y un estanque sedimentador, los cuales retienen

partículas mayores a diez micras. Además de esta filtración inicial, el agua fue tratada en: un sistema de filtros de cartucho en un gradiente de 10, 5 y 1 micras para eliminar partículas suspendidas, e irradiada con luz UV a un flujo máximo de 45 l min^{-1} . Los medios de cultivo en los matraces fueron esterilizados en una autoclave (All American ® modelo 1941X) a 15 lb de presión y 125°C de temperatura durante 15 minutos. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ con condiciones de iluminación continua provista por lámparas fluorescentes de luz blanca fría (Osram; F40CW) de 1.2 m y de 40 w. La irradiancia a la que estuvieron expuestos los cultivos fue de $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, debido a que esta cantidad de luz es la que frecuentemente se utiliza en las granjas de producción de postlarvas de abulón para el mantenimiento y la producción de cultivos de diatomeas bentónicas (Hahn, 1989).

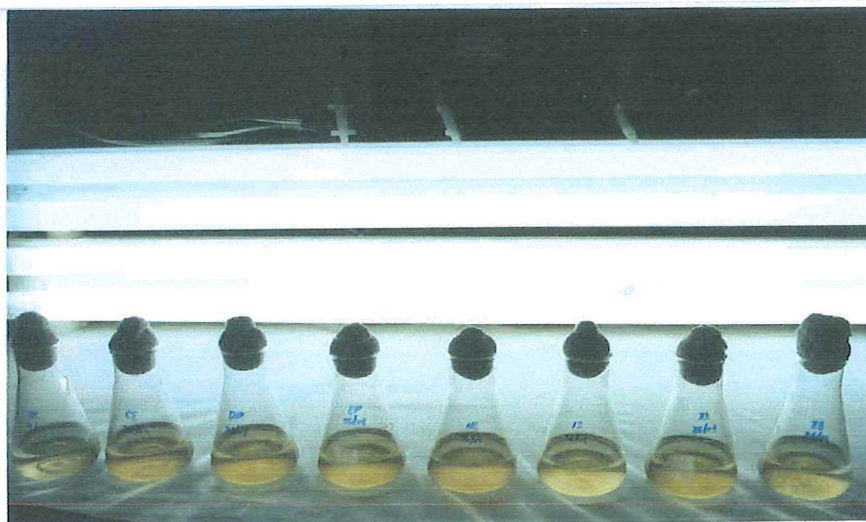


Figura 1.- Sistema de mantenimiento de cepas donde se muestran los matraces con las diferentes especies de diatomeas bentónicas utilizadas.

4.3.- Evaluación de la calidad nutricional de los cultivos de diatomeas bentónicas

4.3.1.- Descripción del sistema

Se utilizaron 12 recipientes circulares plásticos con capacidad de 18 litros (unidad experimental), los cuales contenían 12 l de agua de mar tratada de forma similar a la mencionada en la sección 4.2, con la diferencia de que además el agua fue desinfectada por vía química añadiendo hipoclorito de sodio comercial al 6% (3 ml l^{-1}) durante 24 horas y posteriormente neutralizando con tiosulfato de sodio (0.15 gr l^{-1}) y aireación vigorosa durante 24 horas, de acuerdo a la metodología descrita por Hemerick (1973). Los cultivos se mantuvieron en condiciones controladas de iluminación a $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, la cual fue suministrada con lámparas fluorescentes de luz fría (General Electric; F96T12.D.EX) de 75 w con una longitud de 2.4 m. La temperatura se mantuvo a $20 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ regulada con el sistema de aire acondicionado del laboratorio de bioensayos número 4 del IIO. Este sistema se utilizó para la producción de biomasa de diatomeas bentónicas necesaria para hacer el análisis proximal (Figura 2).

El inóculo de diatomeas en los recipientes se realizó por triplicado agregando 150 ml de cultivo a cada recipiente para los tratamientos mono-específicos y 50 ml de cada una de las tres especies de diatomeas para el tratamiento de la mezcla para tratar de mantener una biomasa similar de

cada una de las especies utilizadas. Estos volúmenes se obtuvieron de los cultivos realizados en matraz Erlenmeyer que fueron cultivados durante cinco días como se menciona en la sección 4.2.



Figura 2.- Sistema de cultivo de diatomeas bentónicas utilizado para la producción de biomasa para análisis proximales.

4.3.2.- Muestreo de diatomeas

Los muestreos de los cultivos de diatomeas bentónicas fueron por triplicado y se realizaron en tres diferentes ocasiones, a los cinco días de haber sido inoculados los recipientes de cultivo. La biomasa obtenida de cada una de las unidades experimentales fue cosechada y colocada de forma individual en tubos plásticos de centrifuga de 50 ml los cuales fueron previamente etiquetados. De cada uno de estos recipientes se tomó una sub-muestra de 10 ml, la cual fue fijada con lugol para poder realizar el conteo

posterior de la concentración celular de los cultivos. Los tubos de centrifuga de 50 ml con el volumen de la biomasa restante de la cosecha fueron congelados a -80°C en un crio-congelador marca Labconco modelo Ultima II y posteriormente ya congeladas fueron liofilizadas en un liofilizador marca VIRTIS Modelo 12 E L. Una vez seca, la muestra fue almacenada en una atmósfera de nitrógeno hasta el momento de hacer los análisis posteriores.

4.3.3.- Análisis de la composición proximal de las diatomeas

Los valores de la composición proximal y bioquímica de los diferentes tratamientos se expresaron en porcentaje, con base en el valor del peso seco de cada una de las dietas, para cada una se obtuvo el valor promedio y la desviación estándar de las repeticiones.

4.3.3.1.- Proteína cruda

Los análisis de proteína cruda se realizaron por triplicado siguiendo el método de Micro-Kjeldahl (aprobado por la AOAC, 1990) para esto, 50 mg de las muestras liofilizadas (sección 4.3.2) se agregaron a matraces Kjeldahl con tres ml de H_2SO_4 concentrado, el cual fue agregado junto con la mezcla crómica y perlas de vidrio a temperatura de ebullición donde el nitrógeno se convierte a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La mezcla fría se diluyó con agua destilada hasta un volumen de 25 ml y posteriormente se neutralizó con NaOH, de este proceso resulta una forma de amonio ionizado. Finalmente las muestras se destilaron

y el contenido resultante de amonio se tituló con HCl 0.02 N. Con el valor del porcentaje de nitrógeno (%N) obtenido, se calculó el contenido de proteína cruda mediante la siguiente expresión:

$$\text{Proteína cruda (\%)} = \%N \times 6.25$$

4.3.3.2.- Lípidos

La extracción de los lípidos se hizo con mezcla de cloroformo-metanol-agua, siguiendo la metodología de Folch y Sloane (1957) y la cuantificación de lípidos totales por gravimetría.

4.3.3.3.- Extracto libre de nitrógeno

Este valor fue calculado por diferencia de la sumatoria del porcentaje de proteína, lípidos y cenizas, por lo que se obtuvo con la siguiente formula:

$$\text{ELN} = 100 - (\% \text{ proteína} + \% \text{ lípidos} + \% \text{ cenizas})$$

4.3.4.- Calorimetría

El contenido energético de las diatomeas bentónicas suministradas como alimento para las postlarvas de abulón azul de forma mono-específicas y como mezcla se determinó mediante combustión directa en un calorímetro

adiabático Parr 1281 (Parr Instrument Co., Moline, IL, USA). Cuando la muestra se calcinó el calor producido elevó la temperatura del agua que encierra el contenedor donde la muestra estuvo confinada, así la temperatura proporcionó al calorímetro la base para calcular el valor energético. Previo a realizar los análisis de las diatomeas se calibró el calorímetro, se utilizaron diez muestras de caseína (20 mg) para obtener un valor estándar.

4.3.5.- Peso seco y contenido de cenizas

La estimación del peso seco y contenido de cenizas se realizó enjuagando con agua destilada las muestras secas y liofilizadas, después se centrifugaron a 800 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Este proceso se realizó para todas las muestras en tres ocasiones para asegurar la eliminación de sales. Se pesó 0.1 g de muestra en navecillas de aluminio previamente pesadas. Las navecillas con la muestra se secaron en una estufa a 60 °C durante cuatro horas y se pesaron cada hora (tres horas más) hasta obtener peso seco constante. Posteriormente los filtros con la muestra seca se incineraron en una mufla a 450 ° C por 4 horas y se pesaron para calcular el peso de cenizas.

4.3.6.- Pigmentos

4.3.6.1.- Clorofila “a” en el cultivo

La clorofila "a" se evaluó con el método tricromático siguiendo la metodología de Parsons *et al.* (1984). Para la extracción de éstas, se utilizaron 10 ml de acetona al 90% y 0.05 g de muestra de cada una de las repeticiones de los cuatro tratamientos. Después de la extracción a 4 °C durante 24 horas mantenidas en oscuridad, las soluciones de acetona con la muestra se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. De estas soluciones se tomaron alícuotas y se vaciaron en celdas para espectrofotómetro. Para conocer la concentración de clorofila se utilizaron las ecuaciones de la SCOR/UNESCO detalladas por Strickland y Parsons (1965).

4.4.- Evaluación del crecimiento de postlarvas de abulón (*Haliotis ssp.*)

4.4.1.- Bioensayo de crecimiento de las postlarvas de abulón

Se utilizaron postlarvas de abulón azul (*Haliotis fulgens*), donadas por la empresa B. C. Abalone S. de R. L. de C. V. Las postlarvas fueron transportadas en bolsas de plástico, la cuales se colocaron en una hielera con "Gel Ice" con el fin de mantener una temperatura del agua de aprox. 13 °C y así disminuir el estrés y el metabolismo de los organismos durante su transporte. Al llegar al laboratorio de bioensayos número 4 del IIO, las postlarvas se distribuyeron aleatoriamente en cada una de las repeticiones y tratamientos experimentales (12 recipientes, tres de cada tratamiento). A cada unidad experimental (recipientes de 18 litros descritos en la sección 4.3.1) se agregaron 2000 organismos. Cada unidad experimental

previamente, (cinco días antes), fue inoculada para formar una bio-película con las diferentes cepas de diatomeas bentónicas y la mezcla de estas, con las proporciones que se describen en la sección 4.3.1.

Con el fin de mantener una bio-película adecuada de diatomeas bentónicas, cada semana, a cada recipiente se adicionaron 150 ml de inóculo de su respectiva cepa a cada recipiente para los tratamientos de cultivos mono-específicos y 50 ml de cada cepa para los tratamientos poli-específicos para así asegurar que las postlarvas mantuvieran una alimentación *ad libitum*.

Las postlarvas se mantuvieron a 20 ± 1 °C con una intensidad de luz de $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un periodo de luz de 10 horas y 14 horas para el periodo de oscuridad. La salinidad se mantuvo entre 35 ± 1 ppm y se hicieron recambios de agua de un 600 % diario con un sistema de flujo abierto (Figura 2).

4.4.1.1.- Muestreo de postlarvas de abulón

Cada cinco días durante 20 semanas, se recolectaron alrededor de 30 postlarvas de cada una de las unidades y tratamientos experimentales y con estas postlarvas se evaluó el crecimiento durante el bioensayo.

Con el fin de no dañar las postlarvas la recolecta se realizó con un pincel de cerdas suaves (de pelo de nutria). Los organismos se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad con agua de mar y lugol para preservarlos y medirlos posteriormente.

4.4.1.2.- Medición

La longitud de las postlarvas se midió en un microscopio estereoscópico marca ZEISS modelo Stemi 2000-C; las imágenes se captaron con una cámara electrónica para microscopio NATIONAL modelo NTSC y se procesaron con el software MOTIC IMAGE 2000 versión 1.3, para crear archivos con los datos y las imágenes que se procesaron.

4.4.1.3.- Mortalidad

Se recolectaron las conchas de las postlarvas muertas con un tamiz cada cinco días al realizar la limpieza de los recipientes. El conteo se realizó con un microscopio estereoscópico marca ZEISS modelo Stemi 2000-C.

4.5.- Tasa de ingestión

El estudio de la tasa de ingestión se realizó en cajas de cultivo de tejido de seis cámaras, las cuales fueron inoculadas con los diferentes tratamientos experimentales (diatomeas bentónicas) un día antes de realizar

las observaciones con el fin de tener una bio-película de diatomeas suficientes para la alimentación de las postlarvas por un periodo de tiempo de 2 horas.

Antes de agregar los organismos a cada una de las cámaras experimentales y con la ayuda del sistema de procesamiento de imágenes (sección 4.4.1.2) se contabilizó la cantidad inicial de células presentes en las bio-películas en cinco áreas de igual superficie que fueron seleccionadas al azar en cada una de las cámaras.

En cada unidad experimental se colocaron 5 postlarvas, las cuales previamente habían sido mantenidas en inanición durante un periodo de 24 horas previo a la medición con el objetivo de eliminar las heces del tracto digestivo. A las dos horas de haber agregado las postlarvas a las cámaras estas fueron removidas y colocadas en otras cámaras libres de bio-película (24 horas) con el fin de que liberaran las diatomeas que habían sido ingeridas en forma de heces.

A las 24 horas de haber dejado a las postlarvas en inanición se recolectaron las heces y se dividieron en dos sub-muestras. La primera muestra se utilizó para calcular la digestibilidad al medir la cantidad de clorofila "a" y feofitina presente en las heces siguiendo la metodología descrita en la sección 4.5.1. La segunda sub-muestra se utilizó para calcular

el peso orgánico y de cenizas de las heces, siguiendo la metodología descrita en la sección 4.3.5.

Este procedimiento se repitió tres veces (64, 69 y 79 días postasentamiento) con el fin de observar cambios en la tasa de ingestión con respecto al tiempo de vida de las postlarvas. Además de este análisis se obtuvo la energía consumida por los organismos ($\text{cal g}^{-1} \text{ día}^{-1}$) para ser utilizada en los cálculos del balance energético.

4.5.1.- Clorofila “a” y Feofitina en las heces

Estos pigmentos se evaluaron por el método fluorométrico siguiendo la metodología descrita por Arar y Collins (1997). Para la extracción se filtraron las muestras de heces obtenidas del ensayo de la tasa de ingestión y digestibilidad (sección 4.5). Estas muestras se filtraron con filtros Whatman de fibra de vidrio y se introdujeron en tubos para centrifuga con 10 ml de acetona al 90 %. La solución de acetona con los filtros se dejó reposar durante 24 horas a 4 °C y oscuridad para que se produjera la extracción de los pigmentos. Después de la extracción, los tubos se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. De cada solución se tomó una alícuota y se vació a las celdas para medir en el fluorómetro la absorbancia de las muestras sin acidificar. Después, a cada muestra se agregó HCl 0.1 N y se volvió a medir la concentración en el fluorómetro para obtener la absorbancia de las muestras acidificadas. Los valores de concentración de clorofila y feofitina se

calcularon siguiendo las ecuaciones descritas por Arar y Collins (1997). Las unidades obtenidas con este procedimiento se expresan en $\mu\text{g l}^{-1}$.

4.6.- Medición del consumo de oxígeno

De cada uno de los tratamientos experimentales se tomaron dos postlarvas y se introdujeron a cámaras respirométricas de acrílico de 2 ml de capacidad (Figura 3). Las postlarvas se colocaron en el fondo de las cámaras con la base perforada y sobre un magneto de agitación para promover la mezcla constante de la columna de agua durante el periodo de medición. El consumo de oxígeno fue registrado con dos sensores polarográficos de oxígeno de seis canales (Srathkelvin Instruments Ltd., Ireland) controlados por computadora. La duración de la medición fue de una hora. El consumo de oxígeno ($\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1}\text{h}^{-1}$) se calculó mediante las pendientes de las graficas obtenidas por la medición continua del oxígeno en las cámaras, y se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{VO}_2 = (\text{Cs} \times \text{m} \times 60) / (100\% \times \text{Wwt})$$

donde VO_2 es la tasa de consumo de oxígeno del organismo en cuestión ($\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1}\text{h}^{-1}$); Cs es el oxígeno presente en las cámaras antes de iniciar el bioensayo, m es la pendiente de la curva de consumo de oxígeno ($\%\text{O}_2\text{min}^{-1}$), Wwt es la suma del peso de los organismos que se introdujeron a las cámaras.

Este procedimiento se realizó por triplicado con abulones alimentados y en inanición por 24 horas de 114 (día 1), 115 (día 2) y 116 (día 3) días postasentamiento, con el fin de observar cambios en el consumo de oxígeno con respecto al tiempo de vida de las postlarvas y obtener el valor de la acción dinámica específica, además de obtener la energía gastada en el proceso de respiración ($\text{cal O}_2 \text{ hr}^{-1} \text{ g}^{-1}$) para el balance energético (sección 4.7).

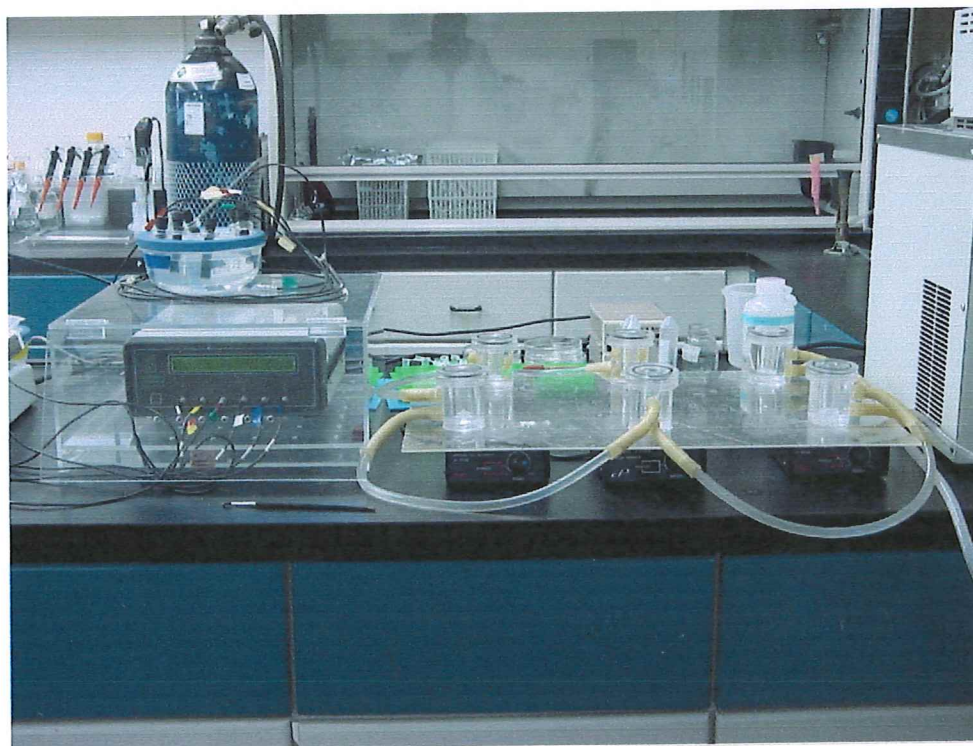


Figura 3.- Sistema utilizado para la medición del consumo de oxígeno de las postlarvas de abulón azul (*Haliotis fulgens*).

4.7.- Cálculo del Balance Energético

Este cálculo se llevó a cabo a través de la ecuación de balance energético la cual esta integrada por los siguientes componentes:

$$C = P+R+M+U+END$$

donde: C = Consumo, P = Producción, R = Respiración, M = moco, U = excreción y END = Energía no digestible.

Todos los componentes de la ecuación para calcular el balance energético se representaron en calorías por día por gramo ($\text{cal día}^{-1} \text{gr}^{-1}$) y en porcentaje con respecto a la energía ingerida. Cada una de las variables del balance se obtuvo por medio de las metodologías descritas anteriormente.

4.8.- Análisis estadístico

Para poder determinar las diferencias entre la concentración de las diferentes fracciones nutrimentales (proteínas, lípidos y ELN) de los cultivos mono-específicos y la mezcla de las diatomeas bentónicas se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Para determinar cual tratamiento presentaba diferencias se realizó un análisis *a posteriori* con una prueba de significancia de Tukey. Estas pruebas se realizaron mediante el paquete

estadístico STADISTICA versión 6.0 para Windows (StatSoft, Inc. 1998) con un $\alpha < 0.01$.

Las diferencias en el crecimiento de las postlarvas de abulón a lo largo del experimento y con las diferentes dietas de diatomeas bentónicas se realizó por medio de un análisis de regresión cuadrática (promedio mínimo cuadrático de longitud). Las significancias se hicieron a partir de un análisis de varianza transformado. El efecto de las dietas se evaluó mediante contrastes ortogonales a un nivel de significancia del 0.05 % utilizando el paquete estadístico SAS-GLM (SAS, 2001).

5.- RESULTADOS

5.1.- Concentración celular

Amphiprora paludosa var. *hyalina* (T1) fue la diatomea bentónica que tuvo la mayor concentración celular con $216458 \pm 31879 \text{ cel ml}^{-1}$, seguido por la mezcla de diatomeas bentónicas (T4) con una concentración promedio de $198188 \pm 22069 \text{ cel ml}^{-1}$. *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) tuvo una concentración promedio de $147292 \pm 10631 \text{ cel ml}^{-1}$. *Navicula incerta* (T2) resultó con la menor concentración celular con un promedio de $108906 \pm 13479 \text{ cel ml}^{-1}$ (Tabla I).

5.2.- Composición proximal y bioquímica de las diatomeas bentónicas

5.2.1.- Peso de las cenizas

Navicula incerta (T2) fue la diatomea bentónica que tuvo estadísticamente el valor mas bajo de contenido de cenizas ($F= 6.078$ y $P= 0.23$) con un porcentaje de $41.80 \pm 4.80 \%$, seguido por *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* (T1) con un porcentaje de ceniza de $53.31 \pm 6.37 \%$. Para el tratamiento de la mezcla de las tres especies de diatomeas bentónicas (T4) se observó un porcentaje de ceniza del $53.77 \pm 0.96 \%$. La diatomea bentónica que estadísticamente resultó con el mayor porcentaje de ceniza fue *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) con un valor promedio de $57.64 \pm 4.16 \%$ (Tabla II).

5.2.2.- Contenido de proteínas

Al evaluar el contenido de proteína no se encontraron diferencias significativas *Navicula incerta* (T2) tuvo $15.97 \pm 6.74 \%$, *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) con $16.23 \pm 3.56 \%$ y *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* (T1) con $16.46 \pm 0.55 \%$. El tratamiento de la mezcla de las tres especies de diatomeas bentónicas (T4) concentró mas proteínas sin presentar diferencias

significativas, con un promedio de 18.73 ± 2.73 % ($F = 0.29$ y $P = 0.82$) (Tabla II).

5.2.3.- Contenido de lípidos

En el contenido de lípidos no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ensayados ($F = 2.8$ y $P = 0.1$). Donde se obtuvo el menor porcentaje de lípidos fue con *Amphiprora paludosa* var. *minor* (T1) con 3.28 ± 0.98 %, seguido por *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) con 3.82 ± 1.27 % y *Navicula incerta* (T2) con 6.07 ± 2.57 %. El mayor porcentaje de lípidos, sin presentar diferencias significativas, se encontró en el tratamiento de la mezcla de las tres especies de diatomeas bentónicas (T4) siendo este de 6.29 ± 0.96 % (Tabla II).

5.2.4.- Extracto Libre de Nitrógeno (ELN)

La especie de diatomea bentónica con el valor más bajo de ELN fue *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) con 19.92 ± 0.61 % seguido por la mezcla de las tres especies con 21.21 ± 3.36 %. *Amphiprora paludosa* var. *minor* (T1) tenía 29.95 ± 5.79 %. El valor más alto fue el de *Navicula incerta* (T2) con un porcentaje de 36.16 ± 5.36 % (Tabla II).

5.2.5.- Calorías

Al evaluar el contenido energético de las diferentes especies de diatomeas bentónicas (dietas) no se encontraron diferencias significativas ($F=4.19$ y $P=0.064$) entre los tratamientos. Para *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) se obtuvo un promedio de $1668.75 \pm 0 \text{ cal gr}^{-1}$, el tratamiento de la mezcla (T4) un promedio de $1929.3 \pm 148.93 \text{ cal gr}^{-1}$. *Amphiprora paludosa* var. *minor* (T1) se midió un promedio de $2054.15 \pm 170.38 \text{ cal gr}^{-1}$ y para *Navicula incerta* (T2) se obtuvo $2608.06 \pm 444.36 \text{ cal gr}^{-1}$ (Tabla II).

Tabla I. Valores promedio de la concentración de células en los cultivos monoespecíficos de *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* (T1), *Navicula incerta* (T2) y *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) y cultivos poliespecíficos (T4).

	T1	T2	T3	T4
Concentración celular en el cultivo monoespecífico (cel/ml)	216458 ± 31879	108906 ± 13479	147292 ± 10631	
Concentración celular en el cultivo poliespecífico (cel/ml)	93688 ± 972	45938 ± 1679	46188 ± 2917	198188 ± 23069
Proporción en el cultivo poliespecífico (%)	47 ± 0.49	23 ± 0.85	23 ± 1.47	

T1= *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*, T2 = *Navicula incerta*, T3 = *Nitzschia thermalis* var. *minor* y T4 = Mezcla de cepas.

Tabla II.- Composición proximal en base seca de los cuatro tratamientos experimentales utilizados para alimentar a postlarvas de abulón azul (*Halotis fulgens*). Subíndices diferentes (a > b > c) indican diferencias estadísticas entre los tratamientos experimentales* $\alpha = 0.05$.

	T1	T2	T3	T4
Cenizas (%)	53.31 $\pm$ 6.37 ^{ab}	41.80 $\pm$ 4.80 ^b	57.64 $\pm$ 4.16 ^a	53.77 $\pm$ 0.96 ^{ab}
Proteínas (%)	16.46 $\pm$ 0.55 ^a	15.97 $\pm$ 6.74 ^a	16.23 $\pm$ 3.56 ^a	18.73 $\pm$ 2.73 ^a
Lípidos (%)	3.28 $\pm$ 0.98 ^a	6.07 $\pm$ 2.57 ^a	3.82 $\pm$ 1.27 ^a	6.29 $\pm$ 0.96 ^a
ELN ^{**} (%)	26.95 $\pm$ 5.79 ^{ab}	36.16 $\pm$ 5.36 ^a	19.92 $\pm$ 0.61 ^b	21.21 $\pm$ 3.36 ^b
Calorías ^{***} (cal g PS)	2054.15 $\pm$ 170.38 ^a	2608.06 $\pm$ 444.36 ^a	1668.75 $\pm$ 0 ^a	1929.3 $\pm$ 148.93 ^a

* T1= *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*, T2 = *Navicula incerta*, T3 = *Nitzschia thermalis* var. *minor* y T4 = Mezcla de cepas.

** ELN: Extracto libre de nitrógeno calculado por diferencia.

*** Las calorías están dadas en calorías por gramo de peso seco.

5.3.- Bioensayo de crecimiento de las postlarvas de abulón

Los resultados del bioensayo de crecimiento de las postlarvas de abulón durante los primeros 15 días del ensayo no evidenciaron diferencias en el crecimiento en ninguno de los cuatro tratamientos con los que fueron alimentadas. Después de los 15 días de ensayo, en las postlarvas alimentadas con *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) presentaron los valores más bajos de crecimiento con excepción del día 45 del bioensayo en el cual se obtuvo valores mas bajos con el tratamiento de la mezcla de las tres especies de diatomeas y *Navicula incerta*. A partir de los 15 días las postlarvas de abulón alimentadas con la cepa de *Navicula incerta* (T2) y el tratamiento de la mezcla de las tres especies de diatomeas bentónicas (T4) tuvieron el crecimiento más alto hasta el día 45. Desde el día 40 hasta el 80 del ensayo las postlarvas de abulón alimentadas con *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* (T1) presentaron el mayor crecimiento. Durante la última etapa del bioensayo (día 85 al 100) las postlarvas alimentadas con el tratamiento de la mezcla de las tres especies de diatomeas (T4) crecieron más seguido por las postlarvas alimentadas con *Navicula incerta* (T2) (Figura 4).

5.3.1.- Crecimiento

La longitud inicial de las postlarvas de abulón de 24 días post-asentamiento fue en promedio de $909.21 \pm 130.57 \mu\text{m}$. La longitud final de las postlarvas alimentadas con *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) fue en

promedio $4334.42 \pm 657.71 \mu\text{m}$. Aquellas alimentadas con *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* (T1) tuvieron una longitud final promedio de $4655.97 \pm 122.6 \mu\text{m}$ y las alimentadas con *Navicula incerta* (T2) una longitud promedio final de $5411.55 \pm 374.47 \mu\text{m}$. El tratamiento de las postlarvas alimentadas con la mezcla de las tres especies de diatomeas bentónicas (T4) tuvieron en promedio una longitud final de $5917.44 \pm 1049.92 \mu\text{m}$ (Tabla III).

Las postlarvas alimentadas con *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) estadísticamente ($F= 86.49$ y $P< 0.0001$) tuvieron la menor tasa de crecimiento diaria con un promedio de $31.14 \pm 5.98 \mu\text{m día}^{-1}$, seguida por la postlarvas alimentadas con *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* (T1) con un crecimiento promedio diario de $34.06 \pm 1.11 \mu\text{m día}^{-1}$. Para las postlarvas alimentadas con *Navicula incerta* (T2) crecieron $40.93 \pm 3.40 \mu\text{m día}^{-1}$. Las postlarvas alimentadas con el tratamiento de la mezcla de diatomeas bentónicas (T4) fueron las que estadísticamente tuvieron el mayor valor de crecimiento con un promedio $45.3 \pm 9.81 \mu\text{m día}^{-1}$ (Tabla III).

5.3.2.- Ganancia en peso

El peso húmedo inicial de las postlarvas fue en promedio de 0.558 mg por organismo. El peso final para las postlarvas alimentadas con *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) fue de $9.28 \pm 2.72 \text{ mg}$, siendo este el peso más bajo de los cuatro tratamientos. Las postlarvas alimentadas con *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* (T1) tuvieron en promedio un peso húmedo final de

25.97 $\pm$ 6.06 mg y las alimentadas con *Navicula incerta* (T2) un peso promedio húmedo final de 33.58 $\pm$ 8.78 mg. Las postlarvas con el peso húmedo final más alto fueron las alimentadas con el tratamiento de la mezcla de diatomeas bentónicas (T4) con un peso húmedo promedio de 35.26 $\pm$ 5.72 mg (Tabla III).

El valor estadísticamente menor en ganancia de peso ($F= 10.99$ y $P= 0.0033$) correspondió a las postlarvas alimentadas con *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) con un promedio de 0.145 $\pm$ 0.045 mg día⁻¹. Las postlarvas alimentadas con *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* (T1) aumentaron un promedio de 0.424 $\pm$ 0.101 mg día⁻¹, mientras que las alimentadas con *Navicula incerta* (T2) un promedio de 0.550 $\pm$ 0.146 mg día⁻¹. Las postlarvas alimentadas con la mezcla de diatomeas bentónicas (T4) presentaron un incremento en peso promedio de 0.578 $\pm$ 0.095 mg día⁻¹. Estos tres últimos tratamientos (T1, T2, T4) no tienen diferencias significativas entre ellos pero si son diferentes al tratamiento T3 (Tabla III).

5.3.3.- Eficiencia alimenticia

Al evaluar la eficiencia alimenticia no se encontraron diferencia significativas entre los tratamientos analizados ($F= 1.47$ y $P= 0.29$), el tratamiento que presentó el menor valor de eficiencia alimenticia fue el T2 (*Navicula incerta*) con un valor promedio de 0.19 $\pm$ 0.07 seguido por el tratamiento T1 (*Amphiprora paludosa* var. *hyalina*) con un valor promedio de

eficiencia alimenticia de 0.20 ± 0.04 . El tratamiento T3 (*Nitzschia thermalis* var. *minor*) presentó un valor promedio de eficiencia alimenticia de 0.32 ± 0.07 , mientras que el tratamiento T4 (mezcla de diatomeas bentónicas) presentó una eficiencia alimenticia de 0.40 ± 0.27 (Tabla III).

5.3.4.- Mortalidad

En este ensayo no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos ($F= 2.45$ y $P= 0.13$) el valor promedio para el tratamiento T4 (mezcla de diatomeas bentónicas) fue de 12.08 ± 2.91 %; para el tratamiento T2 (*Navicula incerta*) de 16.77 ± 3.11 % de mortalidad y el tratamiento T1 (*Amphiprora paludosa* var. *hyalina*) 18.27 ± 1.5 %, el tratamiento T3 (*Nitzschia thermalis* var. *minor*) una mortalidad de 28.22 ± 14.3 % (Tabla II).

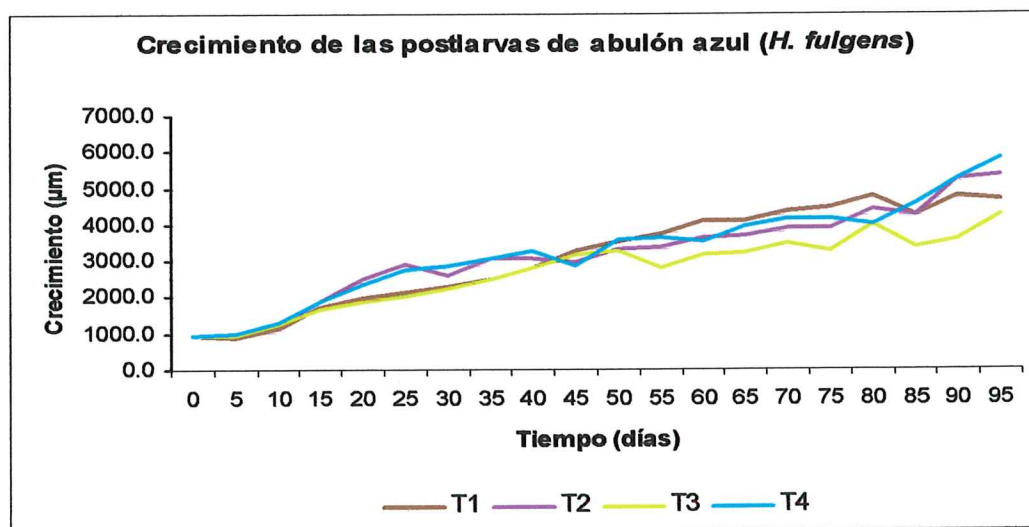


Figura 4.- Crecimiento promedio por día de las postlarvas de abulón azul (*Haliotis fulgens*) expuestas a cuatro tratamientos nutrimentales diferentes. T1 = *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*, T2 = *Navicula incerta*, T3 = *Nitzschia thermalis* var. *minor* y T4 = Mezcla de cepas.

Tabla III.- Crecimiento, utilización del alimento y mortalidad de las postlarvas de abulón azul (*Haliotis fulgens*) alimentadas con los cuatro tratamientos experimentales. Subíndices diferentes (a > b > c) indican diferencias estadísticas entre los tratamientos* $\alpha = 0.05$.

	T1	T2	T3	T4
Longitud inicial (μm)	909.21 $\pm$ 130.57	909.21 $\pm$ 130.57	909.21 $\pm$ 130.57	909.21 $\pm$ 130.57
Longitud final (μm)	4655.97 $\pm$ 122.6 ^b	5411.55 $\pm$ 374.47 ^{ab}	4334.42 $\pm$ 657.71 ^c	5917.44 $\pm$ 1049.92 ^a
Ganancia longitud ($\mu\text{m día}^{-1}$)	34.06 $\pm$ 1.11 ^b	40.93 $\pm$ 3.40 ^{ab}	31.14 $\pm$ 5.98 ^c	45.23 $\pm$ 9.81 ^a
Peso húmedo inicial (mg)	0.558	0.558	0.558	0.558
Peso húmedo final (mg)	25.97 $\pm$ 6.06 ^a	33.58 $\pm$ 8.78 ^a	9.28 $\pm$ 2.72 ^b	35.26 $\pm$ 5.72 ^a
Ganancia en peso húmedo** (mg día ⁻¹)	0.424 $\pm$ 0.101 ^a	0.550 $\pm$ 0.146 ^a	0.145 $\pm$ 0.045 ^b	0.578 $\pm$ 0.095 ^a
Ingestión*** (mg día ⁻¹)	2.1 $\pm$ 0.01 ^{ab}	3.02 $\pm$ 0.37 ^a	0.48 $\pm$ 0.18 ^c	1.77 $\pm$ 0.71 ^b
Eficiencia alimenticia	0.20 $\pm$ 0.04 ^a	0.19 $\pm$ 0.07 ^a	0.32 $\pm$ 0.07 ^a	0.40 $\pm$ 0.27 ^a
Mortalidad (%)	18.27 $\pm$ 1.50 ^a	16.77 $\pm$ 3.11 ^a	28.22 $\pm$ 14.30 ^a	12.08 $\pm$ 2.91 ^a

*T1= *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*, T2 = *Navicula incerta*, T3 = *Nitzschia thermalis* var. *minor* y T4 = Mezcla de cepas.

** La ganancia en peso húmedo está dada en mg de abulón diarios.

*** La ingestión está dada en mg de peso seco de las diatomeas por día.

5.4.- Digestibilidad aparente

5.4.1.- Concentración de pigmentos

5.4.1.1.- Concentración de clorofila “a” en el cultivo

Amphiprora paludosa var. *minor* (T1) tuvo el valor más bajo de clorofila “a” con 6.16 ± 2.85 mg g⁻¹ POS (peso orgánico seco), *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) tuvo una concentración de 8.42 ± 0.87 mg g⁻¹ POS, el tratamiento de la mezcla de diatomeas bentónicas (T4) 8.77 ± 1.66 mg g⁻¹ POS. La concentración más alta de clorofila correspondió a *Navicula incerta* (T2) con 8.83 ± 1.62 mg g⁻¹ POS (Tabla IV).

5.4.1.2.- Concentración de clorofila “a” en heces

Las postlarvas alimentadas con la mezcla de las tres especies de diatomeas bentónicas (T4) fueron las que tuvieron menor concentración de clorofila con 4.12 ± 1.41 mg g⁻¹ POS, seguido por las alimentadas con *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) con 5.21 ± 2.95 mg g⁻¹ POS y las postlarvas alimentadas con *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* (T1) con una concentración de clorofila “a” en heces de 7.47 ± 3.79 mg g⁻¹ POS; las postlarvas que presentaron el valor más alto de concentración de clorofila “a” en heces fueron las alimentadas con *Navicula incerta* (T2) con 18.99 ± 28.53 mg g⁻¹ PS (Tabla IV).

5.4.1.3.- Concentración de feofitina en las heces

Las postlarvas que tuvieron el menor valor de feofitina en las heces fueron las del tratamiento T1 alimentadas con la mezcla de diatomeas bentónicas con un promedio de $950.24 \pm 438.43 \text{ mg g}^{-1} \text{ POS}$ seguido por las postlarvas alimentadas con *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) con una concentración promedio de $1088.86 \pm 569.32 \text{ mg g}^{-1} \text{ POS}$. Las postlarvas alimentadas con *Amphiprora paludosa* var. *minor* (T1) tuvieron una concentración promedio de $1767.92 \pm 838.57 \text{ mg g}^{-1} \text{ POS}$. Las postlarvas que presentaron la mayor concentración de feofitina fueron las alimentadas con *Navicula incerta* (T2) con una concentración promedio de $2122.96 \pm 2798.75 \text{ mg g}^{-1} \text{ POS}$ (Tabla IV).

5.4.2.- Digestibilidad aparente en base a peso orgánico

El porcentaje de digestibilidad aparente para el tratamiento T2 (*Navicula incerta*) fue en promedio de $98.64 \pm 1.12 \%$. En los tratamientos T3 (*Nitzschia thermalis* var. *minor*) y T4 (mezcla de diatomeas bentónicas), se midió una digestibilidad promedio de $98.85 \pm 0.44 \%$ y $98.85 \pm 0.62 \%$. El tratamiento T1 (*Amphiprora paludosa* var. *minor*) tuvo un promedio de $99.65 \pm 0.01 \%$. En la digestibilidad aparente medida para todos los tratamientos no hubo diferencias significativas ($F= 1.16$ y $P= 0.38$) (Tabla IV).

5.4.3.- Digestibilidad aparente en base a peso seco total

El porcentaje de digestibilidad aparente significativamente menor de los cuatro tratamientos ($F= 5.74$ y $P= 0.026$) se produjo con *Nitzschia termales* var. *minor* (T3) con 41.86 ± 3.93 %. La mejor digestibilidad aparente sucedió con *Navicula incerta* (T2) que fue de $57.42 \pm 5.01\%$. En el tratamiento constituido por la mezcla de diatomeas bentónicas obtuvo una digestibilidad aparente de 45.73 ± 0.72 % y *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* un porcentaje de digestibilidad aparente de 46.53 ± 3.34 %. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos T3 y T2 (Tabla IV).

Tabla IV.- Concentración de pigmentos en cultivo y en heces utilizados como un marcador interno para la determinación de digestibilidad aparente en postlarvas de abulón azul (*Halotis fulgens*). Subíndices diferentes (a > b > c) indican diferencias estadísticas entre los tratamientos experimentales* $\alpha = 0.05$.

	T1	T2	T3	T4
Clorofila cultivo ($\mu\text{g g POS}$)	6.16 ± 2.85	8.83 ± 1.62	8.42 ± 0.87	8.77 ± 1.66
Clorofila heces ($\mu\text{g g POS}$)	7.47 ± 3.79	18.99 ± 28.53	5.21 ± 2.95	4.12 ± 1.41
Feofitina heces ($\mu\text{g g POS}$)	1767.92 ± 838.57	2122.96 ± 2798.75	1088.86 ± 569.32	950.24 ± 438.43
Digestibilidad (% POS)	99.65 ± 0.01^a	98.64 ± 1.12^a	98.85 ± 0.44^a	98.85 ± 0.62^a
Digestibilidad (% PS)	46.53 ± 6.34^{ab}	57.42 ± 5.01^a	41.86 ± 3.93^b	45.73 ± 0.72^{ab}

*T1= *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*, T2 = *Navicula incerta*, T3 = *Nitzschia thermalis* var. *minor* y T4 = Mezcla de cepas.

POS: porcentaje en base al peso orgánico seco. PS: porcentaje en base al peso total en seco.

5.5.- Medición de consumo de oxígeno

5.5.1.- Postlarvas alimentadas con diatomeas bentónicas

5.5.1.1.- Día 1

El menor valor de consumo de oxígeno se experimentó con *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) con un promedio de $109.37 \pm 1.70 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$ seguido por los organismos alimentados con *Navicula incerta* (T2) con un promedio de $146.63 \pm 20.40 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$. Los organismos alimentados con la mezcla de diatomeas bentónicas consumieron un promedio de $149.04 \pm 0 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$ y las alimentadas con *Amphiproara paludosa* var. *hyalina* (T1) tuvieron un promedio de consumo de $159.85 \pm 32.30 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$ siendo este el tratamiento con mayor consumo de oxígeno. Las diferencias numéricas obtenidas entre los tratamientos para este análisis no tuvieron diferencias significativas ($F= 1.93$ y $P= 0.3$) entre ninguno de los tratamientos (Tabla V).

5.5.1.2.- Día 2

Para el segundo día de medición se encontraron diferencias significativas ($F= 13.18$ y $P= 0.032$) y las postlarvas con menor consumo de oxígeno fueron las alimentadas con *Amphiproara paludosa* var. *hyalina* (T1) con un consumo promedio de $96.15 \pm 3.40 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$ y también las

alimentadas con *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) con un consumo promedio de $111.78 \pm 15.30 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$. El valor más alto de consumo de oxígeno lo presentaron las postlarvas alimentadas con la mezcla de diatomeas bentónicas (T4) con un promedio de consumo de $152.64 \pm 11.90 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$. El tratamiento T2 en este día de medición no pudo ser calculado por lo que no se muestra (Tabla V).

5.5.1.3.- Día 3

El valor significativamente más bajo ($F= 10.92$ y $P= 0.021$) para este día de medición fue para las postlarvas alimentadas con *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* (T1) con un promedio $155.05 \pm 22.10 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$ y las alimentadas con *Navicula incerta* (T2) con un consumo promedio de $158.65 \pm 3.40 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$. No se encontraron diferencias significativas en el consumo de oxígeno de las postlarvas alimentadas con *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) donde se obtuvo un consumo promedio de $183.89 \pm 1.70 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$. Las postlarvas con mayor consumo fueron las alimentadas con el tratamiento de la mezcla de diatomeas bentónicas con un promedio de $211.54 \pm 0 \text{ cal O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$ (Tabla V).

5.5.2.- Postlarvas sin alimentar (24 horas)

5.5.2.1.- Día 1

Las postlarvas alimentadas *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) tuvieron el valor significativamente menor ($F= 11.53$ y $P= 0.37$) de consumo de oxígeno con un promedio de $127.40 \pm 0 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$; las postlarvas alimentadas con *Amphiprora paludosa* var. *minor* (T1) consumieron $179.09 \pm 1.70 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$. Las alimentadas con la mezcla de diatomeas bentónicas (T4) tuvieron un consumo promedio de $133.41 \pm 8.50 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$ y las que se alimentaron con *Navicula incerta* (T2) un consumo de $146.63 \pm 13.60 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos T1, T2 y T4 (Tabla V).

5.5.2.2.- Día 2

El menor valor de consumo de oxígeno ($F= 17.56$ y $P= 0.02$) se experimentó con las postlarvas alimentadas con *Amphiprora paludosa* var. *minor* (T1) con un promedio de $102.16 \pm 1.70 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$. Los valores más altos se encontraron con las postlarvas alimentadas con la mezcla de diatomeas bentónicas con $156.25 \pm 10.20 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$ y *Navicula incerta* (T2) con $140.62 \pm 8.50 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$. No se encontró diferencias significativas para las postlarvas alimentadas con *Nitzschia thermalis* var.

minor (T3) con un consumo de oxígeno promedio de $125 \pm 0 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$ (Tabla V).

5.5.2.3.- Día 3

El valor más bajo de consumo de oxígeno se midió con las postlarvas alimentadas con *Navicula incerta* (T2) con un promedio de $141.83 \pm 10.20 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$, las postlarvas alimentadas con *Amphiprora paludosa* var. *minor* (T1) tuvieron un consumo de $159.85 \pm 32.30 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$ y las alimentadas con la mezcla de diatomeas bentónicas (T4) consumieron $185.09 \pm 0 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$. Las postlarvas alimentadas con *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) tuvieron un promedio de $213.94 \pm 0 \mu\text{l O}_2 \text{ día}^{-1} \text{ gr}^{-1}$. Para este día no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos ($F= 2.26$ y $P= 0.32$) (Tabla V).

Tabla V.- Consumo de oxígeno** por las postlarvas de abulón azul (*Haliotis fulgens*) alimentadas con los cuatro tratamientos experimentales. Subíndices diferentes (a > b > c) indican diferencias estadísticas entre los tratamientos* $\alpha = 0.05$.

	T1	T2	T3	T4
Día 1 (A) ($\mu\text{l O}_2/\text{h/g}$)	159.85 $\pm$ 32.30 ^a	146.63 $\pm$ 20.40 ^a	109.37 $\pm$ 1.70 ^a	149.04 $\pm$ 0 ^a
Día 2 (A) ($\mu\text{l O}_2/\text{h/g}$)	96.15 $\pm$ 3.40 ^b	0	111.78 $\pm$ 15.30 ^{ab}	152.64 $\pm$ 11.90 ^a
Día 3 (A) ($\mu\text{l O}_2/\text{h/g}$)	155.05 $\pm$ 22.10 ^b	158.65 $\pm$ 3.40 ^b	183.89 $\pm$ 1.70 ^{ab}	211.54 $\pm$ 0 ^a
Día 1 (I) ($\mu\text{l O}_2/\text{h/g}$)	179.09 $\pm$ 1.70 ^a	146.63 $\pm$ 13.60 ^{ab}	127.40 $\pm$ 0 ^b	133.41 $\pm$ 8.50 ^{ab}
Día 2 (I) ($\mu\text{l O}_2/\text{h/g}$)	102.16 $\pm$ 1.70 ^b	140.62 $\pm$ 8.50 ^a	125 $\pm$ 0 ^{ab}	156.25 $\pm$ 10.20 ^a
Día 3 (I) ($\mu\text{l O}_2/\text{h/g}$)	159.85 $\pm$ 32.30 ^a	141.83 $\pm$ 10.20 ^a	213.94 $\pm$ 0 ^a	185.09 $\pm$ 0 ^a

* T1= *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*, T2 = *Navicula incerta*, T3 = *Nitzschia thermalis* var. *minor* y T4 = Mezcla de cepas.

** Las mediciones se hicieron durante 6 días, los primeros 3 días se obtuvieron los valores de las postlarvas alimentadas (A) y los últimos tres días se obtuvieron los valores de las postlarvas bajo inanición (I).

Los valores que no se muestran en las casillas se omitieron por errores durante la medición.

Los valores que tienen 0 como desviación estándar son valores que se obtuvieron sin replicas.

5.6.- Evaluación de la tasa de ingestión

5.6.1.- Ingestión día 1

Las postlarvas alimentadas con *Navicula incerta* (T2) ingirieron un promedio de 26032 ± 2390 cel org⁻¹ hr⁻¹ y *Nitzchia thermalis* var. *minor* (T3) con 38583 ± 20321 cel org⁻¹ hr⁻¹ tuvieron significativamente el valor más bajo de ingestión ($F= 7.62$ y $P= 0.0098$). Las postlarvas alimentadas con la mezcla de diatomeas bentónicas (T4) ingirieron indistintamente 359566 ± 113917 cel org⁻¹ hr⁻¹. La mayor tasa de ingestión se obtuvo con las postlarvas alimentadas con *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* (T1) con 428830 ± 236766 cel org⁻¹ hr⁻¹ (Tabla V).

5.6.2.- Ingestión día 2

Las postlarvas con menor tasa de ingestión fueron las alimentadas con *Nitzchia thermalis* var. *minor* (T3) ($F= 72.59$ y $P< 0.0001$) con un promedio de 87219 ± 19037 cel org⁻¹ hr⁻¹ seguido por las alimentadas con *Navicula incerta* (T2) con 120456 ± 17637 cel org⁻¹ hr⁻¹ y la mezcla de diatomeas bentónicas (T4) con 255497 ± 10107 cel org⁻¹ hr⁻¹. La mayor tasa de ingestión fue para las postlarvas alimentadas con *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* (T1) con un promedio de 665209 ± 104321 cel org⁻¹ hr⁻¹ (Tabla VI).

5.6.3.- Ingestión día 3

Para la tercer medición la tendencia fue similar que el de la segunda medición, siendo las postlarvas con menor tasa de ingestión ($F= 55.39$ y $P< 0.0001$) las que fueron alimentadas con *Nitzchia thermalis* var. *minor* (T3) con un promedio de 105058 ± 39692 cel org⁻¹ hr⁻¹ seguido por las postlarvas alimentadas con *Navicula incerta* (T2) con una tasa de ingestión promedio de 291232 ± 36140 cel org⁻¹ hr⁻¹. Las postlarvas alimentadas con la mezcla de diatomeas bentónicas mostraron una tasa de ingestión promedio de 340972 ± 138137 cel org⁻¹ hr⁻¹. La mayor tasa de ingestión se encontró con las postlarvas alimentadas con *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* (T1) con un promedio de 876486 ± 42459 cel org⁻¹ hr⁻¹ (Tabla VI).

Tabla VI.- Ingestión de células por las postlarvas de abulón azul (*Haliotis fulgens*) alimentadas con los cuatro tratamientos. Subíndices diferentes (a > b > c) indican diferencias estadísticas entre los tratamientos experimentales* $\alpha = 0.05$.

	T1	T2	T3	T4
Día 1 (cel org hr)	428830 $\pm$ 236766 ^a	26032 $\pm$ 2390 ^b	38583 $\pm$ 20321 ^b	359566 $\pm$ 113917 ^{ab}
Día 2 (cel org hr)	665209 $\pm$ 104321 ^a	120456 $\pm$ 17637 ^{bc}	87219 $\pm$ 19037 ^c	255496 $\pm$ 10107 ^b
Día 3 (cel org hr)	876486 $\pm$ 42460 ^a	291232 $\pm$ 36140 ^{bc}	105057 $\pm$ 39692 ^c	340972 $\pm$ 138137 ^b

* T1= *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*, T2 = *Navicula incerta*, T3 = *Nitzschia thermalis* var. *minor* y T4 = Mezcla de cepas.

5.7.- Balance energético

La diatomea *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* (T1) presentó una inversión de energía del 1.13 % en el crecimiento de las postlarvas mientras que en la respiración invirtieron 7.43 % del presupuesto diario calculado. El 46.53 % corresponde a la digestibilidad aparente por lo que la energía no explicada (más producción de moco y excreción de amonio) fue de 37.97 %. El 53.47 % restante del presupuesto energético total (100 %) representa el porcentaje no digerido (Tabla VII).

Con *Navicula incerta* (T2) se obtuvo un porcentaje de 1.49 % de inversión en el crecimiento de las postlarvas que para respirar consumieron solo el 7.28 % del total del presupuesto disponible. En este tratamiento se evaluó un porcentaje de digestibilidad aparente de 57.42 %. La energía no explicada (mas producción de moco y excreción amonio) representó un porcentaje del 48.65 %. En este tratamiento se evaluó un porcentaje del 42.58 % de presupuesto energético no digerido (Tabla VII).

La diatomea *Nitzschia thermalis* var. *minor* (T3) presentó una inversión en el crecimiento de las postlarvas de 0.66 % del total del presupuesto disponible. En este tratamiento se encontró un consumo de energía por respiración de 14.21 % y 41.86 % fue el valor obtenido de digestibilidad aparente. La energía no explicada (mas producción de moco y excreción de

amonio) fue de 26.99 %. Este tratamiento presenta un porcentaje de 58.14 % de presupuesto energético no digerido (Tabla VII).

Con la mezcla de diatomeas bentónicas se obtuvo una inversión en el crecimiento de las postlarvas de 1.74 %. Se evaluó un consumo de energía por respiración de 9.06 %. Del presupuesto energético disponible con este tratamiento se obtuvo un 45.73 % de digestibilidad aparente. El porcentaje de energía no explicada (mas producción de moco y excreción de amonio) fue de 34.94 % por lo que el porcentaje que representa la parte no digestible es de 54.27 % del total del presupuesto disponible (Tabla VII).

Tabla VII.- Cálculo del balance energético (CBE) de las postlarvas de abulón azul (*Haliotis fulgens*) alimentadas bajo los cuatro tratamientos experimentales.

	T1		T2		T3		T4	
	CBE	%	CBE	%	CBE	%	CBE	%
Consumo (cal día ⁻¹ g ⁻¹)	187.8	100	184.2	100	110.4	100	166.5	100
Cambio de peso (cal día ⁻¹ g ⁻¹)	2.12	1.13	2.75	1.49	0.73	0.66	2.89	1.74
Respiración (cal O ₂ día ⁻¹ g ⁻¹)	13.96	7.43	13.41	7.28	15.69	14.21	15.08	9.06
Digestibilidad		46.53		57.42		41.86		45.73
Energía no explicada **		37.97		48.65		26.99		34.94
Heces		53.47		42.58		58.14		54.27

* T1= *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*, T2 = *Navicula incerta*, T3 = *Nitzschia thermalis* var. *minor* y T4 = Mezcla de cepas.

** La energía no explicada engloba excreción de moco y amonio, valores que no fueron medidos.

6.- DISCUSIONES

El valor promedio de proteínas y lípidos de las tres especies de diatomeas bentónicas estudiadas, se encuentran dentro del intervalo de valores referidos por Brown (1997), para distintas especies de diatomeas bentónicas y planctónicas, sin embargo, este autor solo trabajó con dos de los géneros que se utilizaron en este trabajo. Además los intervalos de valores proporcionales que maneja son muy amplios (proteínas= 6-34 % y lípidos= 7-23 %). Carbajal (2002) y Simental (1999) en sus trabajos obtienen porcentajes de proteínas y lípidos mayores que los cultivos mono-específicos de este trabajo (proteínas= 25-30% y lípidos= 10-40%). En el cultivo poli-específico se obtuvieron valores porcentuales similares de proteínas y lípidos a los señalados por Carbajal (2002) que únicamente mezcló las cepas de *Navicula incerta* y *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* (proteínas=19.91% y lípidos= 9.35). Correa (2001) indica que no existieron diferencias significativas entre los porcentajes tanto de proteínas como de lípidos. En este trabajo tampoco se encontraron diferencias significativas en proteínas y lípidos entre ninguno de los tratamientos ensayados, pero se encontraron valores ligeramente menores a los que obtuvo Correa (2001). Las diferencias en los porcentajes de proteínas y lípidos obtenidos en este trabajo y los que obtuvieron Brown (1997), Carbajal (1999) y Correa (2001), pueden deberse a que ellos utilizan distintos métodos indirectos de análisis en sus experimentos, en contraposición aquí solo se utilizaron metodologías recomendadas por la AOAC (1990). Los valores del contenido de proteína

cruda se detectaron con base a la estimación de nitrógeno, mientras que los métodos indirectos utilizan la albúmina como equivalente. Además de esto los medios de cultivos que utilizan algunos de estos autores (Correa, 2001) son medios "f" por lo que tienen disponible mayor concentración de nutrientes pudiendo así proporcionar mejores condiciones para los cultivos. Al proporcionar mayor concentración de nutrientes en los medios de cultivo hacen que exista menor competencia entre las diatomeas, por lo que podría generar un mejor crecimiento y hasta un aumento en las proporciones del contenido proximal.

Los valores promedio de porcentaje de cenizas obtenidos por Carbajal (2002) y Simental (1999) son similares a los de este trabajo con excepción de la diatomea *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*, de la cual Carbajal (2002) logra un porcentaje de 36.25 % siendo este un valor menor al obtenido en este trabajo (53 %). Con el cultivo poli-específico se obtuvieron valores mayores a los reportados por Carbajal (2002), esto probablemente relacionado al mayor porcentaje de cenizas obtenido para la cepa de *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* y a que en este trabajo se utilizaron tres especies de diatomeas en lugar de dos que utiliza Carbajal (2002). El contenido de cenizas en las diatomeas en su mayoría son los constituyentes minerales de la pared celular. Este valor si bien podría ser constante presentó una mayor concentración en este trabajo, lo cual puede deberse a la baja proporción obtenida en el contenido de lípidos y proteínas.

La ingestión del alimento es una medición de suma importancia para cualquier estudio de alimentación (Viana *et al.*, 1993 y Houlihan *et al.*, 2001) porque con este parámetro se puede evaluar la cantidad de cada uno de los nutrientes ingeridos. También se puede establecer la distribución óptima de los nutrientes en términos de energía y su utilización para un óptimo crecimiento, ya sea como balance energético, eficiencia alimenticia y en general a todos los índices que lleven a analizar el desempeño de los organismos como respuesta a las dietas ofrecidas.

En este trabajo se encontraron tasas de ingestión con diferencias significativas entre los tratamientos, esto reafirma la alta selectividad alimenticia de los abulones destacadas por Shepherd y Steinberg (1992). En este trabajo se encontró que a pesar de que las postlarvas tienen una alta tasa de ingestión de algunas especies de diatomeas, estas no garantizan un crecimiento mayor. Esto se debe a que la cepa preferida no contiene los nutrientes necesarios para su mejor desarrollo en desmedro de la energía que tienen que gastar en la digestión. Este último punto se comprueba comparando el gasto energético utilizado en la respiración el cual es un indicador de la energía utilizada en los procesos metabólicos.

En los valores de la ingestión de las postlarvas de las tres mediciones que se hicieron en este trabajo hubo un aumento en la tasa de ingestión conforme aumentaba el tiempo postasentamiento (de 26032 a 876486 cel $\text{org}^{-1} \text{ hr}^{-1}$) y por consecuencia el tamaño de las postlarvas. Esto es un

desarrollo normal ya que en la medida que aumenta el tamaño de los organismos también aumenta la cantidad de nutrientes necesarios para sobrevivir. Por los resultados que se obtuvieron en la curva de crecimiento también se puede decir que los requerimientos nutricionales cambian a lo largo del desarrollo de los organismos, por lo que es necesario evaluar la posibilidad de suministrar dietas diferentes a lo largo del cultivo de los abulones.

Por otro lado, de las diatomeas ingeridas, el valor de la digestibilidad aparente es importante para evaluar el potencial que tiene el alimento como nutriente (Montaño, 2003). Este parámetro indica la cantidad de energía ingerida a través del alimento disponible para el organismo (Maguire, 1993). Sin embargo, los estudios de digestibilidad aparente en organismos acuáticos tienen como desventaja la recolección de heces, ya que implica perder partículas de alimento pudiendo sobre o subestimar (respectivamente) los valores de digestibilidad. Además también es posible que la muestra se contamine con partículas de alimento que afectan los resultados.

En el presente trabajo se obtuvo una digestibilidad aparente del 42 al 57 % lo cual está dentro del intervalo obtenido por Gómez *et al.* (2003) para el abulón juvenil alimentado con dietas balanceadas. Lo anterior indica que los valores detectados en juveniles tempranos (postlarvas) y juveniles alimentados con dietas totalmente distintas deberán ser similares. Sin embargo, el hecho de que se encontraron digestibilidades aparentes

similares a las encontradas por Gómez *et al.* (2003) implica que al igual que los juveniles alimentados con una dieta balanceada, los juveniles tempranos (postlarvas) tienen una digestibilidad aparente similar cuando ingieren diatomeas. Kawamura *et al.* (1995) y Takami *et al.* (1997) encontraron para postlarvas de abulón *H. discus hannai* y *H. iris* digestibilidades mayores al 90% a partir del conteo de células muertas y vivas que se encuentran en las heces. En estos trabajos consideran que las células rotas son aprovechadas totalmente. Sin embargo este indicador de digestibilidad es irreal considerando que no todos los nutrientes contenidos en una dieta son digeribles y que el único impedimento para digerirlos sea la presencia de la pared celular.

Las diatomeas bentónicas se caracterizan por tener una frústula la cual es una cubierta inorgánica a base de sílice que no puede ser degradada que constituye entre el 30 y 50% del peso de las células (Carbajal, 2002; Correa, 2001; Simental, 1999). La relación que hay entre la digestibilidad aparente incluyendo o no la frústula se pudo observar con los porcentajes de digestibilidad obtenidos para este trabajo ya que si se trabaja con el peso seco total, los porcentajes entran dentro de los valores mencionados por Gómez *et al.* (2003), pero si se trabaja con el peso orgánico seco se obtienen valores de digestibilidad hasta del 99 %, cifra que se acerca a lo indicado por Kawamura *et al.* (1995) y Takami *et al.* (1997).

La investigación de la clorofila "a" y su producto de degradación que es la feofitina, sumados como marcador interno de la digestibilidad resultó ser útil conforme a los resultados observados en el presente trabajo. Particularmente interesante es que la cuantificación puede llevarse a cabo mediante técnicas sensibles sin tener que recolectar una gran cantidad de heces.

Al evaluar el crecimiento diario de las postlarvas de abulón se obtuvieron valores más bajos que los de Carbajal (2002) para las postlarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) que fueron desde 52 a 89 $\mu\text{m día}^{-1}$, además obtiene el valor más alto de crecimiento diario en los abulones alimentados con la cepa de *Navicula incerta*. Los organismos que utilizó Carbajal (2002) eran organismos de 94 días postasentamiento mientras que las que se utilizaron en este trabajo tenían solo 24 días postasentamiento, esta diferencia puede ser una de las razones por la cual Carbajal (2002) encontró un mayor crecimiento. En el trabajo de Carbajal (2002) los abulones que fueron alimentados con la mezcla de *Navicula incerta* y *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* tuvieron casi el mismo crecimiento cuando fueron alimentados con *Amphiprora paludosa* var. *Hyalina*. La razón por la cual Carbajal (2002) encuentra valores similares con estos dos tratamientos lo atribuye a que en el tratamiento de la mezcla se produjo la inhibición de crecimiento de la cepa de *Navicula incerta*, por lo que las postlarvas se alimentaban prácticamente, solo de la cepa de *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*. En este trabajo todo indica que no existe una inhibición de

crecimiento de ninguna de las especies de diatomeas en el tratamiento de mezcla aunque para poder demostrarlo seria necesario hacer otros análisis. El valor que se obtuvo para la cepa de *Navicula incerta* fue alto ($40.93 \mu\text{m día}^{-1}$) en comparación con la de los demás tratamientos, a pesar de esto el tratamiento de la mezcla de cepas produjo el mayor incremento de longitud en las postlarvas de abulón ($45.23 \mu\text{m día}^{-1}$) de los cuatro tratamientos.

Existen otros trabajos en los que se reporta un crecimiento diario menor o similar a los valores encontrados en este trabajo. Kawamura *et al.* (1995) probaron nueve cepas de diatomeas bentónicas diferentes, para alimentar postlarvas de *Haliotis discus hannai* y encontraron crecimientos desde 13 hasta $50 \mu\text{m día}^{-1}$. Montaña (2003) obtuvo para juveniles de abulón un incremento en longitud de $37 \mu\text{m día}^{-1}$ alimentando abulones *H. corrugata* con alimento balanceado. Kawamura *et al.* (1998) probaron ocho diferentes cepas de diatomeas bentónicas para alimentar las postlarvas de abulón *Haliotis iris* de 15 a 36 días después del asentamiento, que resultaron en tasas de crecimiento de 11 a $35 \mu\text{m día}^{-1}$ y el mejor alimento fué una cepa del genero *Nitzchia sp.* Las postlarvas alimentadas con la especie de *Nitzchia thermalis* var. *minor* fueron las que menos favorecieron el crecimiento de las postlarvas. Esto demuestra como los requerimientos nutricionales varían entre especies de abulón y también como cambia la calidad nutritiva de las diatomeas bentónicas dependiendo de la especie que se tenga sin importar que sea del mismo género. Es importante señalar que las condiciones de cultivo de las diatomeas podrían resultar con distinta calidad bioquímica

(Brown *et al.*, 1998). Aunque en este trabajo no se encontraron diferencias significativas en el contenido bioquímico de las diatomeas sería necesario hacer análisis de componentes más finos como aminoácidos y ácidos grasos para ver si existe alguna diferencia entre las dietas suministradas ya que estos pueden variar propiciando el mejor crecimiento en las postlarvas.

Gómez (2002) al alimentar juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) con alimento balanceado bajo diferentes razones de proteína/energía (de 26 a 44% de proteína) encontró valores de crecimiento de 61 a 123 $\mu\text{m día}^{-1}$. En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en las proporciones de proteínas/energía, sin embargo existieron diferencias en el crecimiento de las postlarvas que aunque no hubo tasas de crecimiento tan altas como las reportadas por Gómez (2002), si se puede decir que hay otros factores que pueden influenciar en el crecimiento de los organismos, como la digestibilidad de los alimentos. Las diferencias del crecimiento en longitud obtenida al suministrar como alimento los distintos tratamientos de diatomeas bentónicas de forma monoespecíficas y como mezcla también se reflejan en el aumento del peso aunque las diferencias significativas no son exactamente iguales muestran las mismas tendencias. El mayor aumento en peso se produjo con el tratamiento T4 (mezcla de diatomeas bentónicas) y el significativamente menor en el tratamiento T3 (*Nitzschia thermalis* var. *minor*). El efecto de las diferencias significativas entre el crecimiento en longitud y cambio de peso se debe probablemente a las variaciones encontradas dentro

de las repeticiones de los tratamientos ya que las tendencias fueron similares.

Con respecto a la eficiencia alimenticia se registraron valores bajos comparados con los de López y Viana (1995) quienes indican una eficiencia de 1:1.6 para los abulones juveniles de *H. fulgens* mientras que en este trabajo la eficiencia fue de 1:0.19 hasta 1:0.40. Esta baja eficiencia alimenticia muy probablemente se debe a que la tasa de ingestión fue sobreestimada. En el presente trabajo se registró la ingestión a partir del conteo de bio-películas de microalgas mientras que otros trabajos se basan en el análisis gravimétrico del consumo de alimentos balanceados. La dificultad que implica el medir la ingestión en organismos acuáticos se debe considerar para dar validez a la información obtenida.

Hay otra razón para considerar que la ingestión fue sobreestimada en este trabajo y es el hecho que dentro del balance energético, considerando que la ingestión es del 100%, la energía reflejada en el crecimiento fue baja, encontrando un máximo de 1.7% siendo este un valor bajo. Con una sobreestimación, aumenta el valor de energía total y por ende la no explicada la cual resultó de 26 a 48 %, mientras que Gómez (2003) encuentra porcentajes de energía no explicada de 6 a 28 %. Dentro de un balance energético, la energía no explicada corresponde a la energía no contabilizada ya que cuando se consideran todos los parámetros debería tender a cero. En el presente trabajo la producción de amonio y moco no fueron estimadas,

cantidad que por lo general corresponde a valores menores al 10% de la energía ingerida.

Uno de los problemas que se presentó al evaluar el consumo de oxígeno fue la medición del consumo en las postlarvas mantenidas en inanición. En los experimentos se esperaba encontrar una disminución en el consumo, ya que se iba a reducir su tasa metabólica y por lo tanto disminuiría el consumo de oxígeno. En este trabajo se obtuvieron valores más altos de consumo de oxígeno en los organismos mantenidos en inanición por lo que no se pudo evaluar la acción dinámica específica necesaria para completar de una manera más adecuada el balance energético. Este aumento en el consumo de oxígeno probablemente sucedió por que los organismos solo estuvieron 24 horas en inanición mientras que en otros trabajos (Montaño, 2003) se mantiene a los juveniles alrededor de 96 horas antes del ensayo. El poco tiempo que se dejaron sin alimentación originó que las postlarvas aumentaran su actividad para buscar alimento y por lo tanto consumieron más oxígeno. Por lo general en otros trabajos los juveniles se dejan tres días sin alimento pero se consideró que tratándose de postlarvas, tres días sería demasiado tiempo. Sin embargo, al parecer las postlarvas también requieren más tiempo para poder observar esta valoración y así determinar el consumo de oxígeno por metabolismo basal.

En el balance energético se puede observar que el porcentaje de consumo de oxígeno mayor corresponde a los organismos alimentados con

la diatomea bentónica que tiene el valor más alto de contenido de cenizas (tratamiento T3) y por ende el de menor digestibilidad. Esta relación demuestra que digerir las diatomeas con la frústula más gruesa ocasiona un mayor consumo de oxígeno y un mayor gasto de energía, lo que se refleja en un menor crecimiento.

7.- CONCLUSIONES

1. Es posible realizar cultivos mixtos de diatomeas bentónicas sin generar una aparente inhibición de crecimiento entre ellas.
2. En los organismos acuáticos la digestibilidad aparente puede ser calculada a partir de la relación clorofila/feofitina.
3. La digestibilidad aparente se puede estudiar a partir de la relación clorofila/feofitina sin recolectar una gran cantidad de heces porque el método de cuantificación es muy sensible.
4. Existe una relación directa entre la digestibilidad aparente, el grosor de la frústula de las diatomeas y el gasto de energía que se refleja en la energía dirigida a crecimiento de las postlarvas de abulón azul.
5. La mezcla de las diatomeas bentónicas *Navicula incerta*, *Amphipora paludosa* var. *hyalina* y *Nitzschia thermalis* var. *minor* proporcionó el mejor crecimiento a las postlarvas de abulón azul *Halotis fulgens*.

8.- RECOMENDACIONES

- Realizar más análisis para determinar si existe o no inhibición en el crecimiento de las diatomeas cultivadas de forma poliespecífica.
- Realizar una validación de la técnica de clorofila/feofitina para investigar la digestibilidad aparente.
- Conocer los valores de gasto energético utilizados en la producción de moco y producción amonio para obtener un balance energético mas completo.
- Para el cálculo del consumo de oxígeno a través del metabolismo basal es necesario dejar a las postlarvas de abulón en inanición por un periodo mayor a 24 horas.
- Es necesario tener un mayor cuidado en la medición de la tasa de ingestión ya que es muy fácil poder sobre o subestimarla.

9.- LITERATURA CITADA

- AOAC, (1990). Official Methods of Analysis, 15 th edn., vol. 1. Association of Official Analytical Chemists. Arlington. VA, USA.
- Arar, E. y Collinns, G., (1997). *In vitro* Determination of Chlorophyll a and Phaeophitin a in Marine and Freshwater Algae by Fluorescence. National Exposure Research Laboratory. U.S. Enviromental Protection Agency. Cincinnati, Ohaio. 22 pp
- Brown, M., Jeffrey W., Volkman J. y Dunstan G., (1997). Nutricional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*. 151: 315-331.
- Brown, M., McClausland M. y Kowalski K., (1998). The nutrional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Cassostrea gigas* spat. *Aquaculture*. 165: 281-293.
- Carbajal, M. (2002). Evaluación del crecimiento de postlarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*, Swaison 1822) utilizando como alimento dietas monoespecíficas y mixta de diatomeas bentónicas. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superiores de Ensenada. Ensenada, Baja California. 81 pp.
- Correa, J. (2001). Selección de especies de diatomeas bentónicas para el cultivo de abulón. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California. 132 pp.
- Cho, Y. (1987). La energía de la nutrición de los peces. En *Nutrición en acuacultura*. Espinoza de los Monteros y Labarta, U. (Eds.). Vol II, pp 197-238.
- Cuenca, E. y M. García, (1987). Ingesta y conducta alimentaría. En: Espinoza de los Monteros y Larbarta, U. (Eds.), *Nutrición en acuacultura I*. CAICIT, Madrid, pp. 1-65.
- Church, D., (1985). The ruminant animal. Digestive Physiologiy and Nutrition. Wevwland Press, Inc. 564 pp.
- Daume, S., A. Krsinich, S. Farell y J. Woelkerling (2000). Setteltment, early growth and survival of *Haliotis rubra* in response to diferent algal species. *Journal of Applied Phycology*. 12(3-5):479-488.
- De la Higuera, M., (1987). Effects of Nutritional Factors and Feed Characteristics on Feed Intake. En: Houlihan, D., T. Boujard, and M.

- Jobling, (Eds). Food intake in fish. Blackwell Science, London, pp. 250-268.
- Durazo, E., M. T. Viana, L. R. D'Abramo y J. Toro (2004). Effects of starvation and dietary lipid on the fatty acid composition of muscle tissue of juvenile abalone (*Haliotis fulgens*). *Aquaculture* 238: 329-341.
- D' Souza, F. y N. Loneragan (1999). Effects of monospecific and mixed-algae diets on survival, development and fatty acid composition of penaeid prawn (*penaeus* spp.) larvae. *Marine Biology*. 133:621:633.
- Ebert, E. E. y J. L. Houk (1989). Abalone cultivation methods used at California Department of Fish and Game's Marine Resources Laboratory. 239-254 pp. En: Hahn, K.O. 1989. (Ed.) Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods. CRC Press. Boca Raton, Florida. 348 pp.
- Epifanio, C., M. Logan y C. Turk, (1976). The culture of six species of bivalves in recirculating seawater system. En 10th European Symposium on Marine Biology. Persoone, G. y E. Jaspers (Eds.) Universa Press. Wettwrem, Belgica. 97-108 p.
- Epifanio, C. (1979). Growth in bivalve molluscs: nutritional effects of two or more species of algae in diets feed to the american oyster *Cassostrea virginica* (Gemelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L). *Aquaculture*. 18:1-12.
- Fidalgo, J., A. Cid, I. López-Muñoz, J. Avalde y C. Herrero, (1994). Growth and biochemical profile of juvenile mussels (*Mytilus galloprovinciales*) (Lmk.) feed on different algal diets. *Journal of Shellfish Reserch*. 13(1):65-75.
- Folch, J., Lee, M., Sloane-Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 22: 477-509.
- Frideman, C., G. Gardner, R. Hedrick, M. Stephenson, R. Cawthorn y S. Upton (1995). *Pseudoklossia Haliotis* sp. n. (Apicomplexa) from the kidney of California abalone, *Haliotis* spp. (Mollusca). *Journal of Invertebrate Patology*. 66:33-38.
- Gómez, L., (2002). Efecto de la razón proteína-energía sobre el crecimiento y metabolismo de juveniles en el abulón azul (*H. fulgens*). Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Ensenada, Baja California., México. 45 pp.

- Gómez, L., Z. Esquivel, L., D Abramo, A. Shimada, C., Vázquez, M. Viana (2003). Effect of dietary protein:energy ratio on intake, growth and metabolism of juvenile green abalone *Haliotis fulgens*. *Aquaculture*, 220:769-780.
- Guillard, R. y Rhyter, J., (1962). Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea*. (Cleve) Grand. *Can. J. Microbiol.* 8: Methods and Growth Measurement. Cambrindge University Press. New York. 255-273 pp.
- Houlihan, D., T. Boujard and Jobling 229-239.
- Guzmán del Prío, S. A. (1992). A review of the biology of abalone and its fishery in Mexico. En : Shephred, S. A., M. J. Tegner y S. A. Guzmán del Prío (Eds.). *Abalon of the World. Biology, Fisheries and Culture*, Fishing News Books. Cambridge. 341- 360 pp.
- Hahn, K. (1989). *Hand Book of Culture of Abalone and Others marine Gastropods*. CRC Press. Boca Raton. Florida. 348 pp.
- Hemerick, G., (1973). Mass culture. En Stein, J. R. (Ed.). *Handbook of Phycological Methods. Culture*, M., (2001). *Food intake in fish*. Blackwell. Science. 418 pp.
- Jimmy, R., M. Kelly y A. R. Beaumont (2002). The effect of diet type and quantity on the development of common sea urchin larvae *Echinus esculentus*. *Aquaculture*. Vol. 220:261-275.
- Kawamura, T., Saido, T., Takami H. and Yamashita Y., (1995). Dietary value of benthic diatoms for the growth of post-larval abalone *Haliotis hannai*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 194: 189-199.
- Kawamura, T. (1996). The role of benthic diatoms in the early life stages of the Japanese abalone (*Haliotis discus hannai*). En: Watanabe, Y. Y., Yamashita, y Y. Oozeki (Eds.). *Survivial Strategies in Early Life Stages of Marine Resource*. Balkema, Brookfield. 355-367 pp.
- Kawamura, T., R. Roberts y H. Takami (1997). A review of the feeding and growth of postlarval abalone. *J. Shellfish Res.* 17, 615-625.
- Laing, I. y C. Gil-Verdugo, (1991). Nutritional value of sry-dried *Tetraselmis suecica* for juveniles bivalves. *Aquaculture*. 92: 207-218.
- Leigthon, D. L. (2000). *The Biology and Culture of the Californias Abalones*. Dorrance Publishing. Pittsburgh, Pensylvania. 216 pp.

- López L. y M. Viana, (1995). Determinación de la calidad del alimento elaborado con ensilajes de pescado crudo y cocido, para abulones juveniles de *Haliotis fulgens*. Ciencias Marinas. 21 (3): 331-342.
- Lucas, A. (1996). Bioenergetics of Aquatic Animals. Tailor & Francis, London, 168 pp.
- Maguire, G., K. Wee and S. Hindrum, (1993). Didestibility studies-the "ins" and "outs" of abalone guts. Austasia Aquaculture. 7 (1): 42-45.
- McBride, S., (1998). Current status of abalone aquaculture in the Californias. Journal of Shellfish Research. 17(3):593-600.
- McShane, P., H. Gorfine y I. Knuckey (1994). Factors influencing food selection in the abalone *Haliotis rubra* (Mollusca: Gasteropod). J. Exp. Mar. Biol. and Ecol., 176: 27-37
- Montaño, J., A., Shimada, P., Vásquez y M., Viana, (2002). Methods of mesuring feed digestibility in the green abalone (*Haliotis fulgens*). Aquaculture, 213: 339-346.
- Montaño, J., (2003). Dos razones carbohidratos:lipidos a tres niveles de proteína para lograr crecimiento optimo en abulón *Haliotis corrugata* (Gray, 1828). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Ensenada, Baja California, México. 107 pp.
- Parsons, T. R., Y. Maita y T. A. Lalli (1984). A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press. Oxford. 173 pp.
- Phatarperkar, P., R. Sreepada, C. Pednekar y C. Achuthankutty (2000). A comparative study on growth performance and biochemical composition of mixed culture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* with monocultures. Aquaculture. 181:141-155.
- Rivero, L. E. y M. T. Viana (1996). Effect of pH, water stability and toughness of artificial diets on the palatability for juvenile abalone *Haliotis fulgens*. Aquaculture 144: 353-362.
- SAS Institute Inc., (2001) SAS/STAT 8.2. SAS Institute Inc. Cary North Carolina, USA.
- Searcy, R., A. Salas y A. Flores (1988). Crecimiento de postlarvas y juveniles de abulón azul (*Haliotis fulgens*) en un laboratorio mexicano. Ciencias Marinas 14(4):57-72, 1988.

- Searcy, R., R. Salas, R. Flores y P., Hinojosa (1992). Simultaneous comparison of methods for settlement and metamorphosis induction in the red abalone (*Haliotis rufescens*). *Aquaculture*. 105: 241-250.
- Secretaria de pesca (1994). Desarrollo científico y tecnológico del cultivo del abulón. Subsecretaria de Fomento y Desarrollo Pesquero. Dirección General de Acuicultura. Convenio SEPESCA-CIBNOR. 77 pp.
- Simental, J., (1999). Producción masiva de diatomeas bentónicas empleando fertilizantes agrícolas y su efecto en la calidad de la biomasa y en la composición proximal. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 115 pp.
- Simental, J. (2002). Enriquecimiento de laminas de *Macrocystis pyrifera* con películas de *Navicula incerta* y su utilización como alimento para abulón (*Haliotis spp.*). Avance de Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superiores de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 37pp.
- Shepherd, S. and Steinberg, P., (1992). Food preferences of three Australian Abalone species with a review of the algal food of abalone. En Shepherd, S., Tegner, M. and Guzman del Próo (Editors), Abalone of the world. Biology, Fisheries and Culture. Fishing News Books. No 15. Oxford, pp 169-181.
- Smith, R., (1989). Nutritional requirements. En Halver, J., (Editor). Fish Nutrition. Second edition. 1-29 pp.
- StatSoft, Inc. (1996). STATISTICA for Windows (Computer Program Manual). Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 east 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, Fax: (918) 749- 2217, email: info@statsoft.com
- Strickland, J. D. H. y T. R. Parsons (1965). A manual of seawater analysis. Bull. Fish. Res. Bd. Can. 125:1-195.
- Takami, H., T. Kawamura y Y. Yamashita (1997). Survival and growth rates of postlarvae abalone *Haliotis discus hannia* fed conspecific trail mucus and/or benthic diatom *Cocconeis scutellum* var. *parva*. *Aquaculture* 152, 129-138.
- Viana, M., M. Cervantes y R. Solano (1994). Attraction and palatability in juvenile abalone (*Haliotis fulgens*): nine ingredients used in artificial diets. *Aquaculture* 127: 19- 28.

- Viana, M., L. López y A. Salas, (1993). Diet development for juvenile *Abalone fulgens*, evaluation of two artificial diets and macroalgae. *Aquaculture*, 117: 149:156.
- Watson, D., S. Daume, J. Prince, L. Beazley y B. Knott (2004). The influence of light intensity on the density of different diatoms as feed for juvenile green lip abalone (*Haliotis laevis*). *Aquaculture* 235 : 345 359.