



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

EVALUACIÓN FISIOLÓGICA ALIMENTARIA Y BALANCE ENERGÉTICO DE *Dosinia ponderosa* ALIMENTADA CON CUATRO ESPECIES DE MICROALGAS FRESCAS Y CRIOPRESERVADAS

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

JOSÉ JESÚS ENCINAS ARZATE

Hermosillo, Sonora, México

18 de Diciembre de 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

EVALUACIÓN FISIOLÓGICA ALIMENTARIA Y BALANCE ENERGÉTICO DE
Dosinia ponderosa ALIMENTADA CON CUATRO ESPECIES DE MICROALGAS
FRESCAS Y CRIOPRESERVADAS.

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

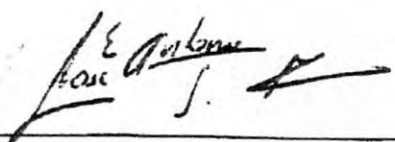
JOSÉ JESÚS ENCINAS ARZATE

Hermosillo, Sonora, México.

18 de Diciembre de 2015

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada "Evaluación fisiológica alimentaria y balance energético de *Dosinia ponderosa* alimentada con cuatro especies de microalgas frescas y criopreservadas", presentada por el Q. A. José Jesús Encinas Arzate, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



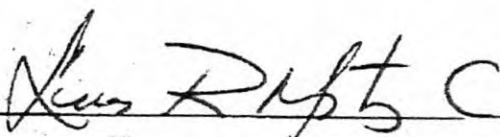
Dr. José Antonio López Elías

Director



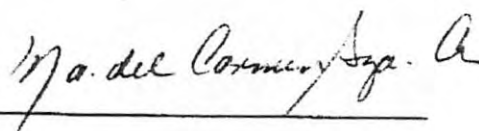
Dr. Luis Fernando Enríquez Ocaña

Co-Director



Dr. Luis Rafael Martínez Córdova

Secretario



Dra. María del Carmen Garza Aguirre

Sinodal Interno

Martha Elisa Rivas V.

Dra. Martha Rivas Vega

Sinodal Externo

DEDICATORIA

A Dios, por iluminar mi vida, me permite realizar lo que deseo y mis sueños acompañados de las personas que quiero y amo, muchas gracias por eso y más.

A mis padres Jorge Encinas y Lupita Arzate, gracias por su amor, apoyo, confianza y cuidados. Gracias por las enseñanzas y valores que me han inculcado. Por no dejar que nunca me rinda y seguir adelante como ustedes, son un gran ejemplo para mí.

A mis hermanos, por estar siempre presente en las buenas y en las malas, por las noches de desvelo. Por el apoyo que me han brindado.

A mi amigos y compañeros, gracias por compartir este tiempo conmigo, por el apoyo, enseñanzas y los buenos y malos momentos que vivimos y viviremos juntos. ¡Gracias por estar presentes en esos momentos!

Y finalmente, a mis asesores y maestros que siempre han estado ahí, gracias por sus enseñanzas, pero más que nada, por brindarme su amistad, tiempo y confianza.

DREAM IT – PLAN IT – DO IT.

IX. CONCLUSIONES

De las especies de microalgas evaluadas en este trabajo, la que presentó valores más altos en las tasas fisiológicas de filtración de *D. ponderosa* fue *Tetraselmis* sp. tanto en fresco como criopreservadas.

No existieron diferencias en las tasas fisiológicas al suministrar las microalgas frescas o criopreservadas, excepto cuando se utilizó *Tetraselmis* sp., que fue mayor con la dieta en fresco.

Para *Dosinia ponderosa*, no se encontraron diferencias en la tasa de consumo de oxígeno y de excreción amoniaca de las almejas, al suministrar la dieta fresca o preservada.

No se observaron diferencias significativas en el balance energético de la almeja, al suministrar las microalgas frescas o criopreservadas, a excepción de *Tetraselmis* sp., con la que el balance fue mayor al suministrarla en fresco.

Isochrysis sp. fue la única microalgas con la que la almeja presentó un balance energético negativo.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a la Universidad de Sonora y al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por permitirme mi superación y formación de posgrado, así como el apoyo y experiencias adquiridas en este tiempo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada y el apoyo.

A todos los integrantes de mi comité de tesis, muchas gracias por enriquecer este trabajo y sus enseñanzas. Gracias Dr. Antonio López por brindarme la oportunidad de trabajar con ustedes, sus enseñanzas, confianza, amistad y buenos recuerdos, sé que todo esto me servirá para ser mejor persona en todos los aspectos de la vida. Al Dr. Fernando Enríquez Ocaña y Dr. Luis Martínez Córdova, por compartir sus conocimientos y experiencias. A la Dra. María del Carmen Garza por su tiempo, ayuda y uno que otro susto y risas en el laboratorio.

Un muy especial agradecimiento a los Maestros Lauro, Álvaro y a la Dra. Nolberta, por compartir sus enseñanzas, experiencias, conocimientos, además de estar ahí en los buenos y malos momentos.

A mis compañeros del Laboratorio de Acuicultura. Diana Fimbres, Diana Medina, Angélica, gracias por escucharme, aguantarme y por los momentos que compartimos, sé que serán unas grandes doctoras. Ana Lucia y Emmanuel, por los momentos vividos. David, por la experiencia compartida y los buenos momentos (nos sobraron risas y comida).

Un ESPECIAL agradecimiento a mis amigos Ricardo Iván y Claudia Murrieta. Gracias por su compañía tanto en desvelos como en celebraciones, ustedes estuvieron apoyándome en mis caídas y victorias, son los mejores amigos con los que uno puede contar. Gracias de todo corazón. 本当にありがとう.

Un profundo agradecimiento a quienes en algún momento estuvieron compartiendo en este tiempo, a mis amistades fuera de la universidad, Carlos Medina, Jorge, Odel, Samaniego, Lupita Días, a las Fernandas (que son muchas)... y a todos los que quizás nunca lean esto, un profundo gracias de todo corazón.

RESUMEN

En los cultivos de animales acuáticos dedicados a la alimentación larvaria de diversas especies acuícolas, así como en el cultivo de larvas o adultos de moluscos bivalvos, las microalgas son esenciales, tanto a nivel comercial como en investigación. El uso de microalgas en la dieta para el cultivo de organismos acuáticos se limita a ciertas especies, lo que podría representar un problema importante de abasto. En este sentido, la criopreservación de microalgas puede ser una solución para problemas de abastecimiento. El objetivo del presente trabajo es la evaluación de la fisiología alimentaria y el balance energético de la almeja *Dosinia ponderosa* alimentada con microalgas criopreservadas y frescas. Se cultivaron cuatro especies de microalgas (*Tetraselmis* sp., *Nannocloropsis* sp., *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros muelleri*) que fueron suministradas en fresco y criopreservadas a los moluscos bajo condiciones de laboratorio. A través de la medición de las tasas de ingestión, respiración y excreción de estos organismos, se calculó el balance energético, el cual es un estimador de la energía disponible para el crecimiento, en masa corporal, producción de gametos y de concha. De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró que las tasas fisiológicas de *Dosinia ponderosa* fueron afectadas por la especie de microalga suministrada pero no por la estrategia de alimentación, no se observaron diferencias estadísticas entre estrategias alimentarias de las cuatro especies suministradas, excepto en la alimentación con *Tetraselmis* sp., donde se tuvieron valores superiores con la dieta fresca en comparación a la criopreservada. El balance energético tuvo valores negativos con la dieta de *Isochrysis* sp. fresca ($-0.514 \pm 1.060 \text{ J} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), sin embargo no presentó diferencias estadísticas respecto a la dieta de la misma microalga criopreservada. En conclusión, el uso de las microalgas criopreservadas utilizadas en este trabajo para la alimentación de *Dosinia ponderosa* no afectaron sus tasas filtroalimentadoras ni su balance energético.

ABSTRACT

Microalgae are essential in larval and various aquatic species feeding for commercial and research activities. The use of microalgae in the diet for growing aquatic organisms is limited to certain species, which could represent a supply problem. In this case, cryopreservation of microalgae can be a solution to this problem. This study is about the comparison of the filtration and clarification rates and assimilation efficiency *Dosinia ponderosa* fed with cryopreserved and fresh microalgae. Four species of microalgae (*Tetraselmis* sp., *Nannocloropsis* sp., *Isochrhysis* sp., *Chaetoceros muelleri*) were supplied in fresh and cryopreserved in molluscs diets under laboratory cultured. Through measuring of the ingestion rates, respiration and excretion of these organisms, the energy balance was calculated, which is an estimate of the energy available for growth in body mass, gamete production and shell. According to the results, it was found that the physiological rates of *Dosinia ponderosa* was affected by the species of microalgae supplied but not by feeding strategy (fresh and cryopreserved). No statistical differences between dietary strategies in the same species were observed except for *Tetraselmis* sp., where higher values was found in fresh diet compared to the cryopreserved. In the case of *Isochrhysis* sp. fresh diet, the energy balance was negative ($-0514 \pm 1,060 \text{ J} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), but did not present statistical differences with the cryopreserved diet of the same microalgae. In conclusion, the use of cryopreserved microalgae do not affect the physiological rates and the energy balance for *Dosinia ponderosa*.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	<i>ii</i>
DEDICATORIA	<i>iii</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>iv</i>
RESUMEN	<i>v</i>
ABSTRACT	<i>vi</i>
INDICE DE FIGURAS	<i>ix</i>
INDICE DE TABLAS	<i>x</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Moluscos bivalvos.	3
II.2 Alimentación de moluscos bivalvos.	5
II.3. Tasa de clarificación y tasa de filtración en moluscos bivalvos.	7
II.4. Factores endógenos y exógenos que afectan la filtroalimentación de los bivalvos.	8
II.4.1. Concentración y calidad del alimento.	8
II.4.2. Temperatura y salinidad.	9
II.5. <i>Dosinia ponderosa</i> .	9
II.6. Importancia de los cultivos de microalgas en la acuicultura.	11
II.7. Métodos de conservación de las microalgas.	13
II.7.1 Agentes criopreservadores.	15
II.7.1.1. Agentes crioprotectantes penetrates.	16
II.7.1.2. Agentes crioprotectantes no penetrantes.	16
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPÓTESIS	18
VI. OBJETIVOS	19
VI.1. Objetivo general.	19
VI.2. Objetivos específicos.	19
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	20
VII.1 Colecta y aclimatación de los organismos experimentales.	20
VII.2. Cultivo de microalgas.	20
VII.3. Criopreservación de las microalgas.	21
VII.4. Tasas fisiológicas.	21
VII.4.1. Tasa de clarificación.	21
VII.4.2. Tasa de filtración.	24
VII.5. Tasa de consumo de oxígeno y de excreción amoniaca	25
VII.6. Tasa de energía perdida en la respiración y de la energía perdida en la excreción amoniaca.	26

	Página
VII.7. Estandarización.	26
VII.8. Tasa de energía consumida.	27
VII.9. Eficiencia de asimilación.	27
VII.10. Tasa de energía absorbida.	28
VII.11. Balance energético.	28
VII.12. Análisis estadístico.	28
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
VIII.1. Tasa de clarificación.	29
VIII.2. Tasa de filtración.	32
VIII.3. Eficiencia de asimilación.	33
VIII.4. Tasa de respiración.	35
VIII.5. Tasa de excreción amoniacal.	36
VIII.6. Tasa de energía consumida y de energía absorbida.	38
VIII.7. Balance energético.	40
IX. CONCLUSIONES	43
X. RECOMENDACIONES	44
XI. LITERATURA CITADA	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Caracteres principales de la concha de un bivalvo. Fuente: FAO (1995).	4
2	Caracteres generales de un bivalvo. Fuente: FAO (1995).	5
3	Alimentación y partes involucradas en el proceso de biofiltración en moluscos bivalvos. Sifón inhalante (IS), branquias (G), ranura particular (VG), palpos labiales (P), sifón exhalante (ES).	7
4	Vista interna y externa de la valva de <i>Dosinia ponderosa</i> . Fuente: www.marinespecies.org	10
5	Distribución de la almeja <i>Dosinia ponderosa</i> . Fuente: FAO (1995).	11
6	Almeja <i>Dosinia ponderosa</i> en cámara de experimentación para la medición de las tasas fisiológicas.	22
7	Diagrama mostrando las diferentes dietas utilizadas en los experimentos de las tasas fisiológicas y balance energético.	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Valores promedio y desviación estándar de la tasa de clarificación ($L \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) y la tasa de filtración ($mg \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) de <i>Dosinia ponderosa</i> , alimentada con diferentes dietas de microalgas frescas y criopreservadas.	31
2	Valores promedio y desviación estándar de la eficiencia de asimilación de <i>Dosinia ponderosa</i> alimentada con diferentes dietas de microalgas frescas y criopreservadas.	35
3	Valores promedio y desviación estándar de la tasa de respiración ($mg \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) y la tasa de excreción amoniacal ($mg \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$), así como las pérdidas de energía en dichos procesos ($J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$), en <i>Dosinia ponderosa</i> bajo diferentes dietas de microalgas frescas y criopreservadas.	38
4	Valores promedio y desviación estándar de la energía consumida ($J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) y de la energía absorbida ($J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) de <i>Dosinia ponderosa</i> bajo diferentes dietas de microalgas frescas y criopreservadas.	40
5	Valores promedio y desviación estándar del balance energético ($J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) <i>Dosinia ponderosa</i> bajo diferentes dietas de microalgas frescas y criopreservadas.	42

I. INTRODUCCIÓN

México se encuentra dentro de los países con una importancia en el desarrollo de la acuicultura. Sólo en el 2008, la producción a nivel mundial de especies cultivadas en peso vivo fue de 283 mil toneladas. El cultivo de ostión es la tercera actividad acuicultural en orden de importancia en nuestro país; desarrollándose casi en su totalidad en las costas del Noroeste de México. Sin embargo y a pesar de su demanda, el cultivo de este molusco se ha estancado no sólo a nivel nacional, sino también a nivel mundial, principalmente porque los lugares apropiados para su producción coinciden con áreas urbanas, turísticas y/o con influencia de actividad agrícola, entre otras razones (Villalobos *et al.*, 2012). De acuerdo con datos proporcionados por la FAO (Food and Agriculture Organization, por sus siglas en inglés, 1995), el ostión fue el molusco más cultivado en el mundo en el año 2000. Recientemente, el volumen obtenido de producción pesquera de almejas en peso vivo a nivel nacional fue de 2,186.95 toneladas en el 2014, siendo el 41.39% aportado por el estado de Sonora (CONAPESCA, 2015). Las microalgas son esenciales en los cultivos de animales acuáticos, especialmente para las larvas y moluscos bivalvos por lo que hay una gran necesidad de reemplazar o tener suplementos vivos de microalgas tanto para criaderos comerciales como para investigación. La falla en la producción, particularmente en tiempo de gran demanda, causa problemas considerables en la crianza de bivalvos. El potencial uso de microalgas en conservación, como es el caso de las congeladas, daría una solución para los problemas de abasto debido a la caída en los cultivos de microalgas, baja concentración de los mismos e incluso para la conservación de estas. Al considerar esta opción, es importante conocer el efecto que la degradación bioquímica pudiera causar en las cualidades nutrimentales de las microalgas (Heasman *et al.*, 2000).

La dieta a base de microalgas es crucial para el desarrollo y crecimiento de los moluscos bivalvos, sin embargo, la restricción del número limitado de especies de microalgas disponibles representa un obstáculo importante para los cultivos de moluscos en los últimos

años (Helm *et al.*, 2006). La identificación y el uso de nuevas especies de microalgas con alto valor nutricional ha sido objeto de investigación en muchos laboratorios experimentales en todo el mundo (Knuckey *et al.*, 2002; Helm *et al.*, 2006). Para ser suministradas en los sistemas de cultivo de bivalvos se deben de considerar ciertos criterios: tener un tamaño apropiado para ser ingeridas, no deben de contener compuestos que inhiban su digestión, tener un alto contenido nutricional y ser de fácil producción para su uso en las diferentes escalas y sistemas de cultivo (Helm *et al.*, 2006; Ponis *et al.* 2006).

Algunos de los factores que afectan la masa corporal de los bivalvos son la cantidad y la calidad de los alimentos disponibles. El valor nutricional de las algas para la mayoría de los bivalvos está determinado por sus ácidos grasos esenciales, como el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:05 (n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA; 22:06 (n-3) (Lane, 1989); debido a que estos moluscos son incapaces de producir precursores de los mismos de cadenas más cortas (Hendriks *et al.* 2003). El efecto de la cantidad de alimento sobre el balance energético de los moluscos bivalvos ha sido ampliamente estudiado. A través de la medición de sus tasas de ingestión (la absorción de las partículas en suspensión como alimento), respiración y excreción, es posible estimar su crecimiento potencial (crecimiento entendido como la suma de producción gonadal, masa corporal y materia constituyente de la concha) bajo determinadas condiciones ambientales (Delgado *et al.*, 2004).

El objetivo del presente trabajo es la evaluación de la fisiología alimentaria y del balance energético de la almeja *Dosinia ponderosa* (Gray, 1833) al ser alimentada con cuatro especies de microalgas congeladas en comparación con las mismas especies en fresco, bajo condiciones de laboratorio.

II. ANTECEDENTES

II.1. Moluscos bivalvos.

El filo Mollusca es uno de los mayores, más diversos e importantes en el reino animal. Hay más de 50,000 especies descritas y alrededor de 30,000 de estos se encuentran en el mar. Los moluscos son animales de cuerpo blando, pero la mayoría están protegidos por una concha dura; bajo la concha hay un pliegue de tejido llamado manto, el cual encierra los órganos internos del animal. Otra característica de este filo es que poseen un gran pie muscular que se utiliza generalmente para locomoción (Gosling, 2003).

Existen seis clases de moluscos, siendo la clase Gastropoda el grupo más grande y diverso con 40,000 especies. Esta clase incluye caracoles, lapas, babosas de mar sin concha, caracoles y babosas terrestres. La clase Bivalvia, también conocida como lamelibranquios por la forma y disposición de sus branquias, posee cerca de 7,500 especies e incluye animales con dos valvas de concha como mejillones, ostras, vieiras y almejas. Los organismos como el pulpo, el calamar y la sepia pertenecen a la clase Cephalopoda y posee alrededor de 650 especies, representando la clase más organizada y especializada de todos los moluscos. Las clases Polyplacophora y Scaphopoda en conjunto contienen alrededor de 1,000 especies y por último, la clase primitiva Monoplacophora, los cuales poseen una concha simple tipo pateliforme que cubre al palio, y se extiende totalmente sobre el dorso del animal; contiene un único género *Neopilina* (Gosling, 2003).

Los bivalvos son, en algunos aspectos, los más modificados de todos los moluscos. Son organismos acuáticos de simetría bilateral. Ocupan el tercer grupo más importantes en términos de producción en la acuicultura, con una tendencia de aumento continuo entre los productores; además existe el interés por cultivar una variedad de especies de importancia comercial (Lovatelli *et al.*, 2007).

Su concha la componen dos valvas calcificadas recubriendo los lados derecho e izquierdo del cuerpo. Típicamente, ambas valvas son igualmente convexas (concha equivalva), pero pueden diferir en tamaño y forma (concha inequivalva) como resultado de la alteración de la simetría bilateral, como es el caso de algunos pectínidos. Las valvas están articuladas entre sí a lo largo de una prominencia marginal del borde dorsal denominada charnela y están conectadas por una estructura elástica, poco calcificada llamada ligamento; por acción de esta estructura, las dos valvas tienden a abrirse a lo largo de sus bordes anterior, posterior y principalmente ventral (Figura 1).

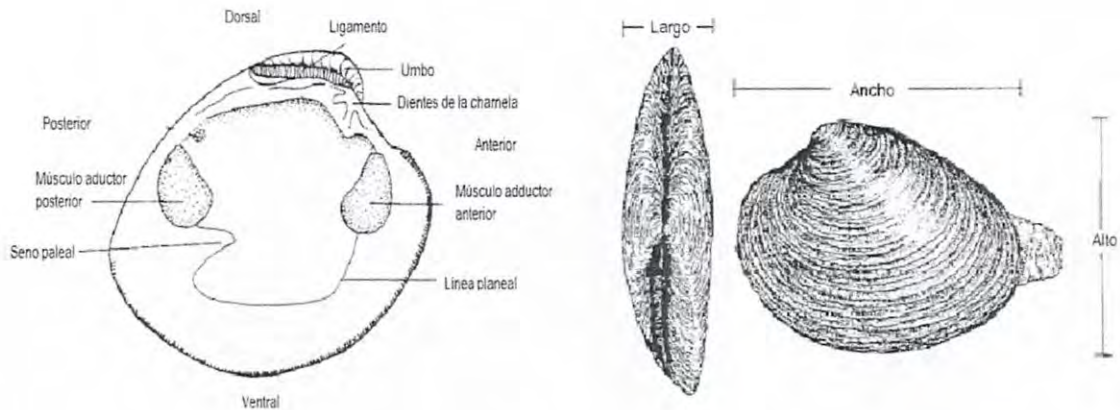


Figura 1. Caracteres principales de la concha de un bivalvo. Fuente: FAO (1995).

El cuerpo blando, no segmentado, de los bivalvos es lateralmente comprimido, pero carece de cabeza y de órganos de masticación. Está cubierto por el manto, una lámina de tejido formada por dos lóbulos que secretan y revisten internamente las respectivas valvas. Estos lóbulos paleales están fusionados dorsalmente con la masa visceral y circundan ventralmente una cavidad visceral comunicada con el medio ambiente. Los lóbulos paleales están firmemente adheridos a la superficie interna de las valvas a lo largo de una línea paleal bien definida, situadas cerca del margen ventral de la concha. Los bordes de los lóbulos paleales pueden estar parcialmente fusionados entre sí, formando posteriormente dos sifones a través de los cuales el agua es aspirada hacia el interior (sifón inhalante) o expulsada (sifón

exhalante). El pie, un cuerpo musculoso, puede tener forma de hacha (por lo cual también reciben el nombre de pelecípodos) y permite al animal desplazarse, excavar o adherirse a sustratos duros por medio de filamentos elásticos. Muchos bivalvos poseen un par de branquias de estructura laminar, cuya actividad genera un complejo sistema de corrientes de agua que permiten la recolección de alimento (FAO, 1995) (Figura 2).

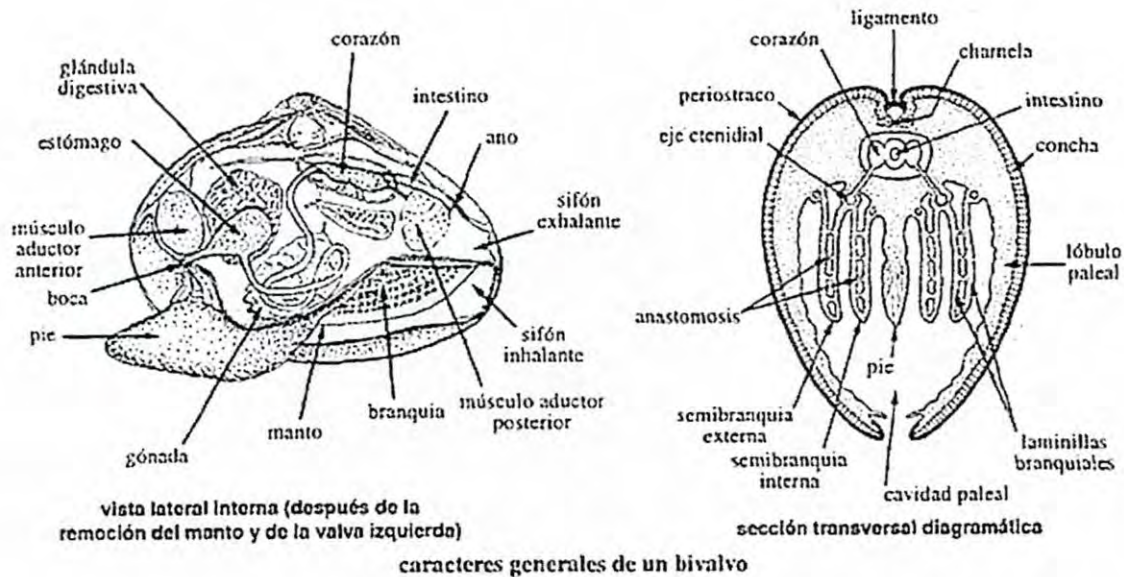


Figura 2. Caracteres generales de un bivalvo. Fuente: FAO (1995).

II.2. Alimentación de los moluscos bivalvos.

La mayoría de los bivalvos son micrófagos y se alimentan de placton o de materia orgánica suspendida en el agua, más concretamente de fitoplancton, detritos, materia orgánica particulada (consumidores de materia en suspensión) o bien, de organismos o materia orgánica del fondo (consumidores de sedimento). Al proceso de alimentación de la mayoría de los bivalvos se conoce como filtroalimentación; sin embargo, unas pocas especies han desarrollado modalidades de alimentación muy especializadas (FAO, 1995).

Los bivalvos filtradores se alimentan de materia particulada que se encuentra en suspensión, denominada comúnmente seston. Las características del seston vienen determinadas por procesos biológicos y físicoquímicos, así como la interacción entre ellos (Filguiera, 2007). Si bien el fitoplancton es fundamental en su dieta, también la componen bacterias, micro-zooplancton, detritus, así como material orgánico disuelto (Gosling, 2003).

Los bivalvos cultivados comercialmente son consumidores primarios y basan su dieta en el consumo de microalgas. Entre las especies de microalgas más comúnmente utilizadas como alimento vivo en acuicultura se encuentran varias diatomeas planctónicas, como *Thalassiosira pseudonana* y varias del género *Chaetoceros* sp., destacando *Chaetoceros muelleri* (Nieves *et al.*, 2009). Mientras que en la etapa juvenil y adulta la dieta de otros moluscos puede variar según el grupo, los bivalvos continúan como filtroalimentadores consumiendo microalgas y detritus toda su vida (Farías, 2003).

En el caso de los bivalvos, las branquias o ctenidios están relacionadas directamente con la captación, retención y selección de alimento (Figura 3). Originalmente se considera que su función fue meramente respiratoria y que evolutivamente derivó también a una función de alimentación (Allen, 1985). Las branquias funcionan como un colador en el que quedan retenidas las partículas de más de dos micras que lleva el agua. Una vez capturadas, los cilios branquiales trasladan estas partículas a unos canales situados en los pliegues ventrales y en las márgenes dorsales de las branquias, que finalmente las conducen a los palpos labiales; estos órganos son los encargados de introducir el alimento a la boca, ayudados por su epitelio ciliado. También pueden regular la cantidad de alimento que se ingiere, rechazando parte de él hacia el manto cuando su cantidad es excesiva o no es del tamaño requerido, formando pseudoheces que son expulsadas de la cavidad del manto (Widdows, 1985). El alimento pasa de la boca al esófago y de este al estómago, en donde las partículas más grandes pueden ser trituradas. Los residuos se devuelven en forma de heces hacia el exterior (Farías, 2003). Se ha sugerido, que algunos bivalvos pueden presentar una selección pre-digestiva de partículas antes de que lleguen a los palpos labiales (Bernad, 1974).

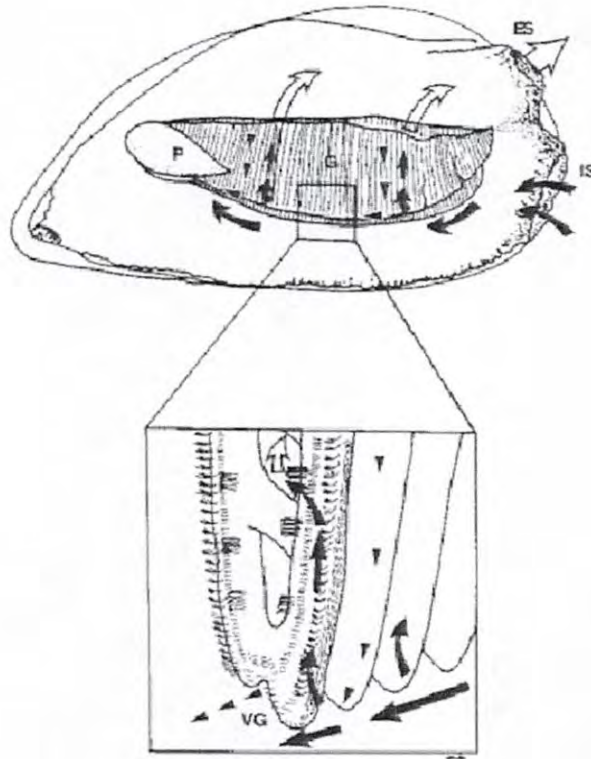


Figura 3. Alimentación y partes involucradas en el proceso de biofiltración en moluscos bivalvos. Sifón inhalante (IS), branquias (G), ranura particular (VG), palpos labiales (P), sifón exhalante (ES). Fuente: Gosling (2003).

La formación de pseudoheces es un proceso que al rechazar el material con baja carga nutricional no sólo mejora el contenido del material ingerido y asimilado, sino que previene la sobrecarga de los procesos de ingestión, esto es una importante estrategia de los organismos en un ambiente con baja calidad de seston (Beninger y col, 1992, Bacon y col, 1998).

II.3. Tasa de clarificación y tasa de filtración en moluscos bivalvos.

La tasa de clarificación se define como la cantidad de materia particulada removida de la columna de agua por filtración, por unidad de tiempo, y es expresada en $\text{mg} \cdot \text{h}^{-1}$ (Velasco y Navarro, 2003); mientras que la tasa de filtración se define como el volumen de agua libre de materia en suspensión que ha pasado por las branquias, por unidad de tiempo y es expresada en $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ (Delgado *et al.*, 2002).

II.4. Factores endógenos y exógenos que afectan la filtroalimentación de los bivalvos.

Las tasas de filtración y de clarificación de los bivalvos no son constantes dentro de una misma especie o una población, e incluso para un mismo individuo. Estas son variablemente dependientes del equilibrio entre los factores endógenos (como el tamaño, el factor de condición y el estado reproductivo del individuo, entre otros) y los factores exógenos (como la temperatura y salinidad del medio, así como la densidad, calidad y tamaño del alimento, entre otros) (Widdows, 1985). Los factores endógenos y exógenos pueden no ser independientes el uno del otro, con los primeros a menudo variado en función de los últimos (Barnes, 2006).

Entre los factores endógenos que pueden afectar las tasas de filtroalimentación de los bivalvos está el tamaño del individuo, debido a que individuos más grandes facilitan una mayor cantidad de flujo de agua y por lo tanto una mayor área de captura de partículas suspendidas en el medio. El grosor del área de filtración ha sido relacionado positivamente con la TF y la TC. Sin embargo, se ha observado que se puede obtener una reducción en las TF y TC de animales más grandes debido a la reducción de la actividad de los cilios branquiales de especímenes viejos (Winter, 1978). Una relación positiva entre las tasas alimentarias y el peso de la concha o longitud ha sido demostrada para muchas especies de bivalvos (Bayne, 1976).

Los factores exógenos más importantes que afectan la alimentación de los bivalvos son la calidad y la cantidad de alimento (Hawkins *et al.*, 1996). El tamaño de partícula también puede afectar la eficiencia en la captura y selección del alimento. La variabilidad temporal de las características de los alimentos puede ser influenciada por factores ambientales como la escorrentía, las corrientes de marea, la producción primaria y secundaria, la temperatura, entre otras.

II.4.1. Concentración y calidad del alimento.

Diversas investigaciones han sido realizadas para entender bajo que dietas los bivalvos tienen un mejor desempeño. Como resultado de lo anterior se conoce que la calidad y la cantidad del seston tienen un efecto directo sobre las tasas de alimentación de los bivalvos, se tienen

registros de relaciones positivas entre la concentración y la tasa de filtración (Hawkins y col, 2001; Ellis y col, 2002, Gosling E. *et al.* 2003, Nieves *et al.* 2009).

Las tasas de bombeo dependen de gran medida de la concentración del material particulado en el medio. Se ha demostrado que la tasa de bombeo del mejillón *Mytilus edulis* se redujo rápidamente o se detuvo por completo cuando se utilizó agua de mar libre de partículas y se concluyó que el material particulado presente en el agua de mar natural, en forma de plancton y detritos finos, estimula y mantiene el bombeo (Willson *et al.*, 1974). Para iniciar la filtración la concentración de partículas debe alcanzar un umbral crítico, sin embargo cuando la concentración es muy elevada las valvas de los organismos empiezan a cerrarse, lo que conduce finalmente a la disminución de las tasas de filtración (Gosling, 2003).

11.4.2. Temperatura y salinidad.

La temperatura es considerada como el factor ambiental más importante que determina el metabolismo (Bayne *et al.*, 1976, Nieves *et al.* 2009, Guzmán *et al.* 2013). En general las tasas de filtración y aclaramiento se incrementan en relación directa dentro de un intervalo de temperatura hasta llegar a un óptimo donde se estabilizan. Fuera de ese intervalo, las tasas de filtración y de clarificación disminuyen drásticamente. Esta relación entre la actividad alimenticia y la temperatura, es específica para cada especie y está relacionado a su historial térmico o de aclimatación (López-Sánchez, 2003).

La salinidad óptima para que los moluscos bivalvos puedan llevar a cabo el proceso de filtración es la de su hábitat natural, ya que cuando son transferidos a salinidades más altas o más bajas, las tasas de filtración y clarificación de los organismos se reducen, sin embargo, cuando los organismos pasan por un periodo de aclimatación aumentan el intervalo en el cual sus tasas de filtroalimentación no se ven afectadas, además de tolerar intervalos fuera de los cuales pueden caer en estrés (Gosling, 2003).

II.5. *Dosinia ponderosa*.

La almeja reina o almeja blanca, *Dosinia ponderosa* (Gray, 1838) (Figura 4) se distribuye desde la Laguna Ojo de Liebre en Baja California Sur en México, hasta Payta en Perú (Figura

5). Habita aguas cercanas a la costa hasta los 60 m de profundidad. Su distribución está dada preferencialmente por el tipo de sustrato y la profundidad, habitando por debajo del límite inferior de las mareas, en los fondos areno-limosos (Arreola, 1997).

Estos organismos se caracterizan en poseer una concha pesada y dura; con una lúnula pequeña hundida y una superficie externa formada por ribetes concéntricos bastante anchos y aplanados. Su placa dentaria es sólida y relativamente ancha posteriormente, con 3 dientes cardinales divergentes en cada valva y un diente lateral anterior en forma de tubérculo en la valva izquierda. Sus bordes internos son lisos y posee una coloración externa blanca, con periostraco color crema brillante, mientras que su superficie interna es de color blanco (FAO, 1995).

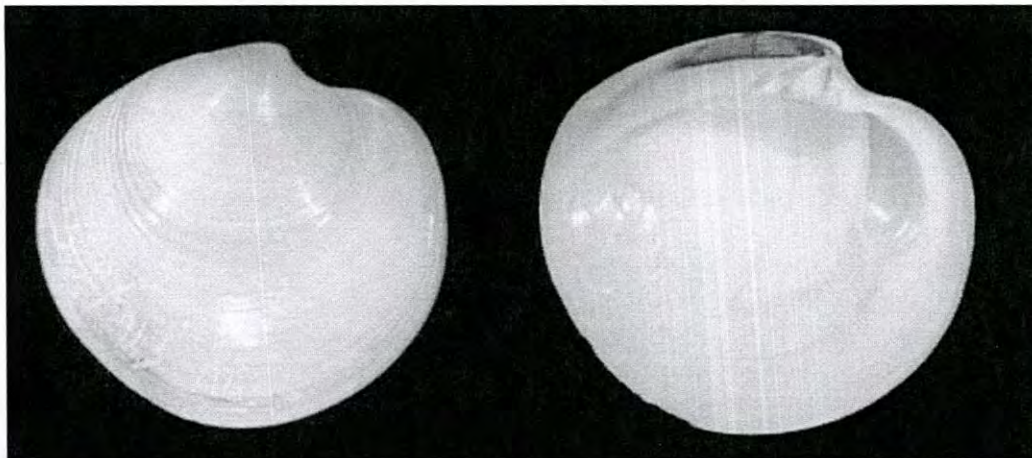


Figura 4. Vista interna y externa de la valva de *Dosinia ponderosa*.

Fuente: www.marinespecies.org



Figura 5. Distribución de la almeja *Dosinia ponderosa*. Fuente: FAO (1995).

II.6. Importancia de los cultivos de microalgas en la acuicultura

La importancia de la utilización de los cultivos de microalgas se debe principalmente a su composición química, debido a que contienen una gran variedad de polisacáridos, proteínas de alto valor nutricional, aceites esenciales (principalmente compuestos por ácidos grasos de la familia omega), vitaminas, antioxidantes y pigmentos (Fabregas y Herrero, 1990). Estas se

han usado como alimento para humanos, ganado (porcino, aves, entre otros) y organismos marinos (moluscos, larva de peces, camarones y otros), así como en la producción de biodiesel, fármacos, colorantes y otros productos químicos (Alabi *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2005). Las microalgas *Chlorella* sp. y *Spirulina* sp. son usadas en la salud y alimento en seres humanos como suplemento en dietas; *Dunaliella* sp. es cultivada por la cantidad de pigmentos que produce como son los carotenos, y varias especies más como *Chaetoceros* sp. e *Isochrysis* sp. por la importancia en la acuicultura como alimento (Borowitzka 1999).

La calidad nutricional de las microalgas está relacionada con la cantidad de micro y macronutrientes que producen. La calidad puede variar entre las especies de microalgas, así como por las condiciones de su cultivo, como la temperatura, pH, intensidad de luz, longitud de onda en la luz empleada y aeración. Las variaciones de cultivo provocan un efecto sobre la producción de ácidos grasos, carbohidratos y la síntesis de proteínas; aunque se ha observado que la fase de crecimiento también provoca variaciones en la calidad de las mismas (Cardozo *et al.*, 2006).

En las últimas décadas se han hecho varias investigaciones sobre el uso de diferentes especies de microalgas como alimento, sin embargo muy pocas han sido aptas para su uso en la acuicultura. Existen muchas diferencias en los valores nutricionales que las microalgas presentan (Enright *et al.*, 1986; Brown *et al.*, 1997). Se ha comprobado que para suministrar un balance nutricional adecuado hay que tener en cuenta una dieta elaborada por mezclas de microalgas, que influyan de manera positiva a la eficiencia de asimilación y la tasa de crecimiento en los animales alimentados (Yamaguchi 1997, Backer 2004). Para ser suministradas en criaderos se deben de considerar varios criterios como el tener un tamaño y forma apropiada para la ingestión y digestión, no deben de contener compuestos que inhiban su digestión, tolerar amplios rangos de temperatura, luz y nutrientes; así como un alto y apropiado contenido nutricional, ser de fácil y rápida producción para el uso en las diferentes escalas y sistemas para los criaderos o laboratorios, además de que su producción y mantenimiento deben ser de bajo costo (Helm *et al.*, 2006; Ponis E. *et al.* 2006).

Los experimentos realizados con dietas de microalgas en moluscos bivalvos han mostrado los requerimientos parciales de carbohidratos y de ácidos grasos polinsaturados

esenciales (Epifanio 1979; Coutteau *et al.*, 1992). La adición de carbohidratos en las dietas de los bivalvos, como las ostras, ha mostrado un aumento en la tasa de crecimiento, así como la adición de microencapsulados de proteínas en juveniles de moluscos han ayudado en su crecimiento y supervivencia (Kreeger *et al.*, 1993).

II.7. Métodos de conservación de las microalgas

Con el fin de aumentar la vida útil de las microalgas, se han desarrollado nuevas técnicas para su conservación, las cuales tienen como principio el no alterar sus características nutricionales (Richmond, 2004). Una de las principales ventajas de la preservación de las microalgas es la de contar con la disponibilidad inmediata de las cepas de cultivo, así como la optimización del espacio y de materiales de laboratorio.

Los métodos más comunes utilizados para la preservación de las microalgas son: 1) La utilización de temperaturas bajas, donde se mantienen a las microalgas durante un periodo de tiempo largo a temperatura alrededor de los 4°C; 2) La utilización de secado por aspersión, método usado dentro de la acuicultura con el fin de ser utilizadas para alimento; 3) La liofilización, la cual mantiene su vida útil por un periodo de tiempo mayor, mejorando su forma y composición bioquímica (Richmond, 2004). Entre las técnicas de preservación está también el uso de concentrados de microalgas, los cuales pueden ser criopreservados, disminuyendo los costos de producción.

La criopreservación ha sido utilizada como una forma de preservar varios organismos, la cual está siendo utilizada en la actualidad por la acuicultura (Tzoevenis *et al.*, 2004). La criopreservación es uno de los principales métodos para mantener muestras biológicas en un estado de “animación suspendida” a temperaturas extremadamente bajas, de hasta -196°C. Se realiza principalmente en cultivos líquidos, esto es debido a su facilidad de crecer en estos medios de cultivo. El objetivo principal de la criopreservación es el de preservar organismos sin que estos sufran cambios en sus propiedades morfológicas, fisiológicas y biológicas. En este caso, las bajas temperaturas hacen que se minimicen las reacciones bioquímicas, prolongando su tiempo biológico (Taylor y Flecher, 1999, Jo *et al.* 2003, Rhodes *et al.*, 2006; Woods *et al.*, 2004.)

La clave para el proceso de criopreservación de las microalgas son los lípidos (fosfolípidos, ácidos grasos y colesterol), proteínas y carbohidratos encontrados en la membrana plasmática, siendo de mayor importancia los lípidos, ya que estos les confieren la fluidez y resistencia de la membrana durante el proceso de criopreservación (Ávila *et al.*, 2006, Singer y Nicholson, 1972).

Los crioprotectantes usados en la actualidad son inocuos para las células mientras ocurre el proceso de congelamiento, disminuyendo el daño celular e incluso la muerte de esas. Sin embargo, muy poco se conoce sobre los límites tóxicos que estos crioprotectantes presentan a temperatura ambiente y la viabilidad celular de estos cultivos. En el uso de crioprotectantes en microalgas aún no se conocen los niveles de tolerancia, pero a su vez, han sido una respuesta a los problemas de producción y preservación de cultivos para la acuicultura.

En general, la criopreservación presenta un potencial a los problemas de preservación de especies de microalgas usadas en la acuicultura. Las microalgas de origen marino han sido criopreservadas con éxito a temperaturas menores de 4, -20 y -80 °C usando crioprotectantes comunes y de bajo peso molecular como el metanol, propileno y el glicerol. Como ejemplo se han podido criopreservar especies como *Chlorella* sp., *Isochrysis* sp. y *Dunaliella* sp. (Tzoevenis *et al.*, 2004).

Como ventajas de la criopreservación de las microalgas sobre otros métodos de preservación está el de que no permite la oxidación de compuestos importantes como lo son los ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son esenciales en las dietas utilizadas en la acuicultura; además, las células en suspensión no presentan desintegración o un mayor daño celular en comparación con la deshidratación u otros métodos que utilizan altas temperaturas; permite poco crecimiento microbiológico que pueda ocasionar proliferación de bacterias patológicas (en el caso de que el cultivo no se haya cosechado adecuadamente o en el caso del uso de concentrados o pastas de microalgas) o pérdida en la biomasa; así como la de asegurar la calidad e integridad de la pared celular, la cual puede verse afectada por procesos como la floculación, filtración o centrifugación (Dhont 2003, Brown *et al.*, 1996).

II.7.1. Agentes criopreseervadores.

Para la realización de la criopreservación se emplea como medio de cultivo del 50 al 100% de agua de mar natural; agregándole distintas sustancias como dimetil sulfóxido (DMSO), glicerol, etilenglicol, prolina, manitol, sorbitol, entre otras; todas con el fin de lograr una criopreservación efectiva sobre las células de microalgas (Jo *et al.*, 2003).

Las características principales de los agentes criopreservadores es que sean rápidamente solubles en agua de mar y que no posean efecto tóxico sobre las microalgas. La función de estos fue descrita por Ávila *et al.* en el 2006, como los agentes encargados de realizar la disminución en el punto de solidificación de una sustancia, en comparación al que presentan sin criopreservador, con el fin de alcanzar una mayor concentración de solutos a una temperatura menor, de tal forma que la célula criopreservada se encontrará más deshidratada, y por lo tanto el gradiente osmótico al que se someterá será menor. Las investigaciones realizadas por varios autores han mostrado que los mejores efectos dados por los criopreservadores son cuando estos son aplicados en concentraciones desde 2 hasta un 20% (Ávila *et al.*, 2006; Day y Brand, 2005; Jo *et al.*, 2003).

En cuanto se refiere a la composición bioquímica de los agentes criopreservadores es posible distinguir tres tipos de estos: 1) los alcoholes, como el metanol, etanol y glicerol; 2) azúcares, como es el caso de la glucosa, lactosa y sacarosa; y 3) el dimetil sulfóxido (Ávila *et al.*, 2006; Jo *et al.*, 2003).

También los agentes crioprotectantes pueden distinguirse de dos forma, dependiendo de la forma que estos actúan: 1) Los que poseen un movimiento “pasivo” a través de la membrana plasmática para equilibrarse entre la solución extracelular y el interior de la membrana, los cuales son llamados agentes criopreservadores penetrantes; y 2) los que no tienen la capacidad de pasar la membrana plasmática y se quedan como remanente en la solución extracelular, estos últimos han sido más evaluados en microalgas marinas y son llamados agentes criopreservadores no penetrantes (Day y Brand, 2005).

II.7.1.1. Agentes criopreservadores penetrantes.

Los agentes criopreservadores penetrantes o criopenetrantes son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular, los más utilizados para la criopreservación de microalgas son varios tipos de alcoholes de cadena corta como el metanol y el glicerol, como también el dimetil sulfóxido (DMSO). Su acción crioprotectora es atribuida principalmente a la habilidad de prevenir la acumulación excesiva de electrolitos como de otras sustancias durante el proceso de congelación, además de evitar la formación de cristales de hielo, los cuales rompen la estructura molecular de las microalgas. El bajo peso molecular de los agentes permiten la entrada rápida a través de la membrana celular, para modular la estabilidad y las fases de bicapa de los fosfolípidos y un efecto sobre la solvatación de agua (Ávila *et al.*, 2006, Jo *et al.*, 2003).

Tzovenis *et al.* (2004) observaron el efecto tóxico de varios criopreservadores como el dimetil sulfóxido, el metanol y el propilenglicol, sobre microalgas de diferentes especies como *Chlorella* sp., *Isochrysis* sp. y *Dunaliella* sp.; donde se observó que *Isochrysis* fue la única que soportó concentraciones mayores al 2% de DMSO, siendo la posible causa el efecto tóxico del agente a concentraciones por encima del 1%, debido a la formación de puentes de hidrógenos más fuertes, provocando una inhibición de las funciones celulares, así como alteraciones en la cinética enzimática de los organismos (Gwo *et al.*, 2005, Tzovenis *et al.*, 2004).

II.7.1.2. Agentes criopreservadores no penetrantes.

Los agentes criopreservadores no penetrantes son sustancias de alto peso molecular como los azúcares, los cuales son efectivos a velocidades altas de congelación. La forma de actuar de estos compuestos es la de promover una rápida deshidratación celular debido a la mayor concentración de solutos dentro del medio. Los azúcares mayormente usados son la glucosa, la dextrosa y el L dextrano (Ávila *et al.*, 2006, Jo *et al.*, 2003).

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a que diversas especies de moluscos bivalvos basan su alimentación en el fitoplancton y a que la producción de estos moluscos en laboratorio se ha incrementado grandemente, el suministro de microalgas para abastecer estos laboratorios puede llegar a ser insuficiente. Es necesario por lo tanto, buscar alternativas para sustituir o complementar la alimentación. Una alternativa muy viable es el uso de microalgas preservadas. Sin embargo, se requiere información sobre el efecto que esta forma de suministrar las microalgas puede tener sobre los organismos alimentados. En particular es necesario generar información sobre la fisiología de filtración y sobre el balance energético, para especies de bivalvos con potencial de cultivo como *Dosinia ponderosa* y cómo puede ser afectado por una alimentación a base de diferentes especies de microalgas criopreservadas.

IV. HIPÓTESIS

Las tasas fisiológicas alimentarias (tasa de filtración, clarificación) y el balance energético de *Dosinia ponderosa* no se verán afectadas por el tipo de microalga con que se le alimentó, ni tampoco por la forma en que se proporciona (frescas o preservadas).

VI. OBJETIVOS

VI.1. Objetivo General.

Evaluar la fisiología alimentaria y el balance energético de *Dosinia ponderosa* alimentada con cuatro diferentes especies de microalgas y bajo diferentes estrategias de suministro (frescas y criopreservadas).

VI.2. Objetivos Específicos.

- Evaluar las tasas fisiológicas alimentarias (tasas de filtración y clarificación) del bivalvo alimentado con cada dieta de microalga.
- Comparar el efecto de las dietas bajo las diferentes estrategias de alimentación (microalgas frescas y criopreservadas) sobre las tasas fisiológicas evaluadas.
- Evaluar el balance energético del bivalvo alimentado con cada una de las especies de microalgas suministradas y bajo las diferentes estrategias de suministro (fresca y criopreservada).

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1. Colecta y aclimatación de los organismos experimentales.

El presente estudio se realizó en los laboratorios de la Academia de Acuicultura en el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), ubicado en Hermosillo, Sonora. La recolecta de los organismos de *Dosinia ponderosa* se realizó en dos zonas cercanas a Bahía de Kino, Sonora (28° 49' 22" N, 111° 56' 27" W). Los organismos fueron capturados por buceo autónomo y luego transportados en una hielera sin agua, presentando un peso seco promedio de 11.963 ± 4.614 g. Una vez en el laboratorio se procedió a su limpieza para luego ser colocados en tanques de plástico con una capacidad de 30 litros, en donde se llevó a cabo su aclimatación para su posterior uso en los experimentos de fisiología alimentaria y balance energético. La aclimatación para cada dieta de microalga duró siete días, durante los cuales se proporcionó como alimento dos raciones diarias de 1.5 litros de la microalga. Se usaron como alimento dietas monoalgales frescas de las especies usadas para cada experimento, las cuales fueron *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis* sp., *Tetraselmis* sp. y *Nannochloropsis* sp.

VII.2. Cultivo de microalgas.

Las microalgas *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis* sp., *Tetraselmis* sp. y *Nannochloropsis* sp. fueron proporcionadas por el cepario del laboratorio de la Academia de Acuicultura del DICTUS. El cultivo de las microalgas se realizó en ese mismo laboratorio, utilizando el medio F2 según lo descrito por Guillard y Ryther (1962), enriquecido con metasilicatos (Villegas-Hernández, 1997).

Los cultivos se iniciaron con una cepa de cada especie de microalga, de manera escalonada, con un promedio de 5 días entre cada etapa. Las cepas fueron primero inoculadas en tubos de 15 mL, después se pasaron a matraces de 250 mL, posteriormente se escalaron a

matraces de un litro, luego a garrafrones de 15 litros y finalmente a columnas de 80 litros, de donde se obtuvieron las cantidades necesarias para la alimentación de los organismos.

El agua de mar necesaria para la preparación del medio de cultivo fue esterilizada utilizando una autoclave (únicamente para el caso de los cultivos en tubos y matraces). En el resto de las etapas se administraron $3 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de hipoclorito de sodio comercial durante un periodo de 24 horas (para el caso de los cultivos en garrafrones y columnas usadas). Posteriormente se llevó a cabo la neutralización del cloro presente en el agua de mar, añadiendo $0.175 \text{ gr}\cdot\text{L}^{-1}$ de tiosulfato de sodio junto con aireación durante dos horas. Una vez preparada el agua se agregaron los nutrientes correspondientes al medio F2.

La técnica utilizada fue la de cultivo semicontinuo, manteniéndolas en fase exponencial (López y Voltolina, 1993; Fábregas *et al.*, 1995). Todos los cultivos de microalgas se mantuvieron a $21 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, con agitación continua de burbujas por aireación. La iluminación fue continua utilizando dos lámparas fluorescentes de luz blanca de día.

VII.3. Criopreservación de las microalgas.

La criopreservación de las microalgas se llevó a cabo centrifugando los cultivos de cada especie usada para separar la biomasa del agua de cultivo. Se usaron tubos de ensaye de 50 mL en una centrífuga Thermo Scientific Heraeus Multifuge X1R. La centrifugación se realizó a una velocidad de 4000 gravedades por un periodo de tiempo de 20 minutos, a una temperatura de 4°C . Posteriormente se pesó la biomasa para agregar glicerol (crioprotectante) al 15% del volumen respecto al peso recuperado. La pasta de microalga con el crioprotectante fue colocada en un ultracongelador a -80°C de la marca Ner Brunswick modelos U9270-0002.

VII.4. Tasas Fisiológicas

VII.4.1. Tasa de clarificación.

Para determinar las tasas fisiológicas se colocó una almeja en cada una de una serie de cámaras experimentales de plástico con capacidad de 2.3 Litros (Figura 6). Para cada tratamiento, especie de microalga fresca o criopreservada (Figura7), se utilizaron cinco cámaras como réplicas. Se utilizó además una cámara de más como control en la cual se

colocaron las valvas vacías de un organismo, con el fin de determinar la sedimentación por efecto de la hidrodinámica de la concha. Todos los experimentos fueron realizados en condiciones de laboratorio, a una temperatura de 21°C y una salinidad de 35 ups. Los organismos seleccionados para el experimento fueron animales aparentemente saludables y activos. Veinticuatro horas antes del inicio de cada uno de los experimentos, no se ofreció alimento a los organismos con la finalidad de que evacuaran sus tractos digestivos, previniendo así que la alimentación anterior influyera en las mediciones de las tasas fisiológicas además de estimular el apetito en los organismos para cada experimento. Al momento de suministrar el alimento se realizaron soluciones con los diferentes cultivos de microalgas para poder tener la misma concentración de alimento. En el caso de los criopreservados se realizó una aclimatación previa, descongelándolos en un baño maría a temperatura ambiente para preparar las concentraciones de alimento para cada experimento.

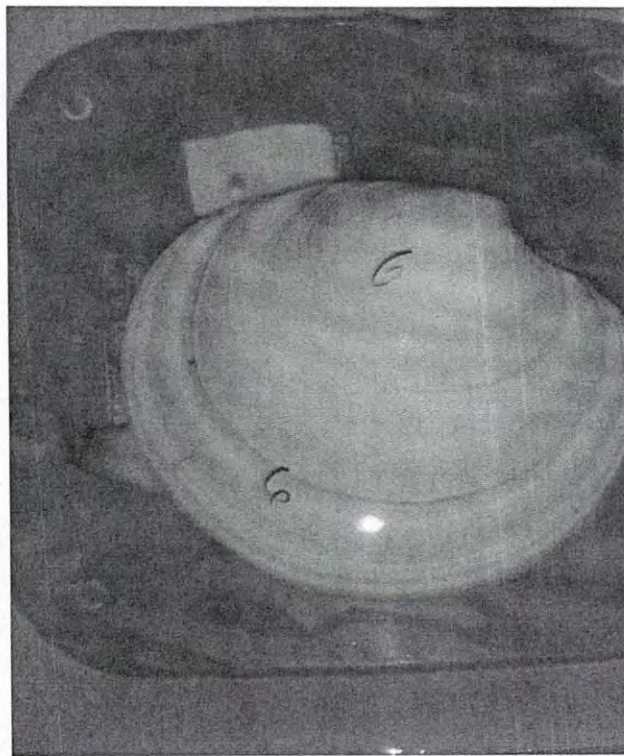


Figura 6. Almeja *Dosinia ponderosa* en cámara de experimentación para la medición de las tasas fisiológicas.

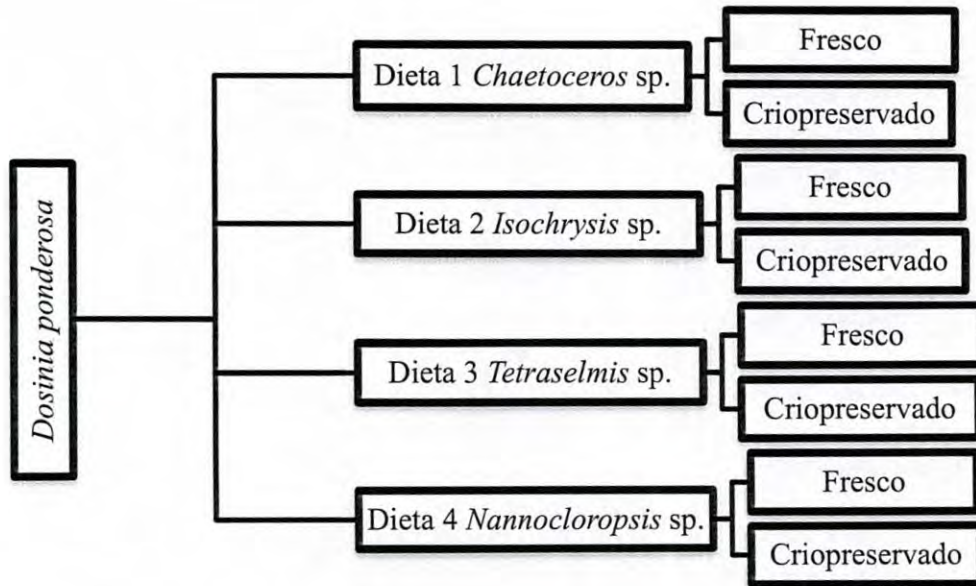


Figura 7. Diagrama mostrando las diferentes dietas utilizadas en los experimentos de las tasas fisiológicas y balance energético.

Durante los experimentos se utilizó una suspensión de cada microalga con una densidad celular aproximada de 1×10^5 cél/ml, la cual se calculó mediante conteo celular, fijando con Lugol alrededor de 1 ml de suspensión (Andersen, 2005). Los conteos celulares se llevaron a cabo empleando un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto Carl Zeiss Axiostar Plus utilizando el objetivo 10x. El número de células se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{No. células/mL} = (\text{No. de células totales} / \text{No. de cuadrantes contados}) \times 10,000$$

Esta densidad celular se mantuvo para evitar la producción de pseudoheces (Berg *et al.*, 1986). Para mantener la suspensión homogénea se utilizó aireación por medio de piedras difusoras, tratando de mantener los difusores no muy cercanos a los organismos para evitar perturbaciones.

El tiempo estimado de cada experimento inició desde el momento en el que los moluscos abrieron sus valvas considerando que la filtración comenzó en ese momento.

Transcurridas 4 horas se tomó una muestra de la suspensión de cada una de las cámaras y todas fueron fijadas con lugol para realizar el conteo de células.

La tasa de clarificación (TC) expresada en $L \cdot h^{-1}$ representa el volumen de agua completamente limpia de partículas suspendidas en un tiempo determinado o el volumen de agua libre de materia en suspensión que ha pasado por las branquias, por unidad de tiempo. Se calculó de acuerdo a la ecuación de Jørgensen (1990) mediante la siguiente fórmula:

$$TC = v \cdot \frac{(\ln C_i - \ln C_f)}{FC} \cdot t$$

donde v es el volumen de la cámara experimental (L), $\ln C_i$ es el logaritmo natural de la concentración inicial; $\ln C_f$ es el logaritmo natural de la concentración final; FC es el factor alométrico (0.434) y t es el periodo de tiempo que duró la medición, en horas.

VII.4.2. Tasa de filtración.

La tasa de filtración (TF), fue evaluada de acuerdo al procedimiento descrito por Winter (1978). Debido a que en la presente investigación se suministró un cultivo monoalgal como alimento para cada caso, la materia particulada fue representada por las células de cada dieta de microalga, ya sea fresca o criopreservada, considerando su peso orgánico. La tasa de clarificación fue estimada por medio de la fórmula propuesta por Winter (1978), excluyendo de manera aproximada la microalga sedimentada por el efecto hidrodinámico de las valvas en cada unidad experimental y expresada en $mg \cdot h^{-1}$, donde:

$$TF = TC \cdot po$$

donde TC es la tasa de clarificación ($L \cdot h^{-1}$) y po es el peso orgánico de la microalga contenida en un litro de agua expresado en $mg \cdot L^{-1}$, este se determinó por estequiometría, filtrando un volumen determinado de los cultivos de microalgas. Para el caso de *Chaetoceros* sp. su peso orgánico fue de $13.3 \text{ mg} \cdot L^{-1}$, para *Isochrysis* sp. de $7 \text{ mg} \cdot L^{-1}$, para *Tetraselmis* sp. de $36 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ y para *Nannochloropsis* sp. de $6 \text{ mg} \cdot L^{-1}$.

VII.5. Tasa de consumo de oxígeno y de excreción amoniacal.

La medición de la cantidad de oxígeno y de amonio disueltos en las cámaras experimentales para la determinación de las tasa de consumo de oxígeno y la tasa de excreción amoniacal se realizaron con el equipo HANNA (multiparameter photometer for aquaculture HI 83203-01) al finalizar los experimentos, en una nueva corrida experimental bajo los mismos tratamientos de la corrida inicial. Para dichas determinaciones, un organismo fue colocado en cada una de cinco cámaras experimentales y una cámara más con valvas vacías como control. Las cámaras fueron herméticamente cerradas, con oxígeno a saturación de agua de mar, previo a las mediciones iniciales de oxígeno y amonio en cada una de ellas. Después de 4 horas que los organismos abrieron sus valvas, se tomaron las mediciones finales de ambos parámetros. Los valores registrados en cada cámara experimental fueron corregidos considerando la concentración de O_2 y amonio en la cámara testigo.

La tasa de respiración (TR), expresada en $mg \cdot h^{-1}$, se obtuvo por medio de la siguiente fórmula:

$$TR = \frac{(O_{2i} - O_{2f})}{t}$$

donde O_{2i} y O_{2f} corresponden a la concentración inicial y final de oxígeno respectivamente y t es el tiempo transcurrido entre la lectura inicial y final de la concentración de oxígeno.

En cuanto a la determinación de la tasa de excreción amoniacal (TU), expresada en $mg \cdot h^{-1}$, esta se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$TU = \frac{(NH_{4f} - NH_{4i})}{t}$$

donde NH_{4i} y NH_{4f} corresponden a la concentración inicial y final de amonio respectivamente y t es el tiempo transcurrido entre la lectura inicial y final de la concentración de amonio.

VII.6. Tasa de energía gastada en la respiración y de la energía perdida en la excreción amoniacal.

Para determinar la tasa de energía perdida por el proceso de respiración (R), expresada en $J \cdot h^{-1}$ se utilizó la siguiente fórmula:

$$R = TR \cdot 14.06$$

donde TR es la tasa de respiración expresada en $mg \cdot h^{-1}$ y 14.06 es el equivalente energético del oxígeno consumido ($J \cdot mg^{-1}$), esto es, la energía gastada por cada mg de oxígeno consumido (Crisp, 1971).

A su vez, la energía perdida por la excreción amoniacal fue expresada en $J \cdot h^{-1}$ y fue calculada mediante la fórmula:

$$U = TU \cdot 24.87$$

donde TU es la tasa de excreción amoniacal expresada en $mg \cdot h^{-1}$ y 24.87 es el equivalente energético del amonio producido, expresado en $J \cdot mg^{-1}$, que representa la energía perdida por cada mg de amonio excretado (Elliot y Davison, 1975).

VII.7. Estandarización

Debido a que los organismos mostraron variaciones en el peso del tejido blando, las tasas evaluadas en los experimentos presentaron variaciones. Con el fin de poder realizar comparaciones válidas, todas las tasas fisiológicas debieron estandarizarse a un gramo de peso seco de los moluscos en base a la siguiente ecuación propuesta por Hawkins *et al.* (1998):

$$T_{(g)} = T \cdot (Ws/We)^{-b}$$

donde $T_{(g)}$ es la tasa fisiológica estandarizada, T es la tasa fisiológica no estandarizada, Ws equivale a peso estandarizado (1 gramo), We es el peso seco del organismo experimental en gramos, $b = 0.75$, valor de una constante. Para la obtención del peso seco de los organismos,

fueron separadas las valvas del tejido blando y fueron desecadas en una estufa a 60 °C durante 24 horas.

VII.8. Tasa de energía consumida

Se define como tasa de energía consumida a la cantidad de energía ingresada al sistema a través del alimento consumido por unidad de tiempo. Es expresada en $J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ y se obtuvo por medio de la siguiente fórmula:

$$C = c \cdot TC$$

donde TC es la tasa de clarificación estandarizada expresada en miligramos de peso orgánico del alimento consumido por hora por gramo del organismo consumidor ($mg \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) y c se refiere al valor energético de 1 mg de peso orgánico de la microalga utilizada como alimento, que es de $24.72 J \cdot mg^{-1}$ para *Chaetoceros* sp. (Piña Valdez *et al.*, 2004), de $21 J \cdot mg^{-1}$ para el caso de *Isochrysis* sp. (Crisp *et al.*, 1971; Velasco *et al.*, 2003), de $17.9 J \cdot mg^{-1}$ para *Tetraselmis* sp. (White *et al.*, 1987; Ibarrola *et al.* 2008) y de $24.7 J \cdot mg^{-1}$ para *Nannochloropsis* sp. (McLuscky *et al.*, 1981).

VII.9. Eficiencia de asimilación

La eficiencia de asimilación es definida como la fracción de la energía consumida que es asimilada por el organismo y es expresada en porcentaje. Se calculó mediante la siguiente fórmula propuesta por Conover (1966):

$$EF = \frac{(F - E)}{(1 - E)F}$$

donde F es la razón del peso orgánico y el peso seco de la materia total particulada (MTP) suministrada, y E es la razón del peso orgánico y del peso seco de las heces.

VII. 10. Tasa de energía absorbida

La tasa de energía absorbida (A), se refiere a la cantidad de energía asimilada en función de la energía consumida por el organismo. Para evaluarla se usó la siguiente fórmula, expresada en $J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$:

$$A = C \cdot EA$$

donde C es la energía consumida y EA es la eficiencia de asimilación.

VII.11. Balance energético

El balance energético o potencial de crecimiento del organismo, representa la ganancia de energía la cual es transformada en crecimiento y producción de gametos. El balance energético es expresado en $J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ y fue calculado mediante la siguiente fórmula (Winberg, 1960):

$$P = A - (R + U)$$

donde A es la energía absorbida, R es la energía perdida por el proceso de respiración y U la energía perdida por la excreción amoniacal.

VII.12. Análisis estadístico

Los datos de las tasa de clarificación, tasa de filtración, consumo de oxígeno y excreción amoniacal fueron sometidas a pruebas de normalidad de Lilliefors y homoscedasticidad de Bartlett, para corroborar que los datos cumplieran con dichas propiedades. Se utilizó un análisis de varianza anidado para establecer la existencia o no de diferencias entre las cuatro especies de microalgas y entre las estrategias de suministro de alimento (fresca y criopreservada). Se utilizó una prueba de Tukey para comparar y clasificar las medias.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

VIII.1. Tasa de clarificación.

Dosinia ponderosa registró la tasa de clarificación más alta cuando fue alimentada con la microalga *Nannochloropsis oculata* de cultivos en fresco, con un valor de $1.120 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, mientras que el valor más bajo observado lo obtuvo con la dieta a base de *Tetraselmis sp.* criopreservada, con un valor de $0.388 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (Tabla 1).

Al comparar la tasa de clarificación de *D. ponderosa* usando las microalgas en fresco o criopreservadas, para todas las especies se observó un mayor valor al usarlas en fresco, sin embargo solo en el caso de *Tetraselmis sp.* las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) ($0.914 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para el alimento fresco vs. $0.388 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para el criopreservado). Esto permite sugerir que con excepción de *Tetraselmis sp.*, es factible utilizar las microalgas tanto frescas o criopreservadas, para alimentar a *D. ponderosa* sin afectar su fisiología alimentaria ni su balance energético. La disminución del 23, 30 y 17% en las tasa de clarificación utilizando las dietas criopreservadas de *Chaetoceros sp.*, *Isochrysis sp.* y *Nannochloropsis sp.* respectivamente, y del 58%, en el caso de *Tetraselmis sp.*, pudiera estar relacionada al menor tamaño de partículas debido al proceso de conservación utilizado, lo cual podría haber afectado la eficiencia de retención de las células.

Por otro lado, considerando las especies de microalgas utilizadas, fue evidente que el uso de *Nannochloropsis sp.* (fresca o criopreservada) y *Tetraselmis sp.* (fresca), produjeron las mayores tasa de clarificación de *D. ponderosa*, con valores promedio entre 0.933 y $1.120 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ llegando a ser hasta un 50 % más alta que el resto de las dietas suministradas. Los valores más bajos observados fueron para *Tetraselmis sp.* ($0.388 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) para el caso de dietas criopreservadas. Gosling *et al* (2004) reportaron que los factores que afectan las tasas de clarificación y filtración, son la cantidad de alimento, temperatura, época del año, madurez y calidad del alimento; por lo que se puede concluir que el proceso de criopreservación puede

afectar la tasa de filtración, ya que la calidad nutricional de las algas criopreservadas es inferior a la de las algas en fresco (Paz, 2014). Babarro *et al.* (2001) reportaron variaciones significativas en cuanto a la composición de lípidos comparando microalgas frescas con criopreservadas, aunque no observaron diferencias en cuanto a la composición bioquímica en el contenido de carbohidratos y proteínas. En nuestro estudio no se realizó un análisis de la calidad de la microalgas utilizadas, por lo que no se puede concluir nada al respecto, no obstante fueron bien aceptadas como alimento por la almeja.

El tamaño de partículas de las microalgas criopreservadas, fue en algunos casos menor, de acuerdo a observaciones al microscopio, que el de la misma especie en fresco, lo cual pudo afectar las tasas de clarificación y filtración. Shumway *et al.* (1987) determinaron que en el caso de las escalopas, partículas de más de 7 mm no están disponibles como fuente de alimento. En cuanto a la palatabilidad de las partículas, Wards *et al.* (1992) demostraron que la estimulación química y la concentración del alimento suministrado afectan las tasas de clarificación y filtración; para el caso de las microalgas criopreservadas utilizadas en este trabajo, es probable que este método de conservación disminuya en algún grado la atractibilidad de las células para ser consumidas por la almeja.

Comparando las tasas de clarificación obtenidas en esta investigación, con un estudio realizado por Gutiérrez (2015) con la almeja *Dosinia ponderosa* provenientes de una área impactada y otra no impactada, y alimentada con *Chaetoceros* a diferentes temperaturas, se encontraron tasas de clarificación de $0.323 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para áreas no impactada, las cuales, son menores a las que registramos para todas las especies evaluadas. Ramos-Corella *et al.* (2014), encontraron valores de clarificación para la misma especie de bivalvo de $1.201 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ en un área no impactada, siendo en este caso, un valor similar a los más altos observados en esta investigación. Enríquez *et al.* (2012), encontraron un valor promedio de $0.363 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para *Crassostrea corteziensis* alimentadas con *Chaetoceros mulleri* a 23°C en salinidades de 25 a 40 psu, que es un valor más bajo comparado con el que se obtuvieron en el presente estudio para todas las microalgas y bajo las mismas condiciones. Los mismos autores registran que el promedio más alto de clarificación fue de $1.232 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ a temperaturas de 32°C para *C. corteziensis*, siendo similar a los registrados en nuestra investigación y demostrando la

importancia de hacer estudios a diferentes temperaturas. Oyarzún *et al.* (2013) trabajaron con *Mytilus chilensis* y *Mytilus galloprovincialis* alimentadas con dietas de *IsochrYSIS galbana*, cuyas tasas de clarificación (de 1.13 y 0.78 L·h⁻¹ respectivamente) fueron mayores a los obtenidos para *D. ponderosa* en nuestro estudio, debido a la diferencia de los organismos utilizados.

Nieves *et al.* (2013) investigaron el efecto de la temperatura y la concentración de alimento para *Atrina tuberculosa* y demostraron que la clarificación fue igual, independientemente de la cantidad de alimento suministrado a temperatura baja (17°C) en comparación con cultivos a temperaturas elevadas (20 a 28°C), en donde fue más alta la tasa de clarificación a mayor concentración de alimento. A temperaturas de 22°C reportaron valores de 0.281 L·h⁻¹·g⁻¹, los cuales aumentaron significativamente hasta 1.394 L·h⁻¹·g⁻¹ usando concentraciones mayores de alimento. Los valores obtenidos para *Dosinia ponderosa* fueron mayores a los reportados para *Atrina tuberculosa* a 22°C con concentraciones similares de alimento, lo que sugiere una mayor velocidad de clarificación para *D. ponderosa*.

Tabla 1. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de clarificación (L·h⁻¹·g⁻¹) y la tasa de filtración (mg·h⁻¹·g⁻¹) de *Dosinia ponderosa*, alimentada con diferentes dietas de microalgas frescas y criopreservadas.

	Tasa de clarificación (L·h ⁻¹ ·g ⁻¹)	Tasa de filtración (mg·h ⁻¹ ·g ⁻¹)
<i>Chaetoceros</i> sp. fresco	0.528 ± 0.029 ab	3.125 ± 1.433 b
<i>Chaetoceros</i> sp. criopreservada	0.403 ± 0.052 ab	2.023 ± 0.655 ab
<i>IsochrYSIS</i> sp. Fresco	0.681 ± 0.089 bc	0.967 ± 0.372 a
<i>IsochrYSIS</i> sp. criopreservada	0.474 ± 0.126 ab	0.580 ± 0.215 a
<i>Tetraselmis</i> sp. Fresco	0.914 ± 0.299 cd	7.345 ± 1.176 c
<i>Tetraselmis</i> sp. Criopreservado	0.387 ± 0.387 a	1.960 ± 1.180 ab
<i>Nannochloropsis</i> sp. Fresco	1.120 ± 0.231 d	0.972 ± 0.449 a
<i>Nannochloropsis</i> sp. Criopreservado	0.933 ± 0.091 cd	1.381 ± 0.343 a

Letras iguales en las filas indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (p>0.05).

VIII.2. Tasa de filtración.

El promedio más alto de la tasa de filtración que se registró fue para las almejas alimentadas con *Tetraselmis* sp. en fresco, con un valor de $7.345 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, mientras que el valor más bajo lo presentaron aquellas alimentadas con *Isochrysis* sp. criopreservada con un valor de $0.580 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (Tabla 1).

Al comparar la tasa de filtración para cada una de las especies de microalgas en general no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$), independientemente de la forma de suministro (fresca o criopreservada); a excepción de *Tetraselmis* sp., para lo cual se observó una disminución en la dieta criopreservada del 73.34% respecto al tratamiento fresco (fresco: $7.345 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ y criopreservada: $1.960 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). El valor más alto entre las dietas frescas suministradas se obtuvo con *Tetraselmis* sp., mientras que el valor más alto para dietas criopreservadas fue con *Chaetoceros* sp. ($2.023 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Los valores más bajos observados para esta tasa fueron de ($0.967 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) cuando se suministró *Isochrysis* sp. fresca y de $0.580 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para la misma especie pero criopreservada.

Es evidente que la especie de microalga que es mayormente filtrada por la almeja reina es *Tetraselmis* sp., lo cual es debido posiblemente al tamaño celular y la palatabilidad de este organismos fitoplanctónico.

Respecto a la tasa de filtración de la misma especie, Gutiérrez (2015) reportó valores de $3.192 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para organismos de áreas no impactadas y $20.874 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para aquellos de áreas impactadas a 21°C para el segundo caso, los valores fueron mucho mayores a los registrados en nuestro estudio, esto puede deberse a las condiciones de estrés a las que se sometió al organismo.

Enriquez *et al.* (2012), encontraron un valor promedio de $9.296 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ en la tasa de filtración del ostión *C. corteziensis* alimentado con *Chaetoceros muelleri* a 23°C en salinidades de 25 a 40 PSU, siendo valores más altos que los encontrados para *D. ponderosa* en el presente estudio. Esto demuestra las amplias diferencias que pueden presentar las diversas especies de moluscos bivalvos, independientemente de su tamaño, dado que los valores están estandarizados. Nieves *et al.* (2013) experimentando con *Atrina tuberculosa*,

reportaron valores de 0.449 mg.h^{-1} en condiciones iguales a las utilizadas para *Dosinia ponderosa*, los cuales aumentaron significativamente a 1.709 mg.h^{-1} a concentraciones mayores de alimento (1.195 mg.h^{-1}) y disminuyendo de nuevo a concentraciones todavía superiores. Los valores obtenidos para *Dosinia ponderosa* fueron mayores a los reportados por Nieves, lo cual puede ser debido, aparte de la diferencia de especies, a la cantidad de alimento suministrado.

VIII.3. Eficiencia de asimilación

En lo que respecta a la eficiencia de asimilación, el promedio más alto que se registró entre las cuatro dietas de microalgas fue con *Tetraselmis* sp. tanto fresca como criopreservada, con un 80.92% y 85.553%, respectivamente; mientras que los valores más bajos se registraron con las dietas de *Isochrysis* sp. y *Nannochloropsis* sp. tanto en fresco como criopreservadas, con valores entre 21 y 35%, sin diferencias significativas entre ellos ($p < 0.05$) (Tabla 2).

Al comparar entre la forma de suministro de alimento (fresco y criopreservado) no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) comparando la misma especie de microalga. En general, la criopreservación aumentó la eficiencia de asimilación de las microalgas entre un 5 % y 56%, sólo en el caso de *Chaetoceros* sp. se vio una disminución del 3.6% en la eficiencia de asimilación. Estos resultados sugieren que en la mayoría de los casos, se pueden utilizar microalgas criopreservadas sin afectar la eficiencia de asimilación por parte de la almeja reina.

La eficiencia de asimilación varió significativamente entre especies. *Tetraselmis* sp. tuvo una mayor eficiencia que el resto de las microalgas siendo significativamente diferente, poco más del doble que *Isochrysis* sp. y casi 1.2 veces más que *Chaetoceros* sp.; tanto en fresco como criopreservada.

Nieves *et al.* (2013) reportaron para *Atrina tuberculosa*, valores de eficiencia de asimilación hasta de un 55.76% con dietas de *Isochrysis* sp. a temperatura de 17°C , estos resultados fueron mayores a los obtenidos en el presente estudio con las dietas de *Isochrysis* sp. y *Nannochloropsis* sp.; sin embargo menores a los obtenidos con dietas de *Chaetoceros* sp. y *Tetraselmis* sp. En el caso de los mejillones *Mytilus chilensis* y *Mytilus galloprovincialis*, Oyarzún *et al.* (2013) reportaron una eficiencia de absorción promedio del 70% cuando fueron

alimentados con *IsochrYSIS galbana*, lo que representa el doble de la eficiencia obtenida en el presente estudio con la misma microalga tanto fresca como criopreservada, lo que indica que *Mytilus* sp. aprovecha de mejor manera que *Dosinia ponderosa*, la cual presenta valores mayores del 50% en especies de *Chaetoceros* sp. y *Tetraselmis* sp. Al usar *IsochrYSIS* sp. para alimentar a la almeja *Ruditapes philippinarum*, se encontró una eficiencia dos veces mayor que la observada para *D. ponderosa* alimentada con la misma microalga. Velasco *et al.* (2003) reportaron eficiencias de 50.67% para *Mulinia edulis* y 53.77% para *Mytilus chilensis* alimentadas con *IsochrYSIS galbana*, siendo estos valores mayores que los registrados para *D. ponderosa* en este trabajo utilizando la misma especie de microalga, así como *Nannochloropsis* sp. en ambas estrategias alimentarias. Estas diferencias fueron debidas a la diferente eficiencia de digestibilidad que presentan los organismos.

Guzmán *et al.* (2013) investigando como afectan a *Crassostrea corteziensis* diferentes temperaturas y salinidades, a niveles similares a los usados en este estudio, reportaron eficiencias de asimilación aproximadas del 60 % utilizando como alimento *Chaetoceros* sp. Este resultado es similar al encontrado en este estudio para *Dosinia ponderosa* en las mismas condiciones de temperatura, concentración de alimento y salinidad, lo cual puede deberse a las mismas condiciones de laboratorio, aunado a la diferencia de especie de bivalvo utilizado. Por lo que es recomendable la investigación de cómo afecta factores como la salinidad, temperatura, concentración de alimento, época y estado de maduración al molusco *Dosinia ponderosa*.

La mayor eficiencia de asimilación registrada para *Tetraselmis* sp. puede atribuirse a una mejor digestibilidad que las otras dietas, lo cual debe corroborarse con estudios específicos. Sin embargo, altas eficiencias de asimilación no indican necesariamente mayor capacidad de crecimiento en bivalvos o el valor nutrimental de las microalgas suministradas (Peirson, 1983). Bajas eficiencias de asimilación son generalmente atribuidas a la poca capacidad del organismo de digerir las paredes celulares que poseen algunas microalgas (Babinchak and Ukeles, 1979); sin embargo, en este estudio, se presentan eficiencias mayores en *Chaetoceros* sp. en comparación de *IsochrYSIS* sp. y *Nannochloropsis* sp., por lo que en este caso, estas bajas eficiencias se les pueden atribuir mayormente al tamaño celular de las

microalgas suministradas, pudiendo ser las branquias de *Dosinia ponderosa* especializadas para un tamaño de partícula mayor de 5 μm . Las bajas eficiencias de asimilación también se pueden explicar debido a la saturación de los túbulos de la glándula digestiva, provocando que la mayoría del alimento pasen directamente desde el estómago hasta el intestino, siendo absorbido de manera ineficiente (Thompson and Bayne, 1972), sin embargo esto es poco probable, ya que la cantidad de células ofrecidas no pasaba la concentración del umbral para la producción de pseudoheces.

Tabla 2. Valores promedio y desviación estándar de la Eficiencia de Asimilación de *Dosinia ponderosa* alimentada con diferentes dietas de microalgas frescas y criopreservadas.

	Eficiencia de Asimilación (%)
<i>Chaetoceros</i> sp. fresco	66.077 \pm 12.251 bc
<i>Chaetoceros</i> sp. criopreservada	63.697 \pm 7.041 b
<i>Isochrysis</i> sp. fresco	21.137 \pm 8.233 a
<i>Isochrysis</i> sp. criopreservada	33.259 \pm 12.112 a
<i>Tetraselmis</i> sp. fresco	80.920 \pm 6.438 cd
<i>Tetraselmis</i> sp. criopreservado	85.533 \pm 0.840 d
<i>Nannochloropsis</i> sp. Fresco	29.100 \pm 7.316 a
<i>Nannochloropsis</i> sp. criopreservado	34.600 \pm 9.431 a

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).

VIII.4. Tasa de respiración

El promedio más alto de la tasa de respiración se registró para *Isochrysis* sp. en fresco con un valor de $0.287 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, mientras que el valor más bajo se registró con *Chaetoceros* sp. en fresco, con valor de $0.128 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. (Tabla 3).

Al comparar la forma de suministro de cada una de las cuatro especies de microalgas sobre la tasa de respiración de la almeja, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$);

sin embargo, en el caso de *Nannocloropsis* sp. se encontró una tendencia a ser mayor cuando se suministra en fresco ($0.255 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) que criopreservada ($0.194 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), disminuyendo la tasa de consumo de oxígeno un 24%. En el caso de las dietas de *Chaetoceros* sp., se ve un aumento del 25% cuando se suministra criopreservada respecto a fresca, sin embargo, igualmente no se observan diferencias significativas. Estos resultados indican que no existe un efecto muy marcado en la tasa de respiración de *D. ponderosa* con respecto a la especie de microalga ni a la estrategia de alimentación. Gutiérrez (2015) estudió las tasas de respiración de *D. ponderosa* y registró valores de $0.060 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para organismos de áreas no impactadas y $0.164 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para aquellos de área impactadas a 21°C , estos resultados son ligeramente menores a los encontrados en el presente estudio para *Chaetoceros* sp. Sin embargo, Ramos-Corella *et al.* (2014) reportaron para la misma especie de bivalvo, valores de $1.161 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para áreas impactadas, $1.28 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para no impactadas, los cuales fueron mayores que los obtenidos en el actual trabajo con todas las dietas suministradas. Lo anterior pudiera ser debido a la diferencia de la zona de muestreo, así como a las condiciones de estrés a que pudieron haber sido expuestas. Oyarzún *et al.* (2013) reportan un promedio de $0.067 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ y $0.027 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ para *Mytilus chilensis* y *Mytilus galloprovincialis* respectivamente siendo valores mayores a los reportados en este trabajo para *Dosinia ponderosa*, lo cual nuevamente comprueba que hay marcadas diferencias entre especies de bivalvos, respecto a sus tasas respiratorias.

Por medio del consumo de oxígeno se puede explicar la capacidad de esta especie para aclimatar su metabolismo a las diferentes dietas y temperaturas. Una tasa alta de consumo de oxígeno puede estar relacionada con la disminución o cese de la actividad de alimentación o una diferente estrategia de alimentación (Delgado *et al.*, 2002). En este trabajo se reflejó lo anterior en las bajas tasas de filtración y altos valores en las tasas de consumo de oxígeno en ambas dietas de *Isochrysis* sp. en comparación a las demás dietas suministradas.

VIII.5. Tasa de excreción amoniacal

El promedio más alto de la tasa de excreción amoniacal fue registrado para las almejas alimentadas con *Chaetoceros* sp. fresca y criopreservada, con valores de $0.030 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ y $0.033 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivamente; mientras que el valor más bajos para las alimentadas con

Tetraselmis sp. con un valor de $0.0083 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$; y *Nannochloropsis* sp. criopreservada, con un valor de $0.01068 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (Tabla 3).

La tasa de excreción amoniaca no observó diferencias significativas entre las dietas frescas y criopreservadas. En general se vio un ligero aumento al usar microalgas criopreservadas, y en el caso de *Tetraselmis* sp. este aumento fue del 62.5%, sin embargo esas diferencias no fueron significativas, por lo que se puede concluir que la forma de suministro de las microalgas, no es considerada una condición de estrés o no afecta en la digestibilidad de las microalgas, dado que esta se relaciona directamente con la excreción amoniaca.

Gutiérrez (2015) reportó valores de $0.018 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para almejas de la misma especie provenientes de una zona no impactada y $0.028 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para aquellas de una zona impactada a 21°C , siendo valores mayores a los obtenidos en este estudio, excepto para organismos con dietas de *Chaetoceros* sp., lo cual pudiera ser indicativo de una condición de estrés en los organismos provenientes de la zona impactada. Ramos-Corella *et al.* (2014) se reportaron valores de $0.015 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para almejas de un área impactada y $0.033 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ en organismos de un área no impactada, siendo los valores del área no impactada similares a los obtenidos en este trabajo cuando se usó *Chaetoceros* sp. como alimento.

La pérdida de energía asociadas con la excreción de amonio, pueden representar un bajo porcentaje del total de la energía absorbida (1-10% en bivalvos mitílidos). En este estudio se registró de un 1 a un 9.5 % de la energía perdida por la excreción.

La pérdida de energía por la excreción amoniaca puede representar un componente significativo del total de la energía absorbida, especialmente cuando estamos en presencia de procesos reproductivos o deficiencias dietéticas. Esto es debido a que el catabolismo de las proteínas lleva a la formación de amonio, compuesto que representa el 60-90% del total de nitrógeno excretado en numerosas especies de bivalvos (Nieves *et al.*, 2013).

Tabla 3. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de respiración ($\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) y la tasa de excreción amoniacal ($\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), así como las pérdidas de energía en dichos procesos ($\text{J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), en *Dosinia ponderosa* bajo diferentes dietas de microalgas frescas y criopreservadas.

	Tasa de respiración	Energía perdida en la respiración	Tasa de excreción amoniacal	Energía perdida en el proceso de excreción amoniacal
	($\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)	($\text{J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)	($\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)	($\text{J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)
<i>Chaetoceros</i> sp. Fresco	0.127 ± 0.029^a	1.796 ± 0.418^a	0.030 ± 0.0001^c	0.766 ± 0.002^c
<i>Chaetoceros</i> sp. criopreservada	0.160 ± 0.048^a	2.261 ± 0.684^a	0.033 ± 0.008^c	0.834 ± 0.212^c
<i>Isochrysis</i> sp. fresco	0.287 ± 0.026^c	$4.039 \pm 0,370^c$	0.014 ± 0.001^{ab}	0.371 ± 0.015^{ab}
<i>Isochrysis</i> sp. criopreservada	0.274 ± 0.064^c	$3.865 \pm 0,906^c$	0.016 ± 0.003^{ab}	0.420 ± 0.099^{ab}
<i>Tetraselmis</i> sp. Fresco	0.186 ± 0.013^{ab}	2.615 ± 0.185^{ab}	0.008 ± 0.003^a	0.206 ± 0.075^a
<i>Tetraselmis</i> sp. Criopreservado	0.195 ± 0.013^{ab}	2.743 ± 0.192^{ab}	0.013 ± 0.003^{ab}	0.325 ± 0.079^{ab}
<i>Nannochloropsis</i> sp. Fresco	0.254 ± 0.055^{bc}	3.583 ± 0.783^{bc}	0.015 ± 0.001^{ab}	0.372 ± 0.021^{ab}
<i>Nannochloropsis</i> sp. criopreservado	0.193 ± 0.024^{ab}	2.723 ± 0.349^{ab}	0.011 ± 0.001^{ab}	0.265 ± 0.039^{ab}

Letras iguales en las filas indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).

VIII.6. Tasa de energía consumida y de energía absorbida.

En la Tabla 4 se presentan los valores promedio de la energía consumida y la energía absorbida de *Dosinia ponderosa* alimentadas con las cuatro microalgas en fresco y criopresevadas, con valores expresados en $\text{J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. El promedio más alto de energía consumida y absorbida fue para las almejas alimentadas con *Tetraselmis* sp. en fresco con un valor de $131.475 \text{ J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ y $105.414 \text{ J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. Se observó una disminución

del 73.32% en la energía consumida, mientras que un 71.5% en la energía absorbida respecto a las criopreservadas, en este caso se observan diferencias estadísticas las cuales eran de esperarse por la disminución de las tasas de clarificación en las dietas de *Tetraselmis* sp., las cuales reflejan la cantidad de energía suministrada como alimento. Los valores más bajos se registraron en los organismos alimentados con *Isochrysis* sp. criopreservada, de $12.184 \text{ J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ y de $4.403 \text{ J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, observándose para ambos casos un aumento de la energía consumida y absorbida con las dietas criopreservadas respecto a las frescas; sin embargo, esas diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

Al comparar entre especies, la energía consumida. *D. ponderosa* alimentada con *Tetraselmis* sp. en fresco, registró los mayores valores tanto de energía consumida como de energía absorbida ($131.475 \text{ J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ y $105.414 \text{ J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Estos valores fueron significativamente diferentes al resto de los tratamientos ($p < 0.05$). Cuando se suministró *Isochrysis* sp. criopreservada los valores promedios de energía consumida y absorbida de la almeja fueron los más bajos (12.184 ± 4.514 y $4.403 \pm 3.236 \text{ J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivamente), resultados significativamente más bajos que los obtenidos cuando se alimentó con *Tetraselmis* sp. y *Chaetoceros* sp. tanto fresca como criopreservada. Los demás tratamientos mostraron valores intermedios entre las especies pero sin ser significativamente diferentes.

La especie *Tetraselmis* sp. fue con la que se encontró la respuesta más favorable entre la cantidad de energía consumida y la absorbida, por lo que parece ser la más adecuada para la alimentación de *D. Ponderosa*.

Tabla 4. Valores promedio y desviación estándar de la energía consumida ($J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) y la energía absorbida ($J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) de *Dosinia ponderosa* bajo diferentes dietas de microalgas frescas y criopreservadas.

	Energía consumida ($J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$)	Energía absorbida ($J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$)
<i>Chaetoceros</i> sp. fresco	59.976 ± 16.190 ^c	35.130 ± 7.419 ^c
<i>Chaetoceros</i> sp. criopreservada	49.977 ± 16.190 ^{bc}	32.283 ± 12.999 ^c
<i>Isochrysis</i> sp. fresco	20.312 ± 7.802 ^{ab}	3.896 ± 0.981 ^a
<i>Isochrysis</i> sp. criopreservada	12.184 ± 4.514 ^a	4.403 ± 3.236 ^a
<i>Tetraselmis</i> sp. fresco	131.475 ± 21.048 ^d	105.414 ± 27.798 ^d
<i>Tetraselmis</i> sp. criopreservado	35.077 ± 21.114 ^{abc}	30.074 ± 18.439 ^{bc}
<i>Nannochloropsis</i> sp. fresco	24.007 ± 11.100 ^{ab}	7.201 ± 4.071 ^{ab}
<i>Nannochloropsis</i> sp. criopreservado	34.120 ± 8.463 ^{abc}	12.143 ± 5.641 ^{abc}

Letras iguales en las filas indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).

VIII.7. Balance energético.

Las evaluaciones sobre el balance energético en animales acuáticos han demostrado ser de gran utilidad, ya que a través de estas, es posible conocer la forma en que los organismos usan la energía y la convierten en biomasa, gametos o la utilizan para compensar las variaciones ambientales, lo que les permite mantener la homeostasis (Nieves *et al.* 2009). Este representa una respuesta integrada de los procesos fisiológicos básicos de un organismo, relacionados con la adquisición y utilización de la energía. Respecto al crecimiento potencial, valores positivos expresan que existe energía disponible para crecimiento y producción de gametos, mientras que valores negativos indican que la energía utilizada en respiración y excreción es mayor que la energía absorbida por el organismo. Por lo que es posible estimar la energía potencial para el crecimiento (Maeda *et al.* 2009).

En la Tabla 5 se encuentran los valores promedio del balance energético de *Dosinia ponderosa* alimentada con las cuatro microalgas en fresco y criopreservado, con valores expresados en $J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$.

El promedio más alto del balance energético que se registró fue para la dieta suministrada de *Tetraselmis* sp. en fresco con un valor de $102.653 J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$, mientras que el valor más bajo observado se presentó con la dieta de *Isochrysis* fresca, con un valor de $-0.515 J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$.

No se observaron diferencias en los valores de la energía de crecimiento entre los tratamientos dentro de las especies de *Chaetoceros* sp., *Isochrysis* sp. y *Nannochloropsis* sp.; sin embargo, para *Tetraselmis* sp. se registró el valor promedio más alto con el alimento fresco ($102.653 J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) en comparación del criopreservado ($27.005 J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) con una disminución del 73.69%, que es estadísticamente significativa.

Para las microalgas en fresco, el valor más alto registrado sobre el balance energético lo presentaron las almejas alimentadas con *Tetraselmis* sp., mientras que el valor más alto fue registrado al alimentarlas con *Chaetoceros* sp. ($29.119 J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$), con una disminución del 11% respecto a las dietas frescas de la misma especie sin ser esta diferencia significativa. Los valores más bajos fueron encontrados en las almejas alimentadas con *Isochrysis* sp. en fresco, con un valor de $-0.515 J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$, y criopreservadas con $0.117 J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$, siendo evidente el aumento del balance energético al usar microalgas criopreservadas, sin embargo la diferencia no fue significativa.

Oyarzún *et al.* (2013) reporta un promedio de $13.26 J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ y $8.96 J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ para *Mytilus chilensis* y *Mytilus galloprovincialis* respectivamente. Kyung *et al.* (2008) reportó que para almejas *Ruditapes philippinarum* la energía de crecimiento aumenta al aumentar la temperatura, de $74.776 J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ a $5^{\circ}C$ a $270.04 J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ a $20^{\circ}C$. Velasco *et al.* (2003) reportaron balances para *M. edulis* alrededor de $4.86 J \cdot h^{-1}$ y $120.39 J \cdot h^{-1}$ para *M. chilensis*. En comparación con este trabajo, los resultados reportados por los autores antes mencionados fueron mayores que los de *Dosinia ponderosa* alimentadas con *Isochrysis* sp. y

Nannochloropsis sp. tanto en fresco como criopreservado, pero menores que los obtenidos con *Chaetoceros* sp. y *Tetraselmis* sp.

Tabla 5. Valores promedio y desviación estándar del Balance Energético ($J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) de *Dosinia ponderosa* bajo diferentes dietas de microalgas frescas y criopreservadas.

	Balance energético ($J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$)
<i>Chaetoceros</i> sp. fresco	32.800 ± 7.288^c
<i>Chaetoceros</i> sp. criopreservada	29.187 ± 12.942^{bc}
<i>Isochrysis</i> sp. fresco	-0.514 ± 1.060^a
<i>Isochrysis</i> sp. Criopreservada	$0.116 \pm 3.166a$
<i>Tetraselmis</i> sp. Fresco	102.652 ± 28.112^d
<i>Tetraselmis</i> sp. Criopreservado	27.005 ± 18.178^{bc}
<i>Nannochloropsis</i> sp. Fresco	5.080 ± 2.214^a
<i>Nannochloropsis</i> sp. Criopreservado	9.154 ± 5.742^{ab}

Letras iguales en las filas indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).

X. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar experimentos sobre cómo puede afectar la maduración gonadal de *Dosinia ponderosa* el uso de microalgas criopreservadas como alimento.
- Analizar la calidad nutrimental de las microalgas criopreservadas en comparación a las frescas.
- En la realización de experimentos sobre la fisiología alimentaria, tomar en cuenta no solo el número de células suministradas, sino también la biomasa ofrecida como alimento para tener un mejor punto de comparación.

XI. LITERATURA CITADA

- Alabi A., E. Bibeau, M. Tampier. 2009. Microalgae technologies & processes for biofuels-bioenergy production in British Columbia: Current technology, suitability & barriers to implementation. Final report. British Columbia Innovation Council.
- Ávila-Portillo, L., J.C. Madero-, C. López, M. León, L. Acosta, C. Gómez, L. Delgado, J. Lozano y M. Reguero. 2006. Fundamentos de criopreservación. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología, 57(4), 291 – 300.
- Arreola, H. J. F. 1997. Aspectos reproductivos de *Dosinia ponderosa*, Gray 1983 (Bivalvia: Veneridae) en punta de arena, Bahía Concepción B.C.S. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. 85p.
- Babarro, J. M., U. Labarta. 2001. Influence of preservation and quantification of protein from marine macro-and microalgae. Journal of Applied Phycology, 17 (5), 447-460.
- Bacon, G. S., B.A. Mac Donald, J.E. Ward. 1998. Physiological responses of infaunal (*Mya arenaria*) and epifaunal (*Placopecten magellanicus*) bivalves to variations in the concentration and quality of suspended particles. I. Feeding activity and selection. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 219:105-125.
- Barnes, P. 2006. Shellfish Culture and Particulate Matter Production and Cycling. A Literature Review.
- Baynes, B. L. 1976. Marine Mussels: Their Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge U.K.
- Berg J.A., R. I. E. Newell. 1986. Temporal and spatial variations in the composition of seston available to the suspension feeder *Crassostrea virginica*. Estuarine Coast and Shelf Science. 23: 375-386.
- Borowitzka, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of Biotechnology, vol. 70.

- Brown, R., S. M. Barret, J. K. Volkman, S. P. Nearhos, J. Nell, G. L. Allan. 1996. Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture. *Aquaculture*, vol. 143.
- Cardozo, K., T. Guaranti, M. Barros, V. Falcao, A. Tonoon, N. López, S. Campos, M. Torres, A. Souza, P. Colepicolo, E. Pinto. 2006. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology & pharmacology*. 146(1) 60-78.
- Conover, R.J. 1966. Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnology and Oceanography* 11, 338– 345.
- CONASPESCA. 2014. Anuario estadístico de pesca. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Coutteau, P., P. Sorgeloos. 1992 The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *Journal of Shellfish Research*, vol.11.
- Crisp, D.J., 1971. Energy flow measurements. In: Holme, N.A., McIntyre, A.D. (Eds.), *Methods of the Study of Marine Benthos*. IBP Handbook, vol. 16. Blackwell, Oxford.
- Day, J., J. Brand. 2005. Cryopreservation methods for maintaining cultures. *Algal Culturing Techniques*. Academic Press, New York, 165 – 187.
- Delgado M., C. A. Pérez, M. Albentosa. 2002. Balance energético en la almeja *Ruditapes decussatus* 2004. *Boletín. Instituto Español de Oceanografía* 18 (1-4): 301-306.
- Delgado, M., A. Pérez-Camacho, M. Albentosa,. 2004. Balance energético en la almeja *Ruditapes decussatus*. *Boletín. Instituto Español de Oceanografía* 18 (1-4): 301-306.
- Dhont, G. van Stappen. 2003. *Live Feeds in Marine Aquaculture*, Blackwell Science.
- Epifanio C. E. 1979. Growth in bivalve molluscs: nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.). *Aquaculture*, vol. 18.
- Enriquez-Ocaña L. F., M. Nieves-Soto, P. Piña-Valdez, L. R. Martínez-Còrdova, M. Medina-Jasso. 2012. Evaluation of the combined effect of temperature and salinity on the filtration, clearance rate and assimilation efficiency of the mangrove oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). *Arch. Biol. Sci.*, 64, 479-488.

- Fabregas, J., C. Herrero, 1990. Vitamin content of four marine microalgae. Potential use as source of vitamins in nutrition. *Journal of industrial microbiology*, 5(4), 259 – 263.
- FAO. 1995. Guía FAO para la identificación de Especie para los Fines de la Pesca p -646. En Fisher, W., Krupp F., Schneider W., Sommer C., Carpenter K. E., Niem V. H., Pacífico centro.oriental. Volumen I. Plantas e Invertebrados.
- Fariás, S. A. 2003. Biología y Ecología de los Moluscos. P 43-80. En: Cultivo de Moluscos. Fernández-Reiriz, M. J., U. Labarta, M. Albentosa, A. Pérez-Camacho. 1998. Effect of Microalgal Diets and Commercial Wheat germ Flours on the Lipid Profile of *Ruditapes decussatus* Spat. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 119, 369-377.
- Fernández-Reiriz, M. J., U. Labarta, M. Albentosa, A. Pérez-Camacho. 1998. Effect of Microalgal Diets and Commercial Wheat germ Flours on the Lipid Profile of *Ruditapes decussatus* Spat. *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiol.* 119, 369-377.
- Gosling E. 2003. Bivalve Molluscs. Biology, ecology and culture. Fishing News Books. Blackwell Science. Editorial Blackwell Publishing. Oxford. 435 pp.
- Gwo, J., J. Chiu, C. Chou, H.Cheng. 2005. Cryopreservation of a Marine Microalgae, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *Cryobiology*, 50(3), 338 – 343.
- Gutiérrez-Reyes, S. 2015. Efecto de la temperatura (°C) sobre la capacidad biofiltradora y balance energético de *Dosinia ponderosa* (Gray, 1838) de áreas impactadas y no impactadas por efluentes acuícolas. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Guzman-Agüero J, E., M. Nieves-Soto, M. A. Hurtado, P. Piña-Valdez, M.C. Garza-Aguirre. 2013. Feeding physiology and scope for growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) acclimated to different conditions of temperature and salinity. *Aquaculture International* 21:283–297.
- Heasman, M, J. Diemer, W. Conner, T. Sushames, L. Foulkes. 2000. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve mollusks. *Aquaculture Research*.31, 627 – 659.
- Helm, M.M., Bourne, N., 2004 b. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO Fish. Tech. Pap. 471, 176. Hendriks, I. E., L. A. Van Duren, M. J. Herman. 2003. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 296. 199-213.

- Ibarrola, I., X. Larretxea, E. Navarro, J. I. P. Iglesias, M. B. Urrutia. 2008. Effects of body-size and season on digestive organ size and the energy balance of cockles fed with a constant diet of phytoplankton. *Journal Comparative Physiology B* 178:501–514.
- Jo, Y., S. Kang, T. Seo, S. Choi, K. Kho, K. Kuwano, N. Saga, M. Kim, J. Shin. 2003. Cryopreservation of Sporothalli of the Genus *Porphyla* (*Bangiales*, *Rhodophyta*) from Korea. *Algae-Inchon*, 18(4), 321- 332.
- Jørgensen, C. B., 1990. Bivalve filter feeding: hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology. Olsen & Olsen.
- Knuckey, R.M., M. R. Brown, S. M. Barrett, G. M. Hallegraeff. 2002. Isolation of new nanoplanktonic diatom strains and their evaluation as diets for juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 211, 253–274.
- Kreeger A., C. J. Langdon. 1993. Effect of dietary protein content on growth of juvenile mussels, *Mytilus trossulus* (Gould 1850). *Biological Bulletin*, vol. 185.
- Kyung, N. H., S. Woo Lee, S. Young Wang. 2008. The effect of temperature on the energy budget of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture International*. 16:143–152
- López-Sánchez, J.A., 2003. Tasas de filtración y aclaramiento en la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) a dos tallas, en función de la temperatura y cantidad de alimento. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Lovatelli, A., A. Farías, I. Uriarte. 2007. FAO Fisheries Technical Paper 471. Food and Agriculture Organization of the United Nations Publishing, Rome, Italy.
- McLusky D.S. 1981. *The Estuarine Ecosystem*. Blackie, Glasgow.
- Nieves-Soto, M., L. F. Bückle-Ramirez, V. P. Piña-Valdez, M. A. Medina-Jasso, A. Miranda-Baeza, L. R. Martínez-Córdova, J. A. López. 2013. Combined effect of temperature and food concentration on the filtration and clarification rates and assimilation efficiency of *Atrina tuberculosa* Sowerby, 1835 (mollusca: bivalvia) under laboratory condition. *Archives Biological. Science Belgrade*, 65 (1), 99-106, 2013.
- Nieves-Soto, M., M. A. Medina, P. Piña-Valdez, S. Leal, J. A. López-Elías. 2009. Producción y calidad de *Chaetoceros mulleri* a diferentes concentraciones de nutrientes y densidades de inóculos. *Rev. Investigaciones Marinas*. 30(2) 123-133.

- Oyarzún, P. A., J. E. Toro, J. N. Navarro. 2013. Comparison of the physiological energetics between *Mytilus chilensis*, *Mytilus galloprovincialis* and their hybrids, under laboratory conditions *Aquaculture Research*, 2013, 44, 1805–1814
- Paz-Salcido D. A., 2014. Evaluación de la viabilidad y composición química de *Chaetoceros mulleri* criopreservada con glicerol y etanol a dos temperaturas. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Departamento de Investigaciones y Posgrado de Alimentos. Hermosillo, Sonora, México.
- Ponis, E., I. Probert, B. Véron, M. Mathieu, R. Robert. 2006. New microalgae for Pacific oyster *Crossostrea gigas* larvae. *Aquaculture* 253 618-627.
- Ramos-Corella, K., L. R. Martínez-Córdova, L. F. Enriquez-Ocaña, A. Miranda.Baeza, J. A. López-Eías. 2014. Bio-filtration capacity, oxygen consumption and ammonium excretion of *Dosinia ponderosa* and *Chione gnidia* (Veneroidea: Veneridae) from areas impacted and non-impacted by shrimp aquaculture effluents. *Revista de Biología Tropical*, vol. 62, núm. 3, septiembre, 2014, pp. 969-976.
- Rhodes, L., J. Smith, R. Tervit, R. Roberts, J. Adamson, S. Adams, M. Decker. 2006. Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes *Bacillariophyceae*, *Chlorophyceae*, *Cyanophyceae*, *Dinophyceae*, *Haptophyceae*, *Prasinophyceae* and *Rinodophyceae*. *Cryobiology*, 52(1) 152 – 156.
- Shumway, S.E., R. Selvin, D. F. Schick. 1987. Food resources related to habitat in the scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791): a qualitative study. *Journal of Shellfish Research*, 6, 89–95.
- Singer, S. G. Nicholson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, 175(23), 720 – 731.
- Taylor R., R. L. Fletcher. 1999. Cryopreservation of eukaryotic algae - a review of methodologies. *Journal of Applied Phycology*, vol. 10.
- Tzovenis, I., G. Triantaphyllidis, X. Naihong, E. Chatzinikolaou, K. Papadopoulou, G. Xouri, T. Tafas. 2004. Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain. *Aquaculture*, 230 (1), 457–473.
- Velasco, L.A., J.M. Navarro. 2003. Energetic balance of infaunal (*Mulinia edulis* King, 831) and epifaunal (*Mytilus chilensis* Hupe', 1854) bivalves in response to wide variations in concentration and quality of seston *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 296 (2003) 79–92

- Villalobos, F. C., H. M. Zeran. 2012. Manual de operación y manejo. Manejo de Ostión. Centro de Ciencias de Sinaloa, 8 – 10.
- Ward, J.E., H. K. Cassell, B. A. MacDonald. 1992 Chemoreception in the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). I. Stimulatory effects of phytoplankton metabolites on clearance and ingestion rates. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology., **163**, 235–250.
- Widdows, J. 1985 Physiological procedures. In: The Effects of Stress and Pollutions on Marine Animals (ed. By B.L. Bayne). Praeger, New York, USA.
- Widdows, J. 1985. The effects of fluctuating and abrupt changes in salinity on the performance of *Mytilus edulis*. En: Gray, J.S., Christiansen, ME. (Eds.), Marine Biology of Polar Regions and effects of Stress on Marine Organism. Wiley-Interscience.
- Winter, JE. 1978. A review on the knowledge of suspension feeding in lamellibranchiate bivalves, with special reference to artificial aquaculture systems. Aquaculture 13(1): 1-33.
- Woods, E., J. Benson, Y. Agca, J. Critser. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. Cryobiology, 48(2), 146-156.

T-160205