

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA**

**Utilización de Carbón Orgánico Disuelto y Tasa Metabólica en
Postlarvas de Erizo Blanco *Lytechinus pictus* (Verrill),
(ECHINODERMATA: ECHINOIDEA)**

Tesis

**Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el
grado de DOCTOR EN CIENCIAS**

Presenta:

Alfredo Ernesto Salas Garza

Ensenada, Baja California, México, Enero de 2008

RESUMEN de la Tesis de **Alfredo Ernesto Salas Garza** presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** con orientación en **ACUICULTURA**. Ensenada, Baja California, México. Enero del 2009.

Utilización de Carbón Orgánico Disuelto y Tasa Metabólica en Postlarvas de Erizo Blanco *Lytechinus pictus* (Verrill), (ECHINODERMATA:ECHINOIDEA)

Aprobado por:

Dr. Fernando Díaz Herrera

Director de Tesis

Las postlarvas de erizo *Lytechinus pictus* requieren de 10 a 15 días para su metamorfosis, por lo que la falta de energía externa, durante este período puede ser causa de mortalidad en este estadio y estadios subsecuentes. Se evaluó el efecto de la biopelícula de la diatomea bentónica *Navicula incerta* y el carbón orgánico disuelto (COD) que producen estas, en el crecimiento y supervivencia de las postlarvas durante su metamorfosis. A partir de la metamorfosis 300 postlarvas (por recipiente) se expusieron a la biopelícula a partir de los días D1, D3 y D6 (tratamientos) con tres repeticiones y un testigo sin diatomeas. Se mantuvieron a las postlarvas con agua filtrada a 0.2 μm en recipientes de 3 L, todos con volumen de 500 ml y cambios de agua cada 24 horas durante 15 días. Se midieron al azar 30 postlarvas de cada recipiente y se contaron todos, los días 1, 3, 9 y 15 para evaluar crecimiento y supervivencia. En tres ocasiones se tomaron muestras de agua para cuantificar el COD del agua filtrada y en cada tratamiento después de permanecer el agua 24 horas en los recipientes. Se realizó un segundo experimento para evaluar si fue la presencia de diatomeas o el COD producido por estas, las que mejoraron el desarrollo de las postlarvas. Fueron cinco tratamientos (por triplicado), donde solo el control positivo (D) tenía biopelícula y el control negativo (C) agua filtrada a 1 μm , a los otros tres se empezó a suministrar agua de un cultivo de diatomeas *N. incerta* los días 1 (D1), 4 (D4) y 8 (D8). En el primer experimento el mayor crecimiento fue para D, con longitudes de 580 μm a 821 μm en 15 días y 41% de supervivencia y para el experimento 2 de 576 μm a 924 μm , con supervivencia de 78% con la presencia de diatomeas y valores casi iguales el COD agregado desde el primer día. Los valores más bajos de crecimiento y supervivencia de los erizos fueron siempre para los tratamientos con agua filtrada y con inóculos a los 6 días y suministro de agua con COD a los 8 días. El efecto en el mejor desarrollo de las postlarvas fue debido al COD producido por las diatomeas y no por su presencia. La concentración de COD en el cultivo de *N. incerta* en ocho días se incrementó de 140 $\mu\text{mol C L}^{-1}$ a 587 $\mu\text{mol C L}^{-1}$. Se realizaron 5 experimentos con agua filtrada, para la estimación de carbón, nitrógeno y peso seco desde larva competente y en diferentes días durante su metamorfosis, para estimar los cambios en la composición

carbón:nitrógeno (C:N). Se utilizaron tres cubetas, cada una con 1500 postlarvas y se determinó la relación C:N, con dos repeticiones. La relación, fue de una constante disminución debido a su continuo aporte energético durante la metamorfosis. Sin embargo, destaca el carbón (lípidos) como la más importante fuente de energía durante los primeros días de metamorfosis y el nitrógeno (proteínas) durante los últimos días. La tasa de consumo de oxígeno se incrementó hasta el 320 % durante los primeros 6 días de la metamorfosis, y se mantuvo por arriba de la tasa metabólica que tenía como larva competente. La tasa metabólica específica durante la metamorfosis, en promedio fue de $120 \pm 8 \text{ pmol O}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, que es menor a la reportada para larvas en crecimiento y alimentación de otros invertebrados marinos. El crecimiento en peso en un periodo de 8 días durante la metamorfosis fue de $4.7 \mu\text{g}$, lo cual equivale a una tasa diaria de $0.59 \mu\text{g día}^{-1}$ y durante 10 días, se consumieron un total de $668 \text{ mJoules h}^{-1}$. La presencia de diatomeas bentónicas en los recipientes de cultivo durante la metamorfosis de las postlarvas de erizo blanco, aportan energía en forma de COD que mejora su crecimiento, desarrollo y supervivencia, hasta juvenil.

Palabras clave; postlarvas, carbón orgánico disuelto, diatomeas bentónicas y metamorfosis.

ABSTRACT for the dissertation of **Alfredo Ernesto Salas Garza** presented as partial requirement to obtain the Doctor in Sciences degree with orientation in **AQUACULTURE**, Ensenada, Baja California, Mexico. Enero de 2008.

The used of dissolved organic carbon and the metabolic rate for the sea urchin postlarvae *Lytechinus pictus*

The effect of biofilms of the benthic diatom *Navicula incerta* and of the dissolved organic carbon (DOC) they produce was evaluate on the growth and survival of *Lytechinus pictus* (Verrill), postlarvae during metamorphosis. In each container, 300 postlarvae were expose to biofilms beginning on days 1, 3 and 6 of initiation of metamorphosis, using three replicates and a blank containing only filtered water. The experiments were run 15 and 18 days in 500-mL containers with daily water changes. We measured 30 postlarvae from each container and counted all organisms on days 1, 3, 9 and 15; DOC was quantifying on days 3, 6 and 9. A second experiment was conduct to evaluate whether it was the presence of diatoms or the DOC they produced that improved postlarval development. Five assays were done with three replicates treatment: a positive control with biofilms, a negative control with filtered water, and three treatments with DOC-enriched water from a *N. incerta* culture supplied on days 1, 4 and 8. In both experiments, postlarvae attained the largest size and highest survival in the treatments with the biofilm. The increase in postlarval size and survival was due to the DOC produced by the diatoms and not by their presence alone. In order to estimate the carbon:nitrogen composition (C:N) changes during different metamorphosis stages of white sea urchin competing larvae, five experiments of determination of carbon, nitrogen, and dry weight were done on filtrated water. Two buckets containing 1500 post larvae were tested by duplicate for C:N. Results showed a constant ratio decrease due to the energy consumption during metamorphosis. However, carbon (lipids) seems to be the most important source of energy during the first days of metamorphosis, and nitrogen (proteins) during the last days. The oxygen consumption rate increased up to 320% during the first 6 days of metamorphosis and remained above the metabolic rate value showed as competing larvae. The average specific metabolic rate during metamorphosis was $120 \pm 8 \text{ pmol O}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, which is lower to that reported for growing larvae and food for others marine invertebrate. The weight grow over a period of 8 days during the metamorphosis was $4.7 \mu\text{g}$, which is equivalent to a $0.59 \mu\text{g day}^{-1}$ rate. During 10 days, $668 \text{ mJoules h}^{-1}$ were consumed. The presence of benthic diatoms in culture jars during the white sea urchin post larvae metamorphosis, provide energy as DOC which improve grow, development and survival up to the juvenile stage.

Keywords: postlarvae, dissolved organic carbon, benthic diatoms, metamorphosis

DEDICATORIA

A mis hijos... Alfredo, Andrés y Natalia, estímulo y fuerza de mi superación, por su amor, apoyo, y comprensión... por el tiempo no compartido y sacrificios. GRACIAS.

A mis hermanos, Norma, Edmundo, Diana y Cecilia.. por su amor... por que han sido compañeros, consejeros, guías y amigos... los días de mi vida.

A mi Madre Guadalupe (†) y mi Padre Edmundo (†)... me dieron la vida, las herramientas para vivirla y disfrutarla inmensamente...

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a Griselda compañera en el trabajo y en la vida, por su incondicional apoyo, por TODO lo compartido...más allá de este estudio...

A Fernando Diaz... mi Director... por su sensibilidad, su decidido, firme y eficaz apoyo... principalmente en los momentos más difíciles. Por su orientación profesional, sus consejos y por su compañerismo. Por que fue Director, Colega, Compañero y Amigo. GRACIAS.

A cada uno de los miembros de mi comité.. Ana Dennise, Eugenio y Ernesto..por su apoyo, sus críticas y recomendaciones para la indudable mejora de este trabajo. Mi agradecimiento y respeto.

Por su profesionalismo, Institucionalidad y desinteresado apoyo, al Dr. Alexei F. Licea Navarro y Dr. Edgar Pavía López.

Especial reconocimiento para el Angel de todos los estudiantes del CICESE... **Ivonne Best,... Ivonne... sin ti, no sería lo mismo... Las penas ... con pan, son buenas.**

A los Investigadores y Colegas,.. Jorge Cáceres, Beatriz Cordero y Miguel A. del Río, por sus contribuciones y aportaciones profesionales en esta etapa de mi vida.

A los estudiantes y amigos que han acompañado en pocos o muchos días de mi vida y que sin querer... hicieron más ligero y divertido este trabajo.

Al CONACYT por haberme apoyado como becario durante 3 años de estudios y darme esta valiosa oportunidad.

Al CICESE como institución por haber abierto sus puertas y haber contribuido con su infraestructura y personal Académico en mi formación. Al personal administrativo por su invaluable apoyo para los tramites de becas, inscripciones y biblioteca.

A la Universidad Autónoma de Baja California, por haber contribuido todos estos años a mi formación profesional, por haber recibido el apoyo para continuar mis estudios y me permita seguir contribuyendo a través de ella, al medio ambiente y a la sociedad.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.1 Hipótesis.....	12
III. OBJETIVO	13
III. 1. Objetivos Particulares	13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
IV. 1 Desove y fertilización de gametos.....	15
IV. 2. Obtención de las larvas y postlarvas.....	17
IV. 3. Experimentos	18
IV. 3. 1. Presencia de diatomeas bentónicas y COD	18
IV. 3. 1. 1. Diseño experimental	19
IV. 3. 2. Adición de COD y ausencia de diatomeas bentónicas	20
IV. 3. 2. 1. Condiciones del experimento	22
IV. 4. Relación C:N en larvas competentes y postlarvas.....	24
IV. 4.1 Tamaño de la muestra (C:N).....	24
IV. 4. 1. 1 Diseño experimental para determinar C:N	26
IV. 4. 2. Biomasa y composición bioquímica de las postlarvas.	29

IV. 4. 2. 1. Peso Seco	29
IV. 4. 2. 2. Componentes bioquímicos.....	29
IV. 4. 3. Lípidos	31
IV. 5. Determinación de Carbón Orgánico Disuelto (COD)	31
IV. 6. Evaluación de juveniles	32
IV. 7. Respirimetría.....	32
IV. 7. 1. Descripción de las cámaras respirométricas	33
IV. 7. 2. Medición del consumo de oxígeno	35
IV. 7. 3. Transformaciones Energéticas.....	33
IV. 8. Utilización de cultivos de diatomeas bentónicas y COD.....	38
V.- RESULTADOS	40
V. 1. Las diatomeas bentónicas y el COD	40
V. 2. El COD sin diatomeas bentónicas.....	45
V. 2. 1 Crecimiento y supervivencia.....	45
V. 3. Producción y consumo de COD.....	49
V. 3. 1. Evaluación de juveniles.	50
VI. Relación Carbón:Nitrógeno (C:N) en postlarvas.....	53
VI.1 Tamaño de la muestra.....	53
VI. 2. Contenido bioquímico: Carbón:Nitrógeno	54
VII. Tasa Metabólica o Consumo de Oxígeno.....	62
VII. 1. Contenido de Carbón.....	65

CONTENIDO (continuación)

VII. 2. Contenido energético de la postlarva	68
VIII. DISCUSIÓN	75
VIII. 1. Determinación de Carbón Orgánico Disuelto (COD).....	75
VIII. 2. Evaluación de juveniles	80
VIII. 3. Relación C:N.....	81
VIII. 3. 1. Relación Carbón:Proteínas y energía en Joules	81
IX. Respirimetría.....	87
IX. 1. Tasa metabólica	87
IX. 2. Tasa metabólica específica	89
IX. 3. Cambios en longitud y biomasa en peso seco	91
IX. 4. Gasto metabólico	92
X. CONCLUSIONES	94
XI. BIBLIOGRAFIA	95

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Hembras de erizo blanco <i>Lytechinus pictus</i> , expulsando los óvulos.	8
2.	Diseño experimental para la evaluación del efecto de las biopelículas de diatomeas bentónicas y el carbón orgánico disuelto (COD).	19
3.	Diseño experimental para la evaluación de la asimilación del carbón orgánico disuelto (COD).	21
4.	Postlarvas de erizo blanco <i>L. pictus</i> 36 horas después de haber iniciado la metamorfosis, en donde se indica con una línea blanca la medición de la testa que se realizó en el microscopio estereoscópico.	22
5.	Respirómetro con 6 electrodos de medición simultánea del consumo de oxígeno de las larvas y postlarvas de erizo, donde se muestran las 6 cámaras respirométricas.	34
6.	Crecimiento de las postlarvas de erizo blanco <i>L. pictus</i> cultivadas y expuestas a cultivos de diatomeas bentónicas en diferentes días desde la metamorfosis.	41
7.	Supervivencia en número de postlarvas y en porcentaje del erizo blanco <i>L. pictus</i> , cultivadas y expuestas a diatomeas bentónicas en diferentes días a partir de su metamorfosis.	43

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
8.	Cantidad de Carbón Orgánico Disuelto contenido en los diferentes tratamientos durante el experimento.	44
9	Crecimiento (μm) de las postlarvas de erizo blanco <i>L. pictus</i> cultivadas y expuestas a agua con COD producido por la biopelícula de diatomea bentónica <i>N. incerta</i> y agregado al cultivo de la postlarva en diferentes días a partir de su metamorfosis	46
10.	Supervivencia de las poslarvas de erizo blanco <i>L. pictus</i> cultivadas y expuestas a agua con carbón orgánico disuelto (COD)	47
11.	Carbón orgánico disuelto (COD) producido en un cultivo de diatomeas bentónicas de <i>Navicula incerta</i> durante ocho días.	49
12.	Asimilación de carbón orgánico disuelto (COD, $\mu\text{mol C L}^{-1}$) por las postlarvas de <i>L. pictus</i> de diferentes edades.	50
13.	Porcentaje de postlarvas de erizos <i>L. pictus</i> que al tener su mandíbula funcional son consideradas juveniles	52
14.	Valores promedio de los cambios en la relación de Carbón:Proteína, obtenida en cultivos de postlarva de erizo blanco <i>Lytechinus pictus</i> , a partir de la metamorfosis, los días 0 como larva competente (=1), 2, 3, 6, 8 y 10.	59

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
15.	Supervivencia de la postlarva de erizo blanco <i>Lytechinus pictus</i> cultivada, a partir de la metamorfosis con agua de mar filtrada (AF) a 0.2 μm y con agua con carbón orgánico disuelto (COD).	62
16	Tasa de consumo de oxígeno $\text{pmol O}_2 \text{ ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (18 $^{\circ}\text{C}$) a diferentes intervalos de tiempo durante la metamorfosis de <i>L. pictus</i> a partir de larva competente (LC), hasta los 8 días.	70
17	Tasa metabólica específica (TME) del erizo blanco <i>L. pictus</i> , de larva competente hasta los 8 días de metamorfosis.	64
18	Contenido de carbón ($\mu\text{g ind}^{-1}$) promedio de las larvas competentes y las postlarvas de erizo blanco <i>L. pictus</i> durante la metamorfosis	66
19	Crecimiento promedio (μm) de las postlarvas cultivadas de erizo blanco <i>L. pictus</i>	67
20	Crecimiento promedio en peso seco ($\mu\text{g ind}^{-1}$) de la postlarva de erizo blanco <i>L. pictus</i>	68
21	Contenido de energía promedio en mJoules ind^{-1} con base en el peso seco de las postlarvas de erizo <i>L. pictus</i>	69

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
22	Cantidad de energía (mJoules ind ⁻¹) disponible en forma de lípidos, en las postlarvas de erizo blanco <i>L. pictus</i>	70
23	Cantidad de energía (mJoules ind ⁻¹) disponible en forma de lípidos, por determinación directa, en las postlarvas de erizo	71
24	Cantidad de energía consumida (mJoules ind ⁻¹ h ⁻¹) durante el proceso de metamorfosis	74

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Tratamientos en donde se determinó la relación de carbón:nitrógeno (C:N) en las postlarvas de erizo de mar blanco <i>L. pictus</i> cultivado con agua de mar filtrada 0.2 μm .	29
II	Pruebas <i>a posteriori</i> de Tukey, para valores de crecimiento y supervivencia de la postlarva de <i>L. pictus</i> en diferentes condiciones experimentales con diatomeas bentónicas.	42
III	Pruebas <i>a posteriori</i> de Tukey, para valores de crecimiento y supervivencia de postlarvas de <i>L. pictus</i> en diferentes tratamientos; con COD.	48
IV	Evaluación de diferentes tamaños de muestras de postlarvas de <i>L. pictus</i> , para la determinación del contenido de lípidos.	54
Va	Evaluación del tamaño de la muestra para estimar el número de organismos, en la determinación de la relación de C:N en larvas y postlarvas del erizo de mar <i>Lytechinus pictus</i> .	55
Vb	Evaluación del tamaño de la muestra, para estimar el número de organismos en la determinación de la relación de C:N en postlarvas del erizo de mar <i>Lytechinus pictus</i> .	56
VI	Evaluación del tamaño de la muestra para estimar la relación de C:N en larvas y postlarvas de <i>Lytechinus pictus</i>	57

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		Página
VII	Pruebas <i>a posteriori</i> de Tukey en el contenido de carbón durante la metamorfosis del erizo blanco <i>L. pictus</i> , para los días 0 (larva competente), 2 y 10.	60
VII	Pruebas <i>a posteriori</i> de Tukey en el contenido de carbón durante la metamorfosis del erizo blanco <i>L. pictus</i> , para los días 0 (larva competente), 1, 2, 6, 8 y 10	60
VIII	Tabla VIII. Pruebas <i>a posteriori</i> de Tukey en el contenido de nitrógeno durante la metamorfosis del erizo blanco <i>L. pictus</i> , para los días 0 (larva competente), 1, 2, 6, 8 y 10	60
IX	Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey, para los valores de consumo de oxígeno (18 °C) en pmol O ₂ ind ⁻¹ h ⁻¹ , en diferentes intervalos de tiempo ³	63
X	Prueba de comparación múltiple de Tukey (en Rangos), para los valores de la TME (pmol O ₂ μg ⁻¹ h ⁻¹), en diferentes intervalos de tiempo	65
XI	Gasto metabólico mJoules ind ⁻¹ h ⁻¹ para diferentes tiempos de desarrollo durante la metamorfosis de <i>L. pictus</i> , desde larva competente (LC) hasta postlarva	74

Utilización de carbón orgánico disuelto y tasa metabólica en postlarvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* (Verrill), (ECHINODERMATA: ECHINOIDEA)

I. INTRODUCCIÓN

Este estudio fue llevado a cabo en el contexto del interés económico e importancia comercial que ha tenido por casi cuatro décadas como recurso pesquero el erizo de mar que se encuentra distribuido en la costa rocosa de Baja California.

La pesquería del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* en Baja California genera divisas anualmente por más de cinco millones de dólares. A partir de la creciente demanda del producto en el mercado japonés, se inició la explotación del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). De 1994 al 2000, la captura de este se ha incrementó de 577 a 814 toneladas, la cual a fluctuado entre el 26% y el 40% de las capturas totales de erizo x (SEMARNAP, 2001). Otra especie sin importancia comercial y de menor abundancia es el erizo blanco *Lytechinus pictus*, el cual habita en sustratos de arena y roca y su tamaño adulto es de 5 cm.

Se considera a la acuicultura del erizo como una alternativa para la recuperación de los bancos naturales mediante programas de repoblamiento y de cultivo en cautiverio. Estas actividades significarán nuevas fuentes de empleo, ingresos adicionales para los pescadores y disminución de la presión de pesca sobre el recurso. Para realizarlas, es fundamental desarrollar una biotecnología para la producción masiva de juveniles en el laboratorio. Solo Japón y Chile han desarrollado la biotecnología para cultivo de erizo (Saito *et al.*, 1985; Yokota, 2000; Bustos *et al.*, 1991; Bustos y Olave, 2001). En México

y en los Estados Unidos, no se ha logrado la producción masiva de semilla de erizo, por lo que es necesario generar el conocimiento para desarrollar y aplicar técnicas nuevas enfocadas a la producción en laboratorio. Es necesario además conocer los cuidados que demanda el cultivo de larvas y postlarvas, para lograr el éxito en la producción de semilla.

En estudios realizados en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), las larvas de erizo rojo *S. franciscanus*, morado *S. purpuratus* y blanco *L. pictus* completaron su desarrollo larvario en un periodo de 20 a 28 días, pasando por diferentes etapas tales como, embrión, blástula ciliada, gástrula ciliada, larva prisma (inicia su alimentación), larva equinopluteus 4 brazos, larva equinopluteus 6 brazos, larva equinopluteus 8 brazos y larva competente (Salas-Garza y Parés-Sierra, 2000; Fonseca-Madrigal, 2001; Salas-Garza et al., 2005). El tiempo de vida larvaria está influenciado por la calidad del alimento proporcionado (Fenaux, 1982; Boidron-Métairon, 1995) y es un factor que interesa por su asociación directa al costo de producción de semilla. Las tres especies de erizo mencionadas han sido motivo de estudio para avanzar en el proceso del desarrollo de la biotécnica para la producción de juveniles que posteriormente podrán ser utilizados en programas de repoblamiento que favorezcan las poblaciones naturales y cultivos en cautiverio que diversificarán la actividad pesquera y generarán recursos económicos para los pescadores. En este trabajo se estudian algunos de los problemas que se tienen con la alta mortalidad de las postlarvas de erizo durante el proceso de producción de semilla, y

se plantean algunas alternativas para mejorar la supervivencia, como una contribución al desarrollo de la biotecnia.

II. ANTECEDENTES

Las larvas competentes de erizo al final de su desarrollo larvario, como la mayoría de los invertebrados marinos, deben asentarse e iniciar su metamorfosis (Pearce y Sheibling, 1994). Estas se presentan con 8 brazos y un rudimento bien desarrollado que aparece en el lado izquierdo del cuerpo larvario (Gosselin y Jangoux, 1998). Las larvas competentes al ser estimuladas por ciertos factores ambientales inician la metamorfosis (Strathmann, 1987) y su estadio postlarval. La metamorfosis es una cadena de eventos irreversibles que producen cambios fisiológicos y morfológicos, que hace que pasen de una vida pelágica nadadora a una bentónica (Kitamura et al., 1994; Yazaki y Harashima, 1994; Yazaki, 1995). La metamorfosis externa en equinoideos es rápida, puede tomar de unos minutos a pocas horas (Cameron y Hinegardner, 1978), sin embargo ocurren también cambios internos que duran varias semanas. En *S. purpuratus* desde el inicio de su estadio postlarval hasta la conversión a juvenil requiere de 12 a 15 días (Salas-Garza y Parés-Sierra, 2000), y para *S. franciscanus* el tiempo es de 25 días (Preciado-Pinedo, 2000; Carpizo-Ituarte et al., 2002). Los cambios internos morfológicos y fisiológicos son complejos, e implican gran riesgo para la supervivencia de los organismos (Sheltema, 1974), ya que la postlarva interrumpe la ingestión de alimento durante todo el proceso de la metamorfosis hasta el momento en que su mandíbula es funcional, y empieza su

alimentación en la vida bentónica. La mayoría de las postlarvas de erizo mueren durante esta etapa, lo cual puede estar asociado a problemas de nutrición o genéticos (Rogers-Bennett *et al.*, 1994). Los requerimientos nutricionales que utiliza el erizo en la metamorfosis son obtenidos durante su vida planctotrófica y que forman las reservas energéticas para la metamorfosis, podrían ser insuficientes.

El erizo *L. pictus*, tiene un desarrollo embrionario y larvario de aproximadamente 27 días a una temperatura de 19 °C. Su desarrollo a las 30 horas es de una larva prisma, a partir de la cual puede iniciar su alimentación, ya que tiene completamente terminado y funcional su boca, estómago y ano. Posteriormente se desarrolla en una larva equinopluteus 4 brazos, equinopluteus 6 brazos, equinopluteus 8 brazos. El laboratorio las larvas se han alimentado con la microalga *Rhodomonas* sp y su alimentación diaria consiste en 7000 células la primer semana, 10,000 la segunda y 15,000 la tercera de su desarrollo (Carpizo-Ituarte, et al., 2002). Durante la última semana se presenta la formación del rudimento juvenil, hasta que este ocupa casi todo el cuerpo larval con la excepción de los brazos. La larva se considera que es competente para ser inducida a la metamorfosis cuando están presentes cuatro pies ambulacrales, los cuales extiende en búsqueda de sustrato. Es común que durante este estadio, la larva explore el sustrato con los pies ambulacrales y pueda volver a nadar de nuevo. Al iniciar la metamorfosis el cuerpo se revierte exponiendo el rudimento y las espinas corporales adheridas a su testa.

Las biopelículas de diatomeas bentónicas han sido usadas en la acuicultura como inductores indirectos de la metamorfosis y como primera alimentación para los juveniles

de algunos invertebrados como abulones, *Haliotis rufescens*, *H. fulgens*, *H. discus hannai* (Norman-Bourdou, et al., 1984; Hahn, 1989), y erizos *Strongylocentrotus franciscanus* (Salas-Garza et al., 2005), *S. purpuratus* y *Loxechinus albus* (Bustos y Olave, 2001). La diatomea *Navicula incerta* a sido utilizada como primera alimentación del abulón rojo *H. rufescens* (Carvajal-Miranda, 2002; Correa-Reyes, 2002 y Simental-Trinidad 2004) y el erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* (Norman-Boudreau et al., 1986; Daume et al., 1997; Kawamura et al., 1997; Bustos, et al., 2001; Salas-Garza et al., 2005). Estas biopelículas que consisten en una o varias especies de diatomeas asociadas con bacterias, que liberan moléculas, que pueden inducir a la metamorfosis larvas de invertebrados (Morse. et al., 1979; Lam et al., 2003). Además de lo anterior, las diatomeas liberan aminoácidos disueltos al medio principalmente a través de la exudación y el uso de estos en procesos microheterotróficos está bien documentado (Smith, 1986; Carlson, 2002). La mayor parte de la materia orgánica en el océano se encuentra en estado disuelto (MOD) la cual está formada por carbón orgánico disuelto (COD = 60-90 μmol), nitrógeno (NOD = 3.5-7.5 μmol) y fósforo (FOD = 0.1-0.4 μmol), de acuerdo con Benner (2002). Más del 90% de la MOD es COD. Del 1% al 27% del COD, es producido por algas y la cantidad de carbón exudado varía del 10% al 20% del total en el océano (Nagata, 2000). Este COD puede ser una importante fuente de energía para los invertebrados marinos (Wendt y Johnson, 2006) y posiblemente para los erizos de mar durante su metamorfosis.

Los estudios de la energética del crecimiento y desarrollo de invertebrados marinos involucran mediciones de los cambios en tasas de disipación de calor, y también mediciones indirectas, como, la respiración, cambios de peso y de las reservas energéticas de la composición bioquímica de proteínas, lípidos y carbohidratos. Algunos de estos estudios han sido sobre equinodermos (Turner y Rutherford, 1976; Lawrence *et al.*, 1984; Mclintock y Pearce, 1986). Sin embargo, en cultivos en el laboratorio, se había puesto poca atención a las condiciones químicas del agua de mar, especialmente a la materia orgánica disuelta (MOD). Desde los años 50's se observó que diferencias en la química del agua de mar influyen el desarrollo larval. Las larvas de equinoideos tuvieron diferentes patrones de crecimiento en aguas filtradas de diferentes localidades (Wilson, 1951 y Wilson y Armstrong, 1961), asociado a la presencia o ausencia de algunos compuestos disueltos. Actualmente se sabe que las larvas de cuerpo blando en invertebrados marinos tienen la capacidad de utilizar fracciones específicas de la MOD en el agua de mar, como aminoácidos y azúcares (Manahan, 1990; Welborn y Manahan, 1990).

Las reservas energéticas de embriones y larvas para diversas especies de invertebrados marinos son insuficientes para abastecer la demanda energética durante esta etapa del desarrollo (Shilling y Manahan, 1990), y se ha comprobado que la utilización de MOD provee para algunos organismos parte de la energía.

El consumo de materia orgánica disuelta en invertebrados, por diversos autores, sin embargo la información generada es escasa (Pavillon, 1976; Fenaux 1982; Manahan,

1990; Jaeckle *et al.*, 1992; Shilling y Bosch, 1994; Hoegh-Guldberg y Emllet, 1997). Se ha estudiado inclusive en invertebrados con desarrollo larvario lecitotrófico, demostrándose que la MOD es de importancia relevante en su desarrollo, como en el caso del abulón *Haliotis rufescens* (Jaeckle y Manahan, 1989a; 1989b) y en menor grado en el caso de *Bugula neritina* (Jaeckle, 1994). En las larvas de desarrollo planctotrófico como en el equinodermo *Acanthaster planci* puede llegar a significar hasta el 29.9 % de los requerimientos energéticos totales (Hoegh-Guldberg, 1994). El potencial y el valor energético de la MOD en el agua de mar para los estadios de vida en que no se alimentan los invertebrados está en función tanto de la cantidad como de la calidad de los compuestos orgánicos presentes y la capacidad fisiológica del organismo (Jaeckle, 1995). Se han encontrado diferencias en el patrón de aminoácidos en la zona eufótica y en los estratos de aguas inferiores cercanas al fondo, y las concentraciones de algunos aminoácidos pueden estar en grandes proporciones en aguas profundas y casi ausentes en aguas superficiales (Duursma y Dawson, 1981), así como en el Océano Pacífico a una profundidad de 75 m la distribución de aminoácidos fue dominada por la glicina, alanina y serina que es la representación típica oceánica (Lee, et al., 2000; Keil et al., 2000). Las concentraciones de aminoácidos disueltos en el océano son reguladas por la tasa de producción de autótrofos (principalmente exudados del fitoplancton) y las tasa de su utilización por procesos microheterotróficos, por lo tanto debe de haber variaciones en el océano reflejando su variabilidad natural a lo largo de miles de kilómetros. Sin embargo, pueden presentarse en una distancia de unos cuantos metros variaciones importantes en la

cantidad de MOD. Las concentraciones de nitrógeno orgánico disuelto pueden variar en un factor de 2 a 1000 metros de distancia (Smith, 1986).

En el abulón *H. rufescens*, que tiene una larva lecitotrófica, fue durante su etapa postlarval cuando ocurrió la utilización de la MOD, sin embargo, este estadio parece más bien corresponder al juvenil, ya que su metamorfosis sucede tan solo en unas horas, e inicia su alimentación 24 horas después de ser inducida a la metamorfosis (Shilling *et al.*, 1996). La rapidez de sus cambios externos e internos y su casi inmediata alimentación hace que su fuente de energía dependa principalmente del consumo de microalgas bentónicas.



Figura 1. Hembras de erizo blanco *Lytechinus pictus*, expulsando los óvulos.

La utilización de la MOD incluye la incorporación de aminoácidos presentes en el agua de mar que son importantes energética y fisiológicamente para los invertebrados. Se han observado cambios en el sistema de transporte de glicina durante el desarrollo larvario de *Strongylocentrotus purpuratus*. Pavillon (1976), probó que al agregar al agua de cultivo los aminoácidos ácido glutámico y glicina, se incrementó el tamaño de larvas de *Arbacia lixula* y *Paracentrus lividus*. Por eso en este estudio se plantea la importancia de determinar la utilización de materia orgánica durante el proceso de metamorfosis. Los aminoácidos que contiene la materia orgánica disuelta pueden desempeñar funciones importantes en esta etapa ya que podrían estar presentes en cantidades insuficientes en el organismo, además de que pueden ser una fuente importante de energía externa. Esta información será muy valiosa para comprender los procesos de su desarrollo durante esta etapa.

Evaluar la composición bioquímica de la larva es una herramienta para estimar las reservas energéticas y la condición nutricional. En *Argopecten purpuratus* se encontró que la composición bioquímica, de huevos, larvas y postlarvas hasta el final de la metamorfosis influyó en el desarrollo de las larvas y su supervivencia hasta juvenil (Farías *et al.*, 1998). Para el erizo *S. franciscanus* existe una descripción y seguimiento de su contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos durante su desarrollo larval (Fonseca-Madrigal, 2001), de la misma manera que para el erizo *S. purpuratus* (García-Hernandez, 2003); sin embargo no hay estudios durante su desarrollo postlarval, cuando estas reservas están siendo metabolizadas y el organismo no se alimenta. Algunos

invertebrados marinos enfrentan periodos cortos de inanición en sus estadios larvales y postlarvales. Cuando las larvas planctotróficas inician la metamorfosis, utilizan sus reservas endógenas (Whyte *et al.*, 1987, Videla, *et al.*, 1998) debido a que durante este proceso no pueden ingerir partículas suspendidas (Baker y Mann, 1994). En el caso de postlarvas de erizo morado *S. purpuratus* y el erizo rojo *S. franciscanus* este periodo es más crítico ya que se puede extender más de 15 días. Es necesario describir los patrones de almacenamiento-utilización de energía, lo cual puede realizarse si se da seguimiento a los cambios netos de proteínas, lípidos y carbohidratos, al suponer que cualquier decremento en sus cantidades relativas-absolutas, son debido a que se incrementa su demanda como fuentes de energía (García-Esquivel, *et al.*, 2001).

Durante la metamorfosis el reacomodo de tejidos es energéticamente muy costoso y puede resultar en una reducción de las reservas energéticas (Shilling, *et al.*, 1996). En el cirripedio *Balanus balanoides*, se observó un incremento en la actividad metabólica durante la metamorfosis y una reducción en la concentración de proteínas y lípidos (Lucas, *et al.*, 1979). También en el abulón *H. rufescens* al pasar del estadio larvario al postlarvario el aumento del consumo de oxígeno fue muy significativo, se incrementó de 222 pmol O₂/h/org a 1659 pmol O₂/h/org (Shilling, *et al.*, 1996). En el caso de los equinodermos la energía metabólica en *Heliocidaris tuberculata* usada para el desarrollo hasta la metamorfosis, se incrementó en más de un 50 %, para disminuir nuevamente después de la metamorfosis (Hoegh-Guldberg y Emlet, 1997).

En condiciones de inanición las larvas adquieren su energía de las proteínas, lípidos y carbohidratos endógenos es decir de sus propias reservas. De estos compuestos los lípidos, y principalmente triglicéridos los que aportan mayor energía que el conjunto de proteínas y carbohidratos. En *Ostrea edulis* durante la metamorfosis, la mitad de las reservas en lípidos neutrales son usadas para el metabolismo, también ocurre lo mismo para los gasterópodos *Littorina littorea*, *L. saxatilis*, *L. littoralis* y *L. neritoides*, y el crustáceo *Balanus balanoides* (Holland, 1978). Es importante la presencia de ácidos grasos, ya que en varios invertebrados se ha encontrado una correlación entre la composición de lípidos y su éxito en el desarrollo y asentamiento (Levine y Sulkin, 1984). Dentro de estos el contenido de ácidos grasos polinsaturados omega-3, es fundamental (Webb y Chu, 1982). El éxito en el desarrollo y asentamiento en *Ostrea edulis* se puede explicar por la presencia de éstos (Jonsson *et al.*, 1999) y lo mismo ocurre en el caso de los cefalópodos durante su desarrollo temprano (Navarro y Villanueva, 2000). Debido al aporte energético que representan los lípidos y en particular los ácidos grasos, es de esperar que estos tengan una importante función durante la metamorfosis de las postlarvas de erizo.

Este estudio, tiene la finalidad de evaluar la demanda energética de las postlarvas de erizo blanco durante la metamorfosis, para lo cual se estimará la posible utilización de materia orgánica disuelta, el consumo de oxígeno o tasa metabólica para estimar sus necesidades energéticas. Se evalúa la función que desempeñan las películas de diatomeas bentónicas como productoras de energía externa en forma de carbón orgánico disuelto

para las postlarvas en condiciones de laboratorio y el efecto en estas. Con base en este conocimiento se proponen alternativas que mejoren sus condiciones nutricionales en el laboratorio, para que puedan cubrir sus exigencias metabólicas, mejorar su supervivencia a la etapa de la metamorfosis y así incrementar la producción de juveniles. Este aspecto que en la actualidad es desconocido para esta especie podrá contribuir al desarrollo biotecnológico en la producción de juveniles de erizo de mar en México.

Como parte fundamental del desarrollo de la tecnología en la producción de semilla de erizo el presente trabajo se realizó con una de las especies presentes en la zona de estudio, el erizo blanco *Lytechinus pictus*, debido a su disponibilidad en número y en tiempo y por lo que es posible trabajar con él desde finales de primavera hasta principios de otoño, lo que facilitó la realización de los experimentos (Figura 1).

II.1 Hipótesis

El COD representa un aporte significativo de energía exógena, que favorece el proceso de metamorfosis y su desarrollo, ya que esta etapa es de varias semanas y la energía proveniente de proteínas y lípidos podría no ser suficiente para sus necesidades metabólicas. Así mismo durante la metamorfosis su tasa metabólica se incrementa y este incremento será soportado principalmente por el metabolismo de lípidos en los organismos.

III.- OBJETIVO

Evaluar la utilización de carbón orgánico disuelto como fuente de energía exógena y estimar la tasa metabólica en postlarvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* durante la metamorfosis. Evaluar durante la metamorfosis los cambios de carbón y proteína y su aporte energético en este proceso en el agua de mar.

III. 1. Objetivos Particulares

Durante la metamorfosis:

a.- Evaluar el efecto de la biopelícula de diatomeas bentónicas y el carbón orgánico disuelto (COD) en el crecimiento, desarrollo y supervivencia de las postlarvas de erizo de mar.

b.- Evaluar el crecimiento y la supervivencia de las postlarvas en presencia y ausencia de diatomeas bentónicas, hasta su estadio juvenil.

c.- Cuantificar los cambios de COD en el agua de cultivo de las postlarvas de erizo antes y después de los cambios de agua, para determinar su consumo.

d.- Cuantificar los cambios temporales de COD producidos en el agua de cultivo de las diatomeas bentónicas, para estimar las cantidades suministradas a los tratamientos con postlarvas de erizo.

f.- Determinar la composición bioquímica de las larvas competentes y las postlarvas; lípidos y su relación carbón:nitrógeno (C:N).

g.- Relacionar la demanda energética con su contenido energético estimado con su peso seco y los cambios en la composición bioquímica del erizo blanco *L. pictus*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron organismos adultos del erizo blanco *L. pictus* del medio natural, por medio de buceo libre. Se colocaron dentro de hieleras de plástico con hielo “blue ice” y se cubrieron con macroalgas para evitar la deshidratación. Posteriormente, se trasladaron al Laboratorio de Moluscos y Equinodermos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la UABC, donde se colocaron en estanques de 360 litros, a temperatura ambiente (20-22 °C) con flujo continuo de agua de mar y con macroalgas como alimento. La temperatura se midió diariamente en 3 recipientes a las 9 am y a las 4 pm con un termómetro de precisión de 0.2 °C.

IV. 1 Desove y fertilización de gametos

Para la inducción al desove de los erizos se siguió el método descrito por Strathmann (1987), en el que se utiliza cloruro de potasio (hasta 3 ml 0.5 M), inyectado a través de la membrana bucal hacia la cavidad celómica. Los gametos de los organismos de ambos sexos fueron recolectados por separado en frascos de vidrio que contenían 500 ml de agua de mar previamente filtrada y esterilizada con lámpara de luz ultravioleta (UV).

El proceso de fecundación se hizo en dos partes, primero se diluyó un mililitro de óvulos en 100 ml de agua de mar filtrada y esterilizada y por otra parte, se diluyó una

gota de espermatozoides en 50 ml de agua de mar filtrada y esterilizada. Para la fecundación de los gametos se diluyó un mililitro de la solución de espermatozoides en la solución de óvulos. La mezcla fue agitada constantemente para asegurar un mayor porcentaje de óvulos fecundados. Después de 15 minutos en un filtro de 48 μm , se recolectaron los óvulos asentados, se lavaron con agua de mar filtrada (1 μm) e irradiada con luz U.V. para eliminar el exceso de esperma. Concluido el lavado, se concentraron los óvulos en 50 ml de agua de mar y se tomaron tres muestras al azar de 1ml para observarlas al microscopio. Por medio de un conteo de óvulos con presencia de la membrana de fecundación, se determinó el porcentaje de fecundación. Por último, los óvulos fecundados se colocaron en recipientes de 18 litros sin aireación durante 60 horas, tiempo en el que se desarrolla el estadio larvario de prisma, en el cual se inicia la alimentación. Transcurridas 48 horas se realizó un lavado de los recipientes y se efectuó un cambio total de agua. El agua utilizada fue filtrada hasta 1 μm e irradiada con luz UV.

Las larvas obtenidas se concentraron en un recipiente de 5 litros para ser cuantificadas. Se agitó el contenido del recipiente con un agitador manual y se tomaron diez muestras de 1 ml cada una, para calcular la densidad promedio de larvas. Posteriormente, se distribuyeron las larvas en recipientes cónicos con 45 litros de agua de mar a una densidad de 2 larvas ml^{-1} . Cada recipiente tuvo un suministro de aireación permanente e independiente para evitar que las larvas permanecieran en el fondo. Cada dos días se realizaron recambios de agua de 50% y cada semana un cambio total; el agua utilizada para el cultivo fue filtrada e irradiada con luz UV.

Las larvas se alimentaron con la microalga *Rhodomonas* sp; a una concentración inicial de 10,000 cel ml⁻¹, incrementándose a 5000 cel ml⁻¹, cada semana hasta un máximo de 20,000 cel ml⁻¹ El alimento fue proporcionado diariamente. A los 26-28 días las larvas presentaron su estadio competente al mostrar un rudimento que ocupaba la mayor parte del cuerpo larval y mostraba los pies ambulacrales. El comportamiento de las larvas era el acercamiento al fondo y exploración del sustrato con los pies ambulacrales.

IV. 2. Obtención de las larvas y postlarvas

Cuando el comportamiento de las larvas era de acercamiento al fondo y exploración del sustrato con los pies ambulacrales, estas fueron colocadas en una caja de Petri y con ayuda de un microscopio estereoscópico y una pipeta Pasteur, se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml; se tomaron tres muestras de 100 larvas para determinar por triplicado el contenido de C y de N y otras tres muestras de 100 larvas para la determinación del peso seco y cenizas. Además, se midieron un total de 30 larvas para estimar el tamaño promedio del lote.

Para inducir las larvas a la metamorfosis, estas fueron concentradas en un tamiz, el cual fue sumergido en agua de mar exponiéndolas por 15 minutos a una concentración de 0.1M de KCl (Carpizo-Ituarte *et al.*, 2002). Después de 24 horas de haber inducido las larvas a la metamorfosis, las postlarvas fueron sometidas a los diferentes tratamientos.

IV. 3. Experimentos

IV. 3. 1. Presencia de diatomeas bentónicas y COD

El diseño experimental consistió en variar el tiempo de exposición de las postlarvas a la película de diatomeas bentónicas, la cual debe de aportar carbón orgánico disuelto al agua de mar, y este, estar disponible para las postlarvas.

El primer experimento consistió en tres tratamientos y un control, todos por triplicado (Figura 2), los cuales corresponden a; D1= postlarvas con diatomeas bentónicas desde el 1er día; D3= postlarvas con diatomeas bentónicas a partir del 3er día; D6= postlarvas con diatomeas bentónicas a partir del 6to día y C= control, postlarvas sin diatomeas bentónicas permanentemente. Cada cubeta contenía 300 postlarvas y el número total de postlarvas utilizadas en el experimento fue de 3,600.

Los inóculos fueron realizados con la microalga *Navicula incerta* fue en promedio de 30,000 células por cm², utilizando la metodología descrita por Ebert y Houk (1984) y aplicada para obtener películas de diatomeas bentónicas. Las diatomeas se obtuvieron del Laboratorio de Microalgas, como monocultivos axénicos, los cuales se extrajeron de recipientes Erlenmeyer de 250 ml. Fueron separadas con un pincel en el mismo frasco, filtradas en un tamiz con luz de malla de 18 µm y colocadas luego en un ultrasonido por 45 segundos para separar las microalgas unidas entre si. Posteriormente se diluyeron en un volumen de 2 litros y se contaron en un hematocitómetro Sedwick-Rafter. Una vez que se estimó su concentración se extrajeron las alícuotas correspondientes para inocular

un área de 600 cm² en cada recipiente experimental y obtener una densidad final de 30,000 células por cm². El contenido se homogenizó para obtener una distribución uniforme del mismo. Para permitir que se asentaran en el fondo, se dejaron sin suministro de aire por 24 horas.

IV. 3. 1. 1. Diseño experimental

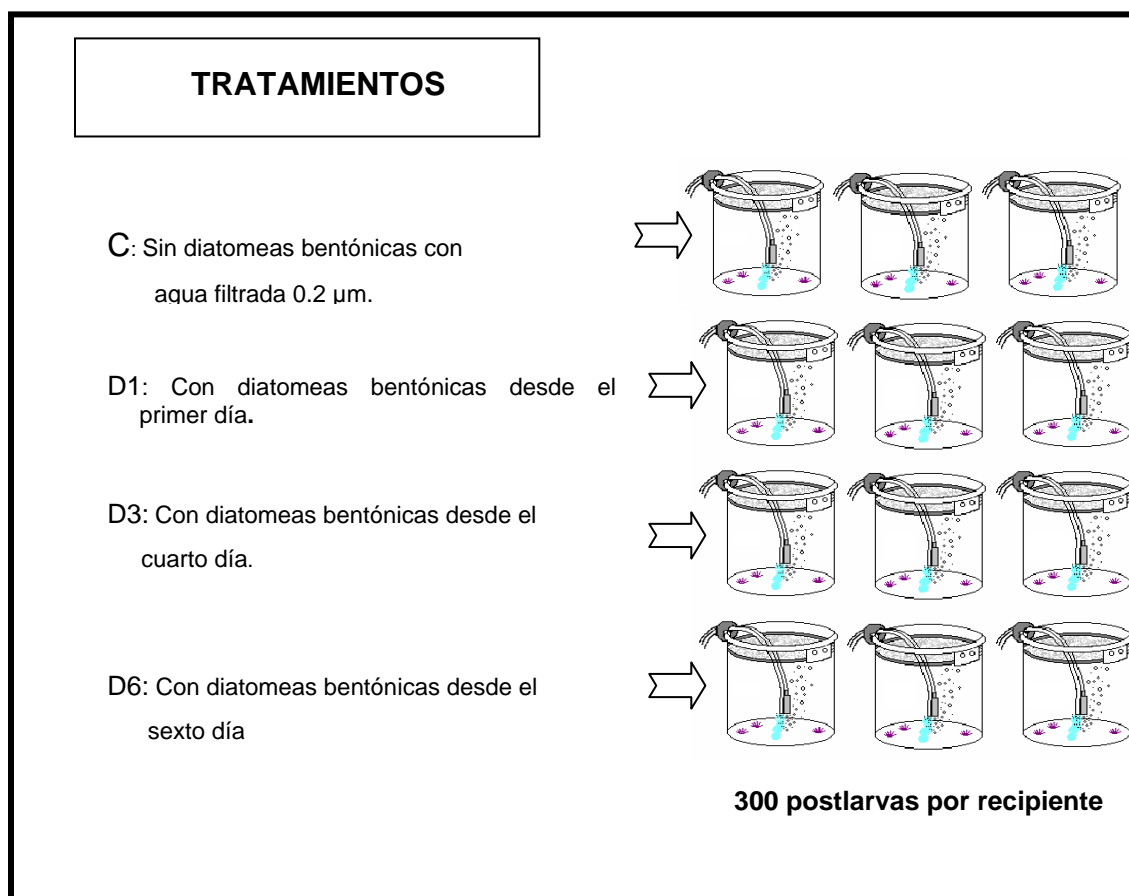


Figura 2. Diseño experimental para la evaluación del efecto de las biopelículas de diatomeas bentónicas en el desarrollo y supervivencia de postlarvas del erizo blanco *Lytechinus pictus* durante la metamorfosis.

IV. 3. 2. Adición de COD y ausencia de diatomeas bentónicas

Para determinar si fue la presencia de las diatomeas bentónicas o el COD producido por éstas favoreció el desarrollo de las postlarvas. Se expusieron estas con y sin películas de diatomeas, también por triplicado. El diseño experimental consistió en variar el tiempo de exposición de las postlarvas al carbón orgánico disuelto producido por el cultivo de diatomeas bentónicas y comparar este resultado con postlarvas expuestas a películas de diatomeas bentónicas que generan el COD.

Este experimento consistió en tres tratamientos, además de un control positivo y uno negativo, todos por triplicado (Figura 3); D1= postlarvas con adición de COD desde el 1er día; D4= postlarvas con adición de COD desde el 4to día; D8= postlarvas con adición de COD desde el 8vo día; D= control positivo; postlarvas con diatomeas bentónicas desde el 1er día y C= control negativo; postlarvas sin diatomeas bentónicas, sin COD y agua filtrada 1 μm . Cada cubeta contenía 300 postlarvas y el número total de postlarvas utilizada en el experimento fue de 4,500.

Se mantuvieron los cultivos de diatomeas bentónicas en cubetas con capacidad de 18 litros, en las cuales se producía el COD. Para los cultivos de diatomeas bentónicas se utilizó agua filtrada de 1 μm y cada 24 horas se recolectó esta agua que contenía COD, para adicionarla a los recipientes experimentales, como se describió en el diseño experimental. La diatomea bentónica utilizada en los cultivos fue la microalga *Navicula*

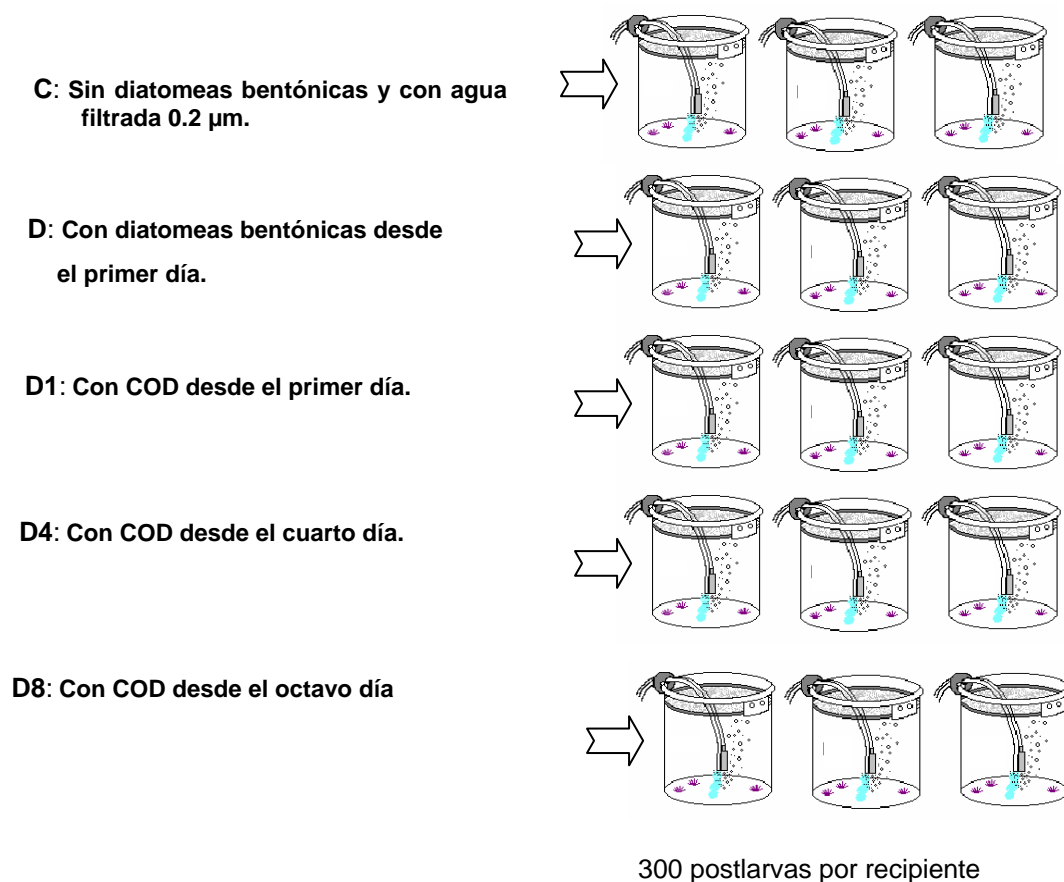


Figura 3.- Diseño experimental para la evaluación del efecto de la presencia de las biopelículas de diatomeas bentónicas y el suministro de carbón orgánico disuelto (COD) que estas producen, en el desarrollo y supervivencia de postlarvas del erizo blanco *Lytechinus pictus*.

incerta, obtenida del Laboratorio de Microalgas en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Se utilizaron cultivos de más de 3 días, inoculados originalmente con un promedio de 30,000 células por cm^2 , utilizando la metodología descrita por Ebert y Houk (1984), y como se describió en el experimento anterior.

IV. 3. 2. 1. Condiciones del experimento

Todos los recipientes con las postlarvas recibieron permanentemente luz blanca de neón con lámparas de 60 watts, para promover el crecimiento de las diatomeas. Se cultivaron con medio f /2 de Guillard en el Laboratorio de Microalgas de manera controlada por 7 días antes de realizar los inóculos.

Diariamente se cambió el agua de los recipientes, que contenían 500 ml de agua de mar. El agua se filtró hasta 1.0 μm , con un filtro Pall Gelman Lab., modelo 12140. Las cubetas del tratamiento C, sin diatomeas bentónicas, se limpiaron con una brocha cada 5 días, para disminuir el crecimiento de microorganismos. El tamaño inicial de las postlarvas, se determinó midiendo su testa en 50 organismos utilizando un micrómetro en un microscopio estereoscópico como se muestra en la Figura 4.

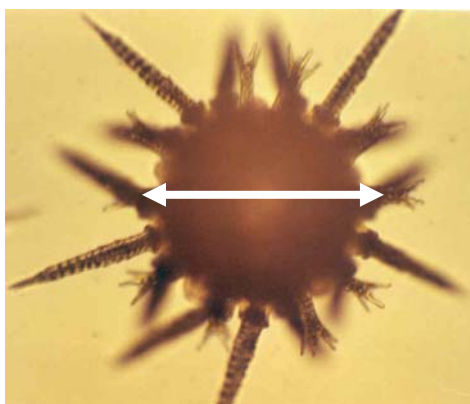


Figura 4. Postlarvas de erizo blanco *L. pictus* 36 horas después de haber iniciado la metamorfosis, en donde se indica con una línea blanca la medición de la testa que se realizó en el microscopio estereoscópico.

Posteriormente se extrajeron y repartieron las postlarvas de los estanques de cultivo, en los recipientes experimentales. Para evaluar su crecimiento se midieron las testas de 20 postlarvas provenientes de cada cubeta (60 por tratamiento) los días 1, 3, 9 y 15, y de esta manera se obtuvo la información evitando un manejo excesivo de los erizos. También, en los mismos días se contaron todas las postlarvas en cada recipiente, para determinar la supervivencia.

Durante el experimento se tomaron en dos ocasiones muestras del agua suministrada a los experimentos para analizar su contenido de COD antes de abastecer al control negativo, y también se recolectaron en tres ocasiones muestras de agua de los distintos tratamientos (D1, D4 y D8) después de haber permanecido el agua 24 horas en las cubetas experimentales, y así cuantificar los cambios en el contenido de COD.

En las cubetas experimentales, las postlarvas no se mantuvieron con los cultivos de diatomeas bentónicas, solo se les suministró el agua proveniente de cultivos de diatomeas bentónicas con el COD producido por éstas. El suministro fue a los 1 (D1), 4 (D4) y 8 (D8) días.

Además, se incluyó un control positivo con presencia de diatomeas bentónicas desde el primer día (D), y se incluyó un control negativo mantenido las postlarvas solamente con agua filtrada (C). El crecimiento y la supervivencia de las postlarvas se estimaron con la misma metodología que el experimento 1, los días 1, 3, 9 y 15.

IV. 4. Relación C:N en larvas competentes y postlarvas

Se llevaron a cabo cuatro estimaciones de manera independiente, cada uno por triplicado, para determinar en las postlarvas la relación C:N y sus cambios como sustrato energético durante la metamorfosis.

IV. 4.1 Tamaño de la muestra (C:N)

Para poder obtener datos confiables fue necesario realizar ensayos preliminares para hacer una evaluación sobre el tamaño de la muestra y pudieran cuantificarse con los métodos utilizados para la determinación de la razón de en las postlarvas. Se examinaron muestras de 80, 100, 150, 200, 250 y 300 postlarvas.

Las postlarvas se concentraron en una caja de Petri, en la cual se barrió el fondo mientras se giraba el pincel para levantar los organismos sin dañarlos y colocarlos en tubos Eppendorf para centrifuga de 1.5 ml, donde se enjuagaron con agua de mar (filtrada a 0.2 μm y esterilizada) para remover material orgánico particulado. Se congelaron a una temperatura de -20°C . Cada muestra de 80 o 100 postlarvas, dependiendo del caso, se secó en horno por 12 horas a 600°C y luego fue almacenada en un desecador. Posteriormente se transfirieron a micro cápsulas previamente pesadas para obtener su peso seco. Se estimó el contenido de C:N en un Analizador Elemental Automatizado de Combustión (LECO) de 50 muestras, con cisterna como estándar, como estimador

interno cada 10 muestras para verificar su calibración. El resultado es reportado como una razón del contenido en porcentaje de carbono y nitrógeno en la muestra.

El contenido de proteína se estimó al multiplicar el contenido de N (%) en las muestras por el factor de 5.8 y el resultado se transformó a gramos considerando el peso total en mg de la muestra total. Gnaiger y Bitterlich (1984) sugirieron este factor de conversión para organismos marinos, basado en un contenido de nitrógeno/proteína del 17.3% presente en aminoácidos de bacterias, algas y animales acuáticos.

Para determinar el patrón que siguieron los cambios de carbono y proteína se realizó una correlación entre el porcentaje de ambos contenidos, en el programa Excel. Los valores de C:N obtenidos se ajustaron a una recta, obteniéndose la ecuación. Posteriormente se compararon las cuatro pendientes obtenidas en cada ecuación de las rectas (cada una correspondiente a un tratamiento), con un análisis de covarianza (ANCOVA).

La cantidad y su composición de los lípidos varían de un tejido a otro sin embargo son cadenas de enlaces de carbono con diferentes características. El metabolismo de oxidación de los ácidos grasos se generaliza mediante la oxidación del carbono Beta, donde se liberan dos carbonos y se produce CO_2 . El primer paso en la oxidación de ácidos grasos es una activación del ácido graso por la coenzima A (CoA). En cada ocasión ocurre la degradación de ácidos grasos de dos carbonos, hasta que todo el ácido graso se haya convertido en CoA.

En el caso de las proteínas, todas, son polímeros mezclados de aminoácidos, contienen carbón, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. En el metabolismo las vías metabólicas generales que intervienen son por oxidación, separan el grupo amino, desvían el esqueleto de carbono del aminoácido a alguna otra vía metabólica, como compuestos que pueden oxidarse por las reacciones del ciclo del ácido cítrico, posteriormente se excretan como producto de este catabolismo desechos nitrogenados.

Los resultados de las pruebas para determinar los tamaños de las muestras, permitieron optimizar el número de erizos producidos y utilizados en cada desove para los experimentos. En cada ocasión el número de postlarvas que se producían, era diferente y en función de este número se programaban los muestreos, ya que entre mayor era el número producido, era posible realizar muestreos durante el experimento. Debido a que se estimaron las variables de; longitud, C:N, lípidos y peso seco, el número de postlarvas removidas en cada muestreo fue de aproximadamente 1300.

IV. 4. 1. 1 Diseño experimental para determinar C:N

Después de 24 horas de haber inducido a las larvas a la metamorfosis, las postlarvas fueron sometidas a un mismo tratamiento en 4 diferentes ocasiones. Las postlarvas fueron transferidas en cada ocasión a seis o siete recipientes experimentales de plástico de 12 litros de capacidad, previamente expuestos a una concentración de cloro al 6% por 24 horas y posteriormente se añadieron 4 ml de una solución stock de tiosulfato de sodio (26 g L^{-1}) para neutralizar el cloro y se mantuvo así por 12 horas con aireación.

Este tratamiento se hizo para eliminar la materia orgánica presente en los recipientes. En cada recipiente se colocaron en promedio 1500 postlarvas y hasta 3000. Las postlarvas se mantuvieron en un volumen de agua de mar filtrada a $0.2 \mu\text{m}$. En cada ocasión se tomaron muestras de los organismos a partir de larvas competentes y después de postlarvas. Para la estimación de lípidos, de 80 a 100 organismos, para peso seco de 80 a 100, para determinar C:N entre 80 y 100 postlarvas (día 0, 1, 2, 4, 6 y 10). El criterio para el número de muestreos durante el mismo tratamiento que se repitió en 4 ocasiones, fue principalmente el número de postlarvas presentes en los recipientes, ya que en cada ocasión para los diferentes parámetros a estimar se requirieron ± 1000 a 1200 organismos, por lo que en cuatro días de muestreo durante la metamorfosis, se necesitaron entre 4000 y 4800 postlarvas. Estas cantidades hicieron laborioso el número de muestreos en los 10 días que se pretendía muestrear. Cuando el número de postlarvas fue mayor, entonces se realizaron más muestreos y cuando el número fue menor se espaciaron dichos muestreos, para poder completar las muestras de postlarvas.

En todos los tratamientos se realizaron cambios de agua filtrada hasta $0.2 \mu\text{m}$ diariamente. Se les proporcionó aireación constante con mangueras de $1/8''$, con una pipeta Pasteur en un extremo.

Tratamiento 1.- El tratamiento con agua filtrada a $0.2 \mu\text{m}$ y en un volumen de 1.5 litros. Cada 24 horas se renovó la totalidad del agua, con las mismas características. Se tomaron 2 muestras de 80 y 100 postlarvas para la determinación de la razón carbón, nitrógeno (C:N) y peso seco el día 0, como larva competente, a los 4 días de iniciar la

metamorfosis y al día 12. Se utilizaron seis cubetas de 12 litros de capacidad, cada una con 1500 postlarvas. Se tomaron muestras de 200 larvas competentes y 100 postlarvas para la determinación de carbón y nitrógeno (C:N) (dos repeticiones) y 4 muestras de peso seco. Las muestras se tomaron el día 0 (las larvas competentes) y los días 2 y 10 (las postlarvas).

Tratamiento. 2.- El tratamiento con agua filtrada a $0.2 \mu\text{m}$ y en un volumen de 1.5 litros. Cada 24 horas se renovó la totalidad del agua, con las mismas características. Se tomaron muestras de 200 larvas competentes y 100 postlarvas para la determinación de carbón y nitrógeno (C:N) (dos repeticiones) y 4 muestras de peso seco los días 0 (larva competente), a las 24 horas después de la metamorfosis, a los 6 y 10 días.

Tratamiento. 3.- El tratamiento con agua filtrada a $0.2 \mu\text{m}$ y en un volumen de 1.5 litros. Cada 24 horas se renovó la totalidad del agua, con las mismas características. Se tomaron muestras de 200 larvas competentes y 100 postlarvas para la determinación de carbón y nitrógeno (C:N) (dos repeticiones) y 4 muestras de peso seco los días 0, 1, 2, 6, y 10.

Tratamiento. 4.- El tratamiento con agua filtrada a $0.2 \mu\text{m}$ y en un volumen de 1.5 litros. Cada 24 horas se renovó la totalidad del agua, con las mismas características. Se tomaron muestras de 200 larvas competentes y 100 postlarvas para la determinación de carbón y nitrógeno (C:N) (dos repeticiones) y 4 muestras de peso seco los días 0, 1, 2, 6, 8 y 10.

Tabla I.- Tratamientos en donde se determinó la relación de carbón:nitrógeno (C:N) en las postlarvas de erizo de mar blanco *L. pictus* cultivado con agua de mar filtrada 0.2 μm .

Tratamientos	Características	Réplicas	Días de Muestreo	Evaluación
T1	Postlarvas con agua de mar filtrada 0.2 μm	3	0, 2 y 10	Peso seco; C:N
T2	Postlarvas con agua de mar filtrada 0.2 μm	3	0, 2, 6 y 10	Peso seco; C:N
T3	Postlarvas con agua de mar filtrada 0.2 μm	3	0, 6 y 8	Peso seco; C:N
T4	Postlarvas con agua de mar filtrada 0.2 μm	3	0, 1, 2, 6, 8 y 10	Peso seco; C:N

IV. 4. 2. Biomasa y composición bioquímica de las postlarvas.

IV. 4. 2. 1. Peso Seco

En la determinación del peso orgánico seco y el peso de la ceniza de las postlarvas, se contaron y separaron de cada recipiente experimental de 60 a 80 postlarvas. Para la determinación del contenido de lípidos 150, 200 y 300 postlarvas. Las postlarvas fueron obtenidas de cada uno de los contenedores experimentales, individualmente, con la ayuda de un microscopio estereoscópico y un pincel. Se barrió el sustrato mientras se giraba el pincel para levantar los organismos sin dañarlos y colocarlos en tubos Eppendorf para centrífuga de 1.5 ml los cuales fueron congelados a -20°C .

Las muestras se colocaron en filtros Whatman de fibra de vidrio GF/C de 1.2 μm , de 47 mm de diámetro, previamente lavados con agua destilada e incinerados en una mufla a 490 $^{\circ}\text{C}$ por un período de 6 horas.

El peso seco de las larvas y postlarvas se estimó aplicando la metodología propuesta por Sorokin (1973), por lo que al momento de filtrar las muestras fueron lavadas con formiato de amonio al 3%, para eliminar las sales de los organismos. Los filtros con las muestras se colocaron en una estufa a 60 $^{\circ}\text{C}$ por 12 h para obtener el peso seco, posteriormente se calcinaron en una mufla durante 12 h para determinar la cantidad de cenizas y por diferencia, se obtuvo el peso orgánico seco.

IV. 4. 2. 2 Componentes bioquímicos

Para determinar el contenido de lípidos de las larvas y postlarvas, se realizó el mismo proceso de conteo y separación manual de las postlarvas por triplicado, en filtros Whatman de fibra de vidrio GF/C de 1.2 μm y 25 mm de diámetro.

La cantidad de postlarvas por muestra fue variable, se utilizaron de 80 a 150 en función de su disponibilidad, su tamaño y/o peso. A partir del día ocho de haber sido inducida a la metamorfosis, el número de postlarvas utilizado por muestra se redujo de 150 a 80 organismos, debido al incremento de su peso. En algunas ocasiones debido a una elevada mortalidad o a la poca larva inicial disponible, se obtenían pocas postlarvas o

se reducían el número de estas que estaban disponibles para muestras, de manera que no fue posible concluir los experimentos.

IV. 4. 3. Lípidos

Para la determinación del contenido de lípidos de las postlarvas, la técnica utilizada fue por el método de Pande *et al.*, (1963), modificado por López *et al.*, (1995), previa extracción con el método de Bligh y Dyer (1959), con cloroformo, metanol y agua. La curva de calibración Tripalmitina (disuelta en cloroformo), con gradiente de 0 a 150 µg/ml.

El porcentaje del contenido bioquímico en postlarvas se reporta como % y µg del peso seco orgánico (PO).

IV. 5. Determinación de Carbón Orgánico Disuelto (COD)

Se evaluó el COD en las muestras de agua (50 ml) recolectadas de los recipientes experimentales o del sistema de agua filtrada de 0.2 y 1.0 µm. El agua para las muestras se filtró con filtros Whatman GF/F de fibra de vidrio, previamente calcinados a 450 °C por 2 horas y se recolectaron en frascos oscuros de 50 ml, se les agregaron 200 µl H₃PO₄ al 50% y se refrigeraron. El COD se midió con un analizador de carbono orgánico, Total Organic Carbon (TOC), Shimatzu 5000 A.

IV. 6. Evaluación de juveniles

Las postlarvas, poco antes de concluir su metamorfosis, aunque presentan una forma de erizo y su testa está rodeada de espinas, todavía tienen una membrana que recubre su cavidad oral, por lo que la mandíbula no se encuentra expuesta y no pueden alimentarse. Cuando esta membrana se rompe, entonces su mandíbula emerge y es funcional y es cuando el erizo empieza su etapa juvenil al alimentarse con diatomeas bentónicas y bacterias del fondo marino. En condiciones de laboratorio hay que colocar los erizos en un portaobjetos y examinar su cavidad oral para observar si la mandíbula está expuesta o continúa cubierta por una membrana. Comúnmente los erizos presentan el movimiento de su mandíbula hacia los lados o hacia fuera lo que permite apreciar que está expuesta y funcional. Cuando este fue el caso se consideró que el organismo concluyó su etapa de metamorfosis. El tiempo que requieren para ser juveniles varía con la temperatura, por lo que en las condiciones experimentales, se consideró que a partir del día 10 los primeros erizos empezaron a completar la metamorfosis. Se tomaron al menos 30 erizos de cada tratamiento los días 12, 14 y 16 y fueron examinados en el microscopio compuesto para evaluar su desarrollo y clasificarlos como postlarvas o juveniles.

IV. 7. Respirometría

Para llevar a cabo la medición del consumo de oxígeno en los erizos se instaló un sistema de instrumentación de respirometría continua con canales múltiples (Strathkelvin

Instruments, Ireland). El instrumento cuenta con seis canales de medición de oxígeno conectados a una computadora. Al contar con seis sensores fue posible realizar cuatro repeticiones simultáneas con dos controles para la corrección de los valores obtenidos. Anterior a la medición se llevó a cabo la calibración de los electrodos polarográficos.

Los electrodos se calibraron al 0% de saturación de oxígeno, sumergiéndolos en una solución al 2% de sulfito de sodio en 0.01 M de borato de sodio, que actúa como amortiguador. Para la calibración del 100% de saturación de oxígeno, se utilizó agua de mar que fue aireada intensamente con una piedra de aireación de 1 pulgada. En ambas calibraciones la temperatura del agua fue constante y las mediciones se realizaron hasta que no se observaron variaciones en las lecturas de los electrodos.

Se realizaron dos ensayos preliminares para determinar el número adecuado para que en una hora se obtuviera un consumo promedio del 20% del oxígeno disuelto en las cámaras. Se utilizó una cámara con un volumen de agua de mar de 1.7 ml. Se realizaron pruebas con 50, 75, 100 y 150 larvas. La conveniencia de utilizar un número menor de organismos está relacionada con una reducción del trabajo y el tiempo que se requiere para separar ese número de organismos cuatro veces para cada una de las cámaras que representaron las repeticiones.

IV. 7. 1. Descripción de las cámaras respirométricas.

Las cámaras respirométricas consistieron en recipientes de acrílico que contienen en la parte central una camarilla interna con capacidad de 1.7 ml de agua una vez que el

electrodo se introduce en ésta. En el fondo, en su parte interna, se introduce un agitador magnético que es aislado del resto del recipiente por una malla que tiene una luz de 50 μm . Cuando el agitador magnético es movido por una plancha magnética, al girar, provoca un movimiento del agua contenida en la camarilla donde se encuentran los organismos y el respirómetro, de tal manera que la concentración de oxígeno en ese volumen de agua es uniforme, evitando que el oxígeno disminuya únicamente en la capa que está en contacto inmediato con los organismos.

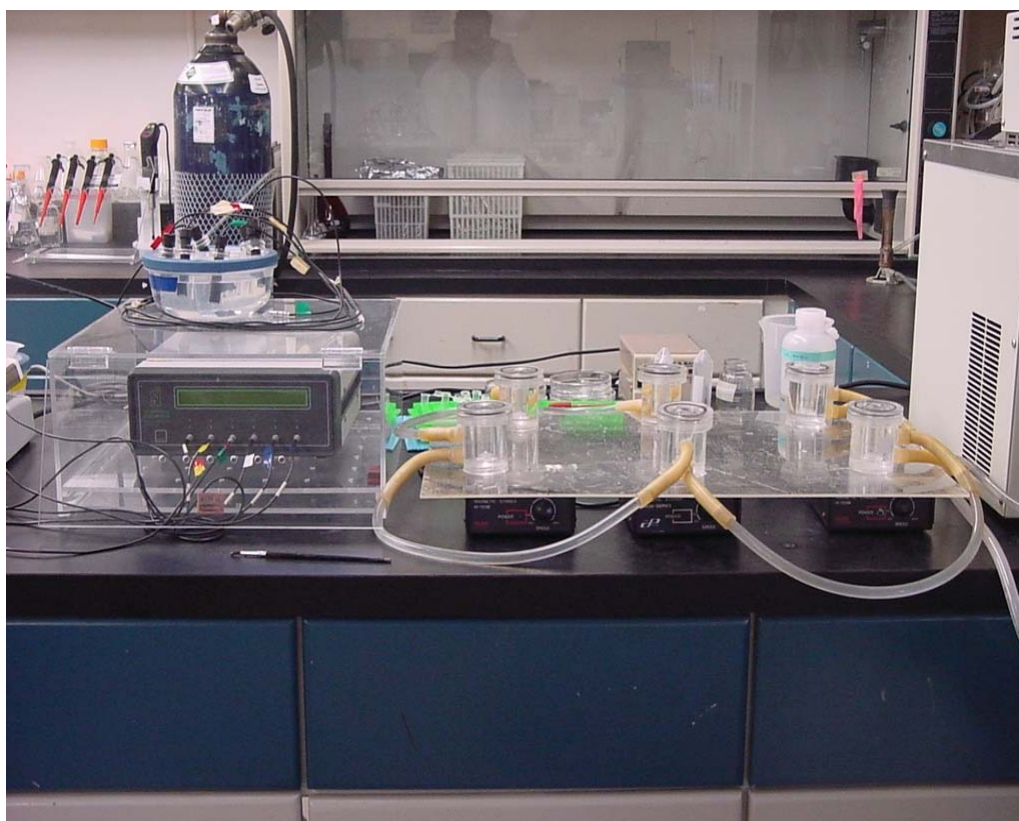


Figura 5. Respirómetro con 6 electrodos de medición simultánea del consumo de oxígeno de las larvas y postlarvas de erizo, donde se muestran las 6 cámaras respirométricas, conectadas con mangueras por donde circula el agua que mantiene la temperatura constante a 20⁰C.

La camarilla respirométrica está contenida dentro de un recipiente mayor que tiene una entrada y una salida para el agua, el cual mantiene la temperatura constante, debido a que están conectadas a un sistema de enfriamiento calibrado a la temperatura deseada, que en este caso fue de 20 °C. Esta temperatura correspondió a la del agua de mar superficial durante la época reproductiva de los erizos, en los meses de verano.

IV. 7. 2. Medición del consumo de oxígeno

Se seleccionaron 100 larvas y postlarvas para cuantificar su consumo de oxígeno en diferentes etapas y tiempos de desarrollo. Los tratamientos incluyeron larvas competentes y diferentes tiempos después de inducir las a la metamorfosis, cuando inician su desarrollo postlarval y que correspondieron a; 2, 4, 8, 24 horas, y de 2, 4, 6 y 8 días después de iniciada la metamorfosis.

En cada ocasión se prepararon primero cada una de las cámaras. Las cuales se lavaron con agua destilada, posteriormente se llenaron de agua que había sido aireada con fuerte agitación para saturarla de oxígeno. Posteriormente, se separaron las larvas o las postlarvas contenidas en las cajas de Petri con ayuda de un microscopio estereoscópico y con la punta de un pincel fino se pasaron a las cámaras respirométricas. Se dejó transcurrir un tiempo de 15 minutos de aclimatación y se iniciaron las mediciones de los cambios de oxígeno en cada una de las cámaras. Las mediciones de oxígeno en el respirómetro Strathkelvin se detuvieron cuando la reducción del oxígeno en las cámaras

fue aproximadamente del 20%, quedando un 80% de la concentración inicial de oxígeno disuelto en las cámaras.

Las postlarvas se recuperaron de cada cámara y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml, posteriormente se transfirieron y pesaron en filtros Whatman de fibra de vidrio previamente quemados y tarados, para obtener su peso seco. Los datos de peso seco fueron utilizados como variable de normalización.

Al final de las mediciones se calcularon las tasas (pendientes) de consumo de oxígeno, como % O₂ min⁻¹ para cada una de las cámaras, mediante regresiones lineales. La tasa de consumo de oxígeno (tasa metabólica) de los organismos en las camarillas se estimó aplicando la siguiente ecuación:

$$VO_2 = \frac{(m * C_s * 60 \text{ min})}{(100\% * 1h * n)} \quad (1)$$

Donde:

VO₂ = Tasa metabólica del organismo experimental (μL O₂/h/Org).

m = pendiente del consumo de O₂ en la cámara (% O₂/min).

C_s = cantidad total de O₂ en la cámara al 100% de saturación (μL O₂).

n = número de organismos dentro de la cámara.

La concentración de oxígeno al 100% de saturación se obtuvo utilizando las tablas de solubilidad de O₂ reportados por Green y Carrit (1967), tomando en cuenta la temperatura y salinidad del agua en el experimento a una atmósfera de presión. A cada cámara se le restó el consumo promedio de oxígeno obtenido en las cámaras sin organismos (blancos).

La conversión de mg de O₂ a Joules se realizó multiplicando por 14.3 (Lucas, 1996). La conversión de moles de O₂ a kJoules se realizó multiplicando por 468 kJ mol O₂⁻¹, y después a Joules multiplicando por 1000 (Gnaiger, 1983).

IV. 7. 3 Transformaciones Energéticas

La Tasa Metabólica Específica (TME) se calculó en pmol O₂ ind⁻¹ h⁻¹ y se estandarizó a biomasa dividiendo la tasa respiratoria entre el peso seco.

La biomasa fue convertida en unidades de energía usando una energía equivalente para combustión en la entalpia para cada fracción:

Lípidos = se multiplicaron por 39.5 kJ g⁻¹ para obtener Joules ind⁻¹

Proteína = 24.0 kJ g⁻¹ para obtener Joules ind⁻¹

Las tasas de consumo de oxígeno fueron convertidas a unidades de energía utilizando una relación oxientalpica de 468 kJ mol O₂⁻¹; la cual es el promedio equivalente para proteína de 527 kJ mol O₂⁻¹, lípidos 441 kJ mol O₂⁻¹ (Gnaiger, 1983).

La cantidad de energía en mJoules ind⁻¹ de las larvas y postlarvas fue calculada a partir del peso seco de los organismos, y al multiplicar este peso por el factor de 31.5 kJ g⁻¹ que es la cantidad de energía promedio correspondiente a los lípidos.

Para determinar el consumo de energía para diferentes tiempos, se consideró el consumo de mg de O₂ y se multiplicó por el factor de 14.3 (Lucas, 1996), por lo tanto el valor calculado en mJoules es para esa respiración por hora y se suman las horas transcurridas

hasta la siguiente medición. Para determinar el siguiente consumo se procedió de la misma manera para cada intervalo de tiempo. Para determinar el consumo en todo el intervalo, se multiplica por el número de horas transcurridas.

La relación C:N es obtenida en %, y para obtener la cantidad de carbón y de nitrógeno por larva se dividió la cantidad de carbón en la muestra entre el número de larvas.

IV. 8. Utilización de cultivos de diatomeas bentónicas y COD

Para estimar el crecimiento de las postlarvas se tomaron al azar 20 individuos de cada recipiente experimental (60 en total) y se midió su testa con un micrómetro en el microscopio estereoscópico. De cada tratamiento se calculó la media y su error estándar. Para comparar con otros tratamientos se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza de los datos, si se cumplió con la normalidad y la homogeneidad de varianzas, se procedió a realizar un ANOVA de una vía entre las medias calculadas de los tratamientos en un mismo tiempo. Cuando los datos no fueron normales o no se cumplió con homogeneidad de varianzas se procedió con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Zar, 1999)

Los cálculos de supervivencia se realizaron con base en los conteos visuales totales de las postlarvas de cada repetición de cada tratamiento en diferentes tiempos, los cuales variaron para cada experimento, en el primero a los, 0, 2, 8 y 14 días y en el segundo a los 0, 2, 8, 12 y 18 días. Los datos de porcentaje de supervivencia fueron

transformados mediante la prueba de arco-seno para aplicar las pruebas estadísticas. En casos en que los datos no cumplieron con el requisito de normalidad y homogeneidad de varianzas, se utilizó la prueba estadística no-paramétrica de Kruskal-Wallis a un nivel de significancia del 5%. Cuando se detectaron diferencias estadísticas, se procedió a la realización de pruebas *a posteriori* de contraste múltiple de Tukey (Steel y Torrie, 1986; Zar, 1999).

V.- RESULTADOS

La temperatura del agua durante los experimentos para determinar si el carbón orgánico disuelto producido por las diatomeas bentónicas es utilizado por las postlarvas fluctuó entre los 18 y 22 °C.

V. 1. Las diatomeas bentónicas y el COD

En el primer experimento; a partir de un tamaño promedio inicial de $580 \pm 16 \mu\text{m}$, en 15 días las postlarvas del tratamiento D1 alcanzaron un tamaño de $821 \pm 20 \mu\text{m}$ que fue significativamente más grande que el resto ($p < 0.001$, Tabla II, Figura 6). Este valor fue seguido por los del tratamiento D3, con $713 \pm 15 \mu\text{m}$. Las tallas menores finales se registraron en los tratamientos D6 y en el control C, con $605 \pm 22 \mu\text{m}$ y de $591 \pm 15 \mu\text{m}$ respectivamente. Se presentaron diferencias significativas en el crecimiento de los erizos entre los tratamientos ($p < 0.001$), con excepción de los organismos de los tratamientos C y D6 ($p > 0.05$, Tabla II). La supervivencia postlarval fue más alta en los erizos del tratamiento D1, con 41% ($p < 0.05$, Tabla II; Figura 7), seguida por los del tratamiento D3 con 27% y C 17% y el valor más bajo fue de 15% para las postlarvas del tratamiento D6.

El COD en el agua de mar filtrada se estimó los días 1, 3 y 6, y varió de 54 a 60 $\mu\text{mol C L}^{-1}$. En los tratamientos con diatomeas bentónicas, después de añadirse el agua filtrada a los cultivos de diatomeas y de haber permanecido el agua 24 horas en el tratamiento D se

presentaron los valores más altos con 162-178 $\mu\text{mol C L}^{-1}$, seguido por el D3, 120-135 $\mu\text{mol C L}^{-1}$ y los valores mas bajos fueron en D6, con 101 y 117 $\mu\text{mol C L}^{-1}$ (Figura 8).

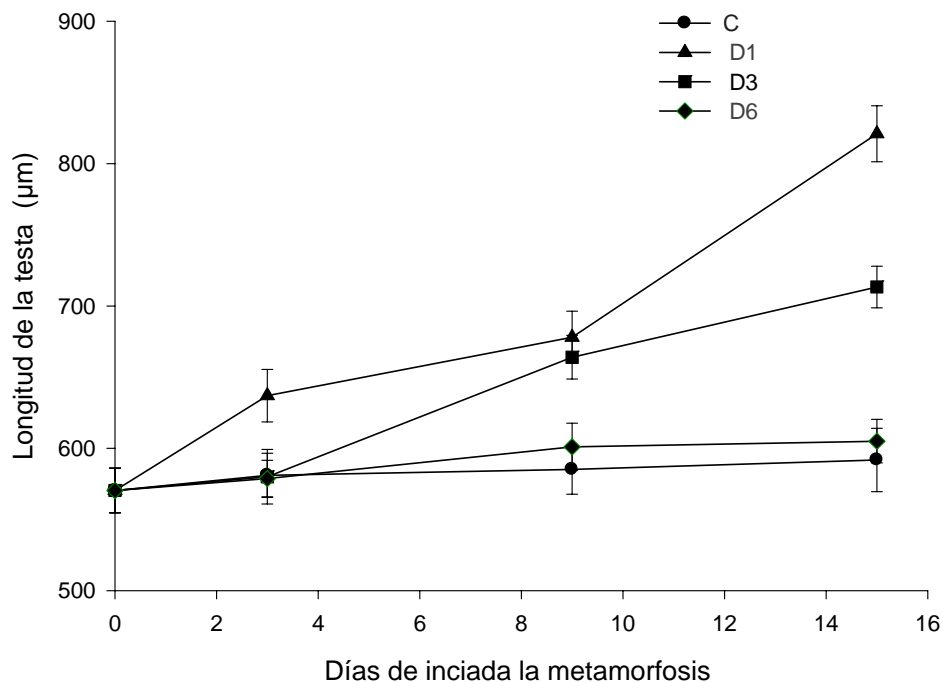


Figura 6. Crecimiento (μm) de las postlarvas de erizo blanco, *L. pictus*, cultivadas y expuestas a diatomeas bentónicas en diferentes días a partir de su metamorfosis; C = Control con agua filtrada a 0.2 μm ; D1 = Diatomeas bentónicas siempre presentes desde el primer día; D3 = Diatomeas bentónicas presentes desde el tercer día; D6 = Diatomeas bentónicas presentes desde el sexto día. Las barras verticales corresponden al error estándar.

Tabla II. Pruebas *a posteriori* de Tukey, para valores de crecimiento y supervivencia de la postlarva de *L. pictus* en diferentes condiciones experimentales; C = control, con agua filtrada a 0.2 μm ; D1 = Diatomeas bentónicas presentes desde el primer día; D3 = Diatomeas bentónicas presentes desde el tercer día; D6 = Diatomeas bentónicas presentes desde el sexto día; (ns = no significativa con $p \geq 0.05$ y altamente significativa *** = $p \leq 0.001$).

CRECIMIENTO				
Tratamientos				
	C	D3	D6	D1
C		***	ns	***
D3	***		***	***
D6	ns	***		***
D1	***	***	***	

SUPERVIVENCIA				
Tratamientos				
	C	D3	D6	D1
C		**	ns	**
D3	**		**	**
D6	ns	***		**
D1	**	**	**	

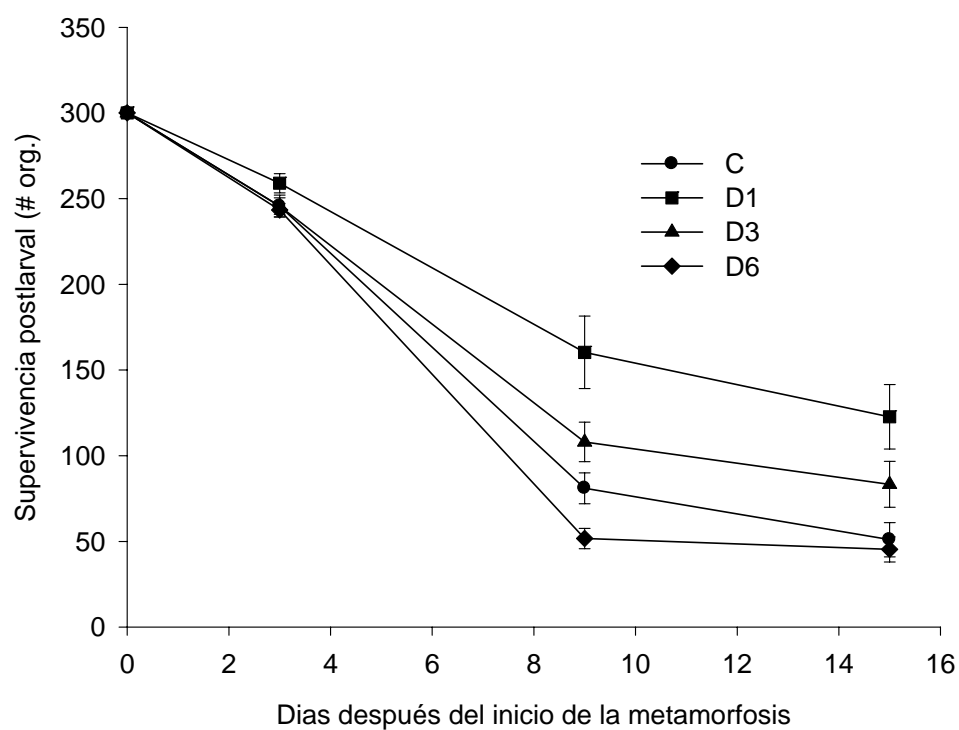


Figura 7. Supervivencia en número de postlarvas y porcentaje del erizo blanco, *L. pictus*, cultivadas y expuestas a diatomeas bentónicas en diferentes días a partir de su metamorfosis; C = Control con agua filtrada a $0.2 \mu\text{m}$. D1 = Diatomeas bentónicas siempre presentes desde el primer día; D3 = Diatomeas bentónicas presentes desde el tercer día; D6 = Diatomeas bentónicas presentes desde el sexto día. Las barras verticales corresponden al error estándar.

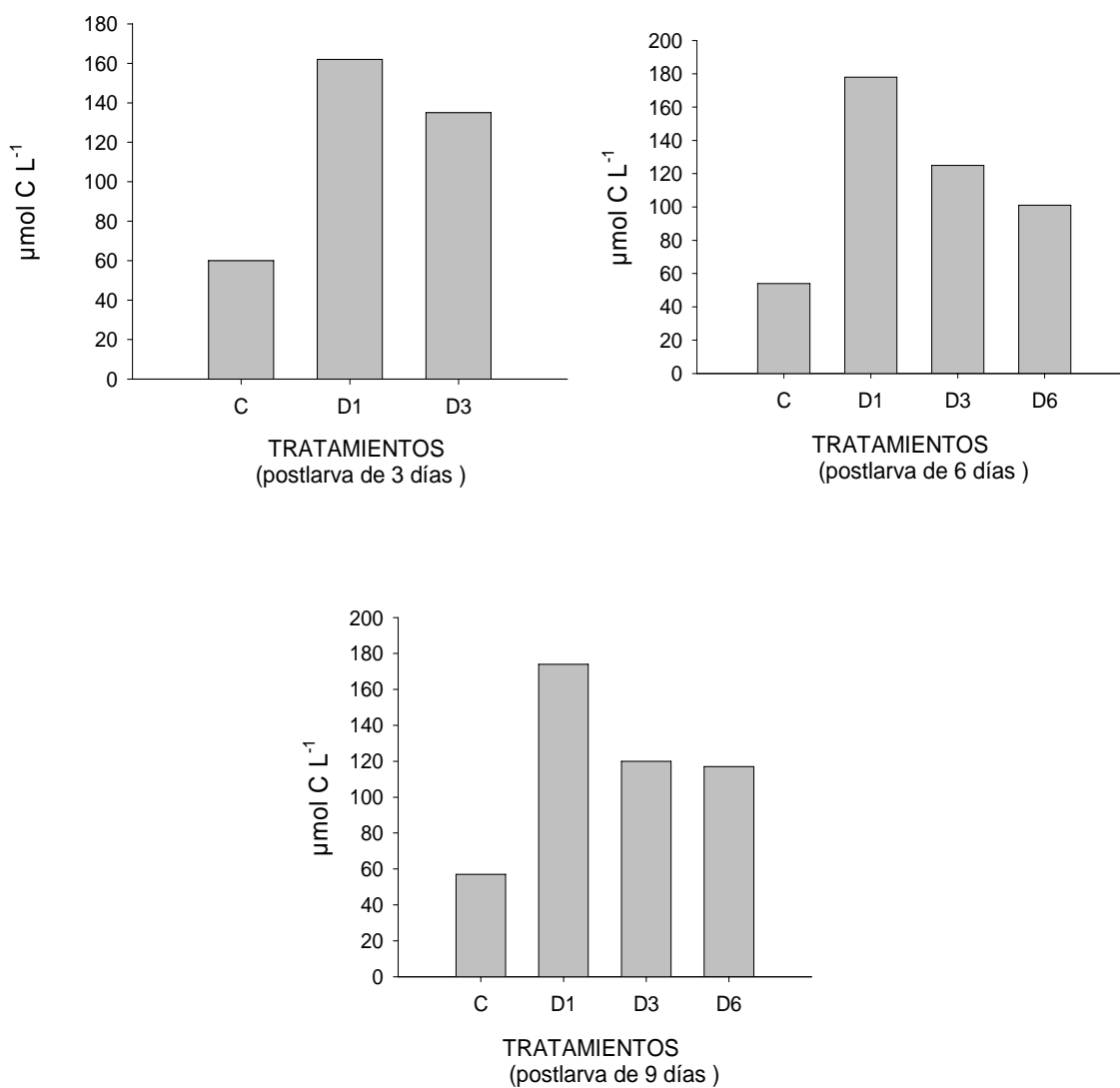


Figura 8. Cantidad de Carbón Orgánico Disuelto, 24 horas después de haber realizado el cambio de agua filtrada ($0.2 \mu\text{m}$) en los diferentes cultivos de postlarvas de erizo blanco *L. pictus* con diatomeas bentónicas inoculadas en diferentes días. Los valores para C, D1, D3 y D6 son del agua que permaneció 24 horas después de ser añadida a los cultivos de las postlarvas. Tratamiento D1 = postlarvas con diatomeas bentónicas desde el primer día; D3 = postlarvas con diatomeas bentónicas desde el tercer día; D6 = postlarvas con diatomeas bentónicas desde el sexto día; C = postlarvas sin diatomeas y con agua filtrada a $0.2 \mu\text{m}$. Cada barra representa una sola medición.

V. 2. El COD sin diatomeas bentónicas

V. 2. 1 Crecimiento y supervivencia

En el segundo experimento se evaluó el crecimiento y la supervivencia del erizo los días 1, 4, 8, 12 y 18. El último día las postlarvas del tratamiento D (con presencia permanente de diatomeas) alcanzaron un tamaño de $924 \pm 20 \mu\text{m}$, seguidas por las de D1 y D4, con longitudes máximas de $798 \pm 23 \mu\text{m}$ y $809 \pm 20 \mu\text{m}$ respectivamente (Figura 9). Las longitudes menores se obtuvieron en los erizos de los tratamientos D8 y C, con $676 \pm 9 \mu\text{m}$ y $660 \pm 10 \mu\text{m}$ respectivamente.

La supervivencia de las postlarvas presentó un patrón similar en todos los tratamientos. Al final, los valores más altos, en el día 18, fueron con las postlarvas en el tratamiento D con 78%, y del 76% en D1 (Figura 10). Seguidos por las postlarvas del tratamiento D4 con 67% y finalmente de 44% y 37% en D8 y C respectivamente. En la prueba ANOVA existieron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre la supervivencia de las postlarvas de los diferentes tratamientos y con la prueba *a posteriori* de Tukey resultaron diferencias entre D, con D1 y D4, y este último con todos los tratamientos, así como también para D8 y C con el resto, como se muestra en la Tabla III.

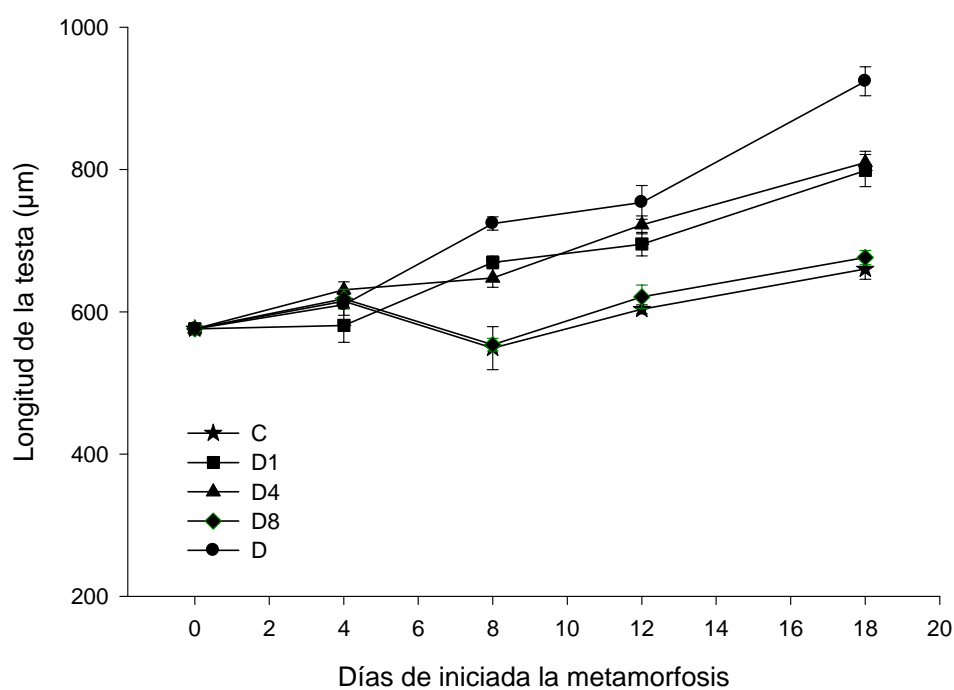


Figura 9. Crecimiento (μm) de las postlarvas de erizo blanco *L. pictus* cultivadas y expuestas a agua con COD producido por la biopelícula de diatomea bentónica *N. incerta* y agregado al cultivo de la postlarva en diferentes días a partir de su metamorfosis. Tratamientos; C = Agua filtrada a $1 \mu\text{m}$, sin diatomeas bentónicas; D = Diatomeas bentónicas presentes desde el primer día; D1 = COD añadido desde el primer día D4 = COD añadido desde el cuarto día; D8 = COD añadido desde el octavo día. Las barras verticales corresponden al error estándar.

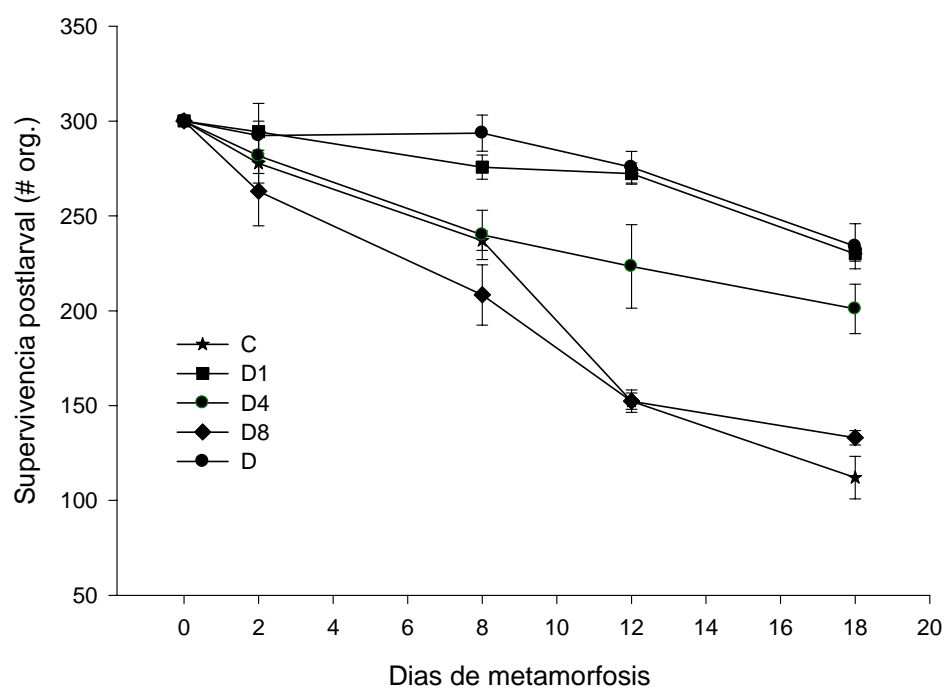


Figura 10. Supervivencia en número de postlarvas y porcentaje de las postlarvas de erizo blanco *L. pictus* cultivadas y expuestas a agua con carbón orgánico disuelto (COD) producido por la biopelícula de diatomea bentónica *N. incerta* y agregado al cultivo de la postlarva en diferentes días a partir de su metamorfosis. C = Agua Filtrada a 1 μm , sin diatomeas bentónicas. D = Diatomeas bentónicas presentes desde el primer día; D1 = COD añadido desde el primer día; D4 = COD añadido desde el cuarto día; D8 = COD añadido desde el octavo día.

Tabla III. Pruebas *a posteriori* de Tukey, para valores de crecimiento y supervivencia de las postlarvas *L. pictus*. Tratamientos; C = Agua Filtrada a 1 μm , sin diatomeas bentónicas. D = Diatomeas bentónicas presentes desde el primer día; D1 = COD añadido desde el primer día D4 = COD añadido desde el cuarto día; D8 = COD añadido desde el octavo día (ns = no significativa con $p \geq 0.05$; significativa * = $p \leq 0.05$; muy significativa ** = $p \leq 0.01$ y altamente significativa *** = $p \leq 0.001$).

CRECIMIENTO					
Tratamientos					
	C	D1	D4	D8	D
C		*	**	ns	***
D1	*		ns	**	**
D4	**	ns		**	**
D8	ns	**	**		***
D	***	**	**	***	

SUPERVIVENCIA					
Tratamientos					
	C	D1	D4	D8	D
C		***	***	ns	***
D1	***		ns	***	ns
D4	***	ns		***	*
D8	ns	**	***		***
D	***	ns	*	***	

V. 3. Producción y consumo de COD

El COD en el cultivo de *N. incerta* presentó una concentración inicial de $138 \mu\text{mol C L}^{-1}$, 24 horas después fue de $208 \mu\text{mol C L}^{-1}$, el día dos, $384 \mu\text{mol C L}^{-1}$, el día cuatro $519 \mu\text{mol C L}^{-1}$ y el día ocho $587 \mu\text{mol C L}^{-1}$, como se muestra en la figura 11. El día 12 el COD no fue cuantificado, pero se considera que debió ser mayor a la cantidad presentada, de acuerdo a la tendencia mostrada.

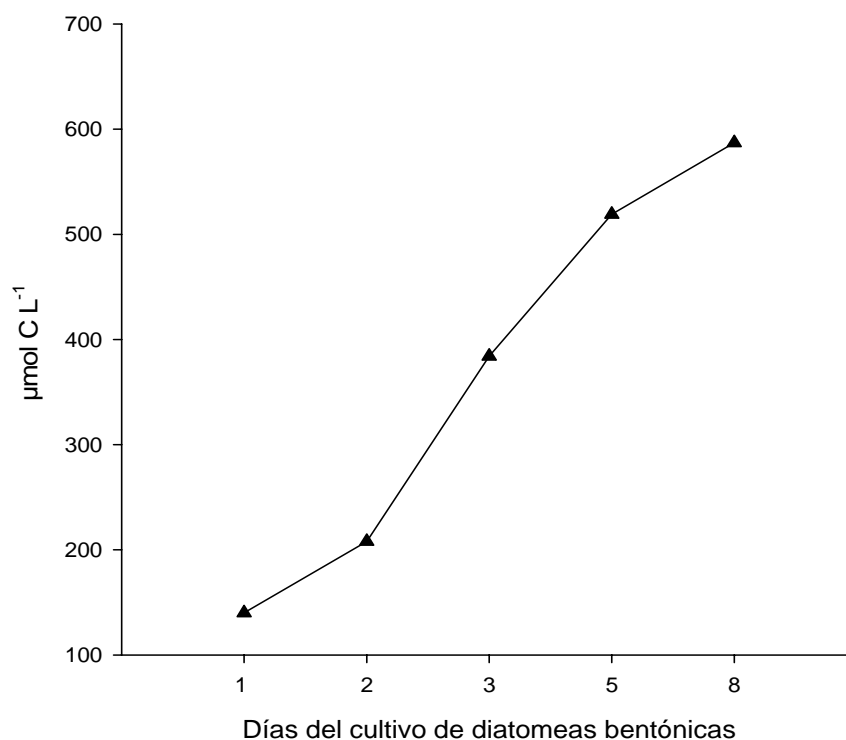


Figura 11. Carbono orgánico disuelto (COD, $\mu\text{mol C L}^{-1}$) producido en un cultivo de la diatomea bentónica *Navicula incerta* durante 8 días, con cambios de agua filtrada $0.2 \mu\text{m}$ cada 24 horas. Las muestras analizadas fueron tomadas 24 horas después del cambio de agua. Cada punto corresponde a un dato de la concentración obtenida en el agua de cultivo de la diatomea.

La cantidad de COD remanente, 24 horas después de haber sido incorporado en los tratamientos, D1, D4 y D8, está representada por las barras en la figura 12 para los días 4, 8 y 12. El día 4, de una concentración inicial de $519 \mu\text{mol C L}^{-1}$, el COD disminuyó para los diferentes tratamientos entre 205 y $208 \mu\text{mol C L}^{-1}$, en el día 8 a 174 y $226 \mu\text{mol C L}^{-1}$, y el día 12 a 160 y $230 \mu\text{mol C L}^{-1}$.

Los valores del tratamiento D, con el cultivo de *N. incerta*, los días 8 y 12 fueron mayores a los demás tratamientos, con $226 \mu\text{mol C L}^{-1}$ y $230 \mu\text{mol C L}^{-1}$ respectivamente. El tratamiento C con agua filtrada mantuvo los valores muy similares.

El COD incorporado el día 8 en los recipientes fue de $587 \mu\text{mol C L}^{-1}$ y 24 horas después en los tratamientos sin diatomeas fue en D1 de $194 \mu\text{mol C L}^{-1}$, que significó un consumo del 68% y por último en D8 de $151 \mu\text{mol C L}^{-1}$, con un consumo del 74%.

V. 3. 1. Evaluación de juveniles.

Al revisar la mandíbula de las postlarvas, se consideraron como juveniles los erizos que tuvieron la mandíbula expuesta, ya que a partir de ese momento es una mandíbula funcional (Figura 13). El 45% de los erizos expuestos a las películas de diatomeas bentónicas desde el primer día llegaron a su estadio juvenil el día 12 y presentaron diferencias significativas con los otros tratamientos ($p < 0.05$). En ese mismo tiempo los erizos que se expusieron a las diatomeas bentónicas hasta el tercer día el 32% fueron juveniles y de los erizos mantenidos con agua filtrada de $0.2 \mu\text{m}$, el 28%.

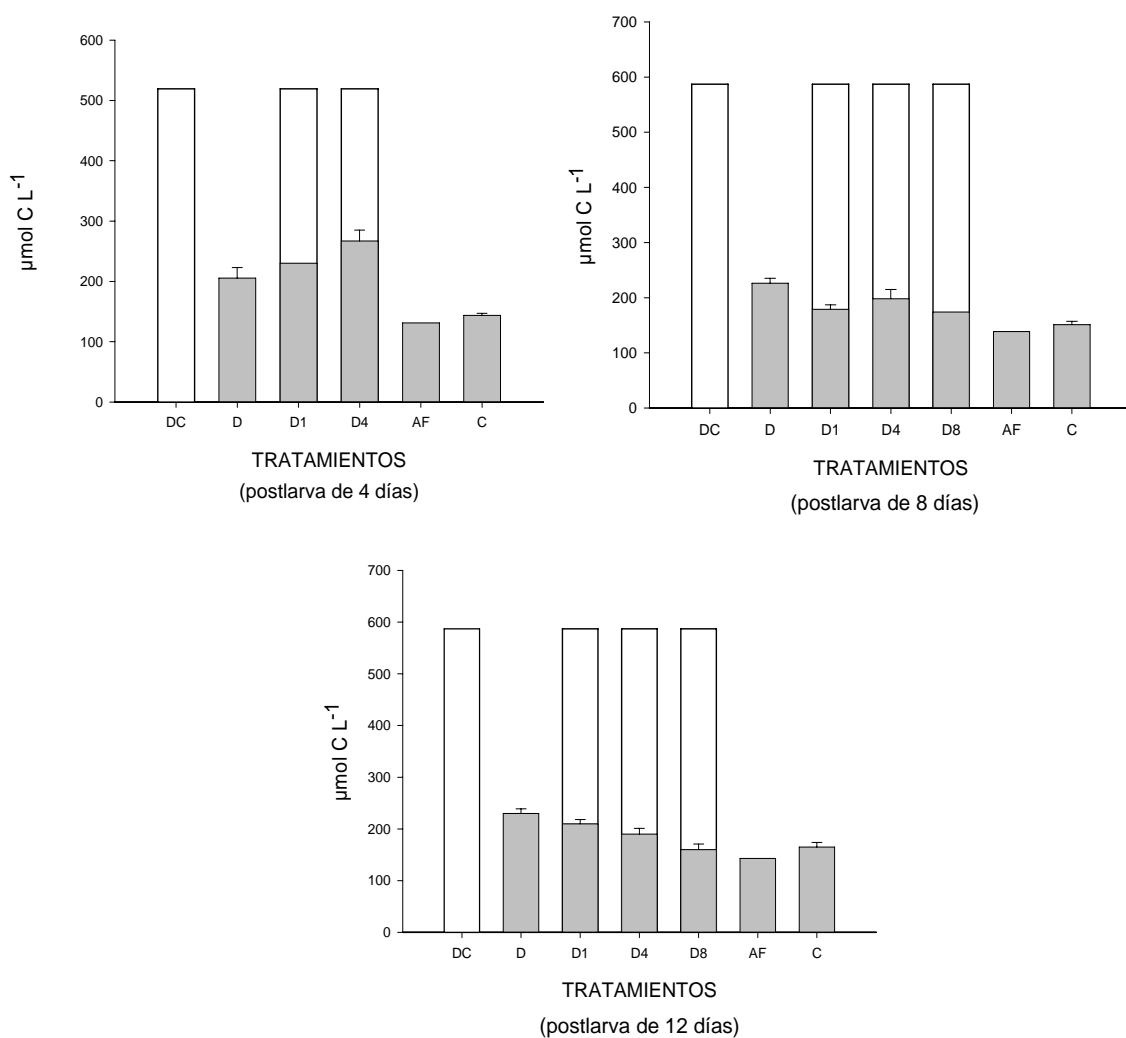


Figura 12. Asimilación de carbón orgánico disuelto (COD, $\mu\text{mol C L}^{-1}$) por las postlarvas de *L. pictus* de diferentes edades. La barra clara (DC) representa el COD producido por las diatomeas bentónicas que fue incorporado en los tratamientos D1, D4 y D8. Las barras oscuras representan el COD en cada tratamiento 24 horas después del cambio de agua. Tratamientos: D = Postlarvas con diatomeas bentónicas; AF = Agua filtrada a $1\mu\text{m}$ después de 24 horas; C = Contenido de carbón en el agua filtrada. Las líneas verticales corresponden al error estándar (95%).

En las siguientes evaluaciones el número fue incrementándose cada día, hasta que el día 15, el 100% de los erizos completa su metamorfosis de los tratamientos D1 y D3, en cambio el 78% de los mantenidos con agua filtrada completaron esta etapa (Figura 13).

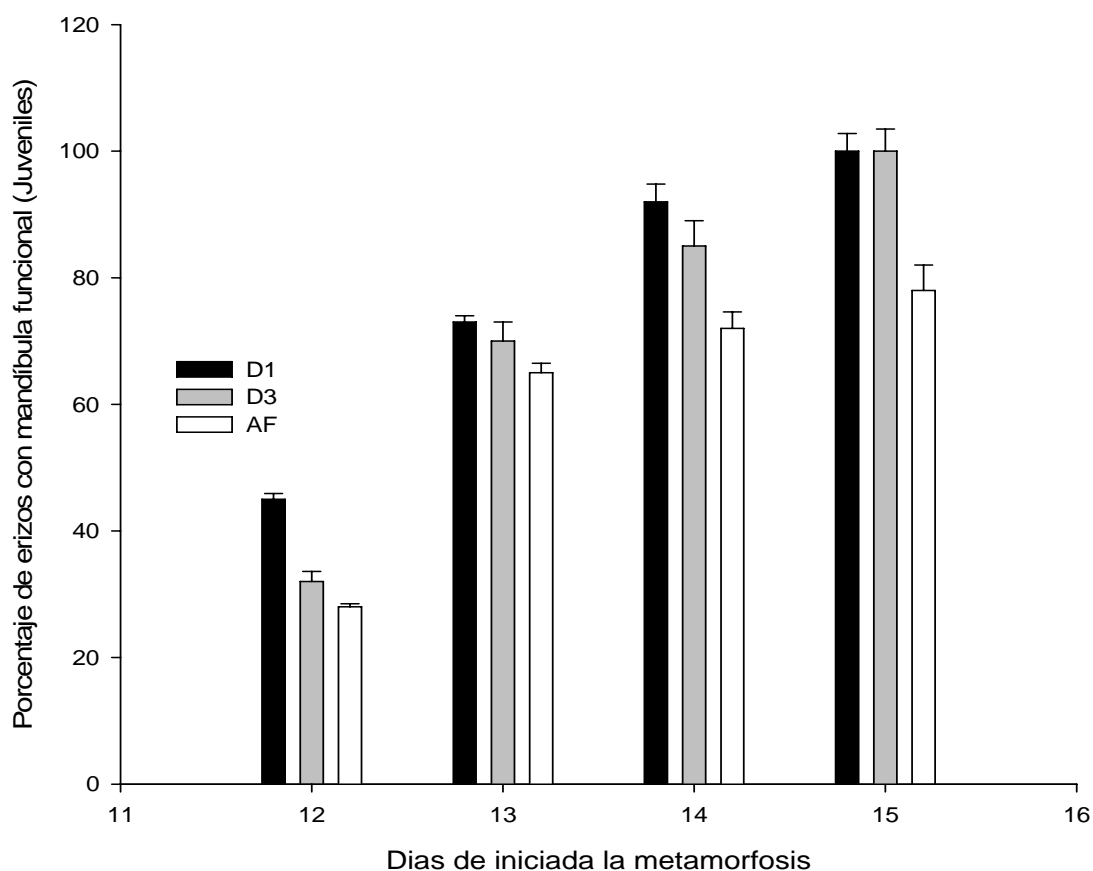


Figura 13. Porcentaje de erizos *L. pictus* que al tener su mandíbula funcional son considerados juveniles y que estuvieron expuestos como postlarvas a diferentes condiciones de cultivo; D1 = Con diatomeas bentónicas desde el primer día; D3 = Con diatomeas bentónicas desde el tercer día y AF = Con agua filtrada (0.2 μm). Las barras verticales representan el error estándar.

VI. Relación Carbón:Nitrógeno (C:N) en postlarvas

VI.1 Tamaño de la muestra

En las pruebas para determinar el tamaño de la muestra para la estimación del contenido de lípidos, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla IV, donde se presentan el porcentaje para las postlarvas de erizo *L. pictus*.

El tamaño de las muestras de 40, 80, 120, 160 y 200 postlarvas, muestra los porcentajes de lípidos con una variación máxima del 9% entre el valor más bajo registrado de 30% y el más alto de 39% correspondiendo a las muestras de 40 y 160 postlarvas, respectivamente. Los valores de 35 y 36 %, fueron para los tamaños de muestras de 80 y 120 respectivamente.

Tabla IV. Evaluación de diferentes tamaños de muestras de postlarvas de *L. pictus*, para la determinación del contenido porcentual de lípidos.

Número de postlarvas	Lípidos %
40	39
80	35
120	36
160	30

VI. 2. Contenido bioquímico: Carbón: Nitrógeno

Los porcentajes de carbón y nitrógeno en postlarvas de erizo para diferentes tamaños de muestras estimadas por triplicado, se presentan en la Tablas Va y Vb. En el contenido de carbón, la mayor variación para tamaños de muestras de 150, 250 y 300 postlarvas fue del 5% entre réplicas, para el tamaño de 150 postlarvas (Tabla Va), sin embargo no se presentaron diferencias significativas (ANOVA; $\alpha = 0.05$). Las medias promedio presentaron valores similares. En el caso del nitrógeno la mayor variación en el porcentaje también fue para las muestras de 150 postlarvas con una variación de 1.5%. Tampoco fueron significativas las diferencias entre los distintos tamaños ($\alpha = 0.05$).

Una segunda prueba de tamaños de muestra se realizó tomando muestras por triplicado, con 150, 200 y 250 postlarvas, en las cuales se determinó el contenido de carbón y nitrógeno (Vb). En la determinación de carbón, la mayor diferencia entre los diferentes tamaños de muestras fue del 5% y no hubo diferencias significativas entre ellas ($\alpha = 0.05$). En la determinación del contenido de nitrógeno la mayor diferencia fue de 1.5% y tampoco se presentaron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$), entre los distintos tamaños de muestras.

En la siguiente evaluación del tamaño de la muestra, se trabajó con 80, 100 y 150 postlarvas para la determinación del contenido de carbón y de nitrógeno en larvas competentes, antes de iniciar la metamorfosis y postlarvas de 6 días después de indicada la metamorfosis (Tabla VI). La mayor diferencia del porcentaje de carbón entre tamaños de muestra fue del 4%, entre los tamaños de 80 y 150 postlarvas.

Tabla Va. Evaluación del tamaño de la muestra, para estimar el número de organismos en la determinación de la relación de C:N en postlarvas del erizo de mar *Lytechinus pictus*.

# de Postlarvas	CARBON (%)		
150	38	35	40
250	36	39	38
300	40	38	38
media	38	37.3	38.7
E. std	1.15	1.2	0.7

# Postlarvas	NITRÓGENO (%)		
150	8	7.7	9.2
250	8.5	8.6	8.5
300	9	8.2	7.7
media	8.5	8.2	8.5
E. std	0.3	0.3	0.4

Tabla Vb Evaluación del tamaño de la muestra, para estimar el número de organismos en la determinación de la relación de C:N en postlarvas del erizo de mar *Lytechinus pictus*.

# de Postlarvas	CARBÓN (%)	NITRÓGENO (%)
150	38	8
150	36	8.5
150	40	9
media	38	8.5
E. std	1.15	0.3

# de Postlarvas	CARBÓN (%)	NITRÓGENO (%)
200	35	7.7
200	39	8.6
200	38	8.2
media	37.3	8.2
E. std	1.2	0.3

# de Postlarvas	CARBÓN (%)	NITRÓGENO (%)
250	40	9.2
250	38	8.5
250	38	7.7
media	38.7	8.5
E. std	0.7	0.4

En el caso de la determinación del nitrógeno la mayor diferencia fue del 1.1%. No se encontraron diferencias significativas ni entre los valores de carbón, ni del nitrógeno (ANOVA, $\alpha = 0.05$). Evaluación del tamaño de la muestra para estimar la relación de C:N en larvas y postlarvas de *Lytechinus pictus*. En la postlarva de 8 días de iniciada la metamorfosis, se observó una reducción significativa en el contenido de carbón, mayor del 50%, pero resultados muy similares entre los distintos tamaños, con una variación del 2%. Para el nitrógeno se observó también una disminución mayor del 50% y una variación de solamente el 0.5% entre tamaños de muestra.

Los valores promedio de la relación C:N que se obtuvieron en los cuatro experimentos con un único tratamiento, al mantener las postlarvas con agua filtrada a 0.2 μm , se presentan en la Figura 14. Se encontró una dominancia en el contenido de carbón y una menor proporción de nitrógeno desde larva competente hasta el día 10, que correspondió al último día que se llevó a cabo su cuantificación. También ocurrió un decremento continuo en el porcentaje del carbón y del nitrógeno durante el proceso de metamorfosis. El porcentaje de carbón de 39.2% presente como larva competente, disminuyó hasta el 15.9% en la postlarva a los 10 días de haber iniciado la metamorfosis y el nitrógeno de un porcentaje inicial de 7.9% disminuyó al 1.3%, en el mismo período.

Tabla VI. Evaluación del tamaño de la muestra para estimar la relación de C:N en larvas y postlarvas de *Lytechinus pictus* (ns = no significativa con $p \geq 0.05$).

Larvas Competentes				
Repeticiones	# Larvas	%C	%N	(P>0.05)
3	80	39	8.6	n.s
3	100	35	7.7	
3	150	38	7.7	
Postlarvas de 8 días				
3	80	15	3.0	n.s.
3	100	17	3.5	
3	150	16	3.1	

Para las larvas competentes, el porcentaje de lípidos obtenido de la transformación con el coeficiente de 39 kJ fue del 56% (137 mJ) y de proteínas con el coeficiente de 24 kJ fue del 44% (108 mJ). Se presentaron diferencias significativas entre los porcentajes de carbón y de nitrógeno durante la metamorfosis ($p < 0.05$) y los resultados de las pruebas *a posteriori* de Tukey se presentan en las tablas VII para el contenido de carbón y en la VIII, para el contenido de nitrógeno.

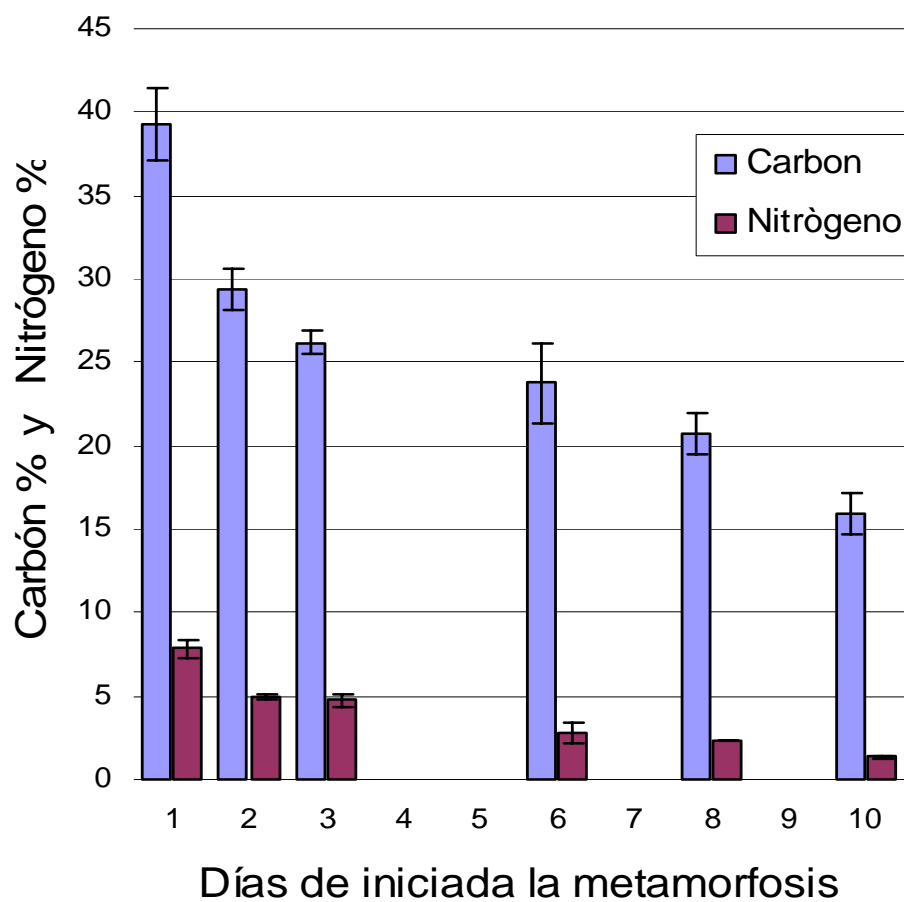


Figura 14. Valores promedio de los cambios en la relación de Carbono:Nitrògeno, obtenida en cultivos de postlarva de erizo blanco *Lytechinus pictus*, a partir de la metamorfosis en agua de mar filtrada a $0.2 \mu\text{m}$. Las muestras se obtuvieron los días 0 como larva competente (=1), 2, 3, 6, 8 y 10. Las líneas verticales corresponden al error estándar.

Tabla VII.- Pruebas *a posteriori* de Tukey en el contenido de carbón durante la metamorfosis del erizo blanco *L. pictus*, para los días 0 (larva competente), 1, 2, 6, 8 y 10 (ns = no significativa con $p \geq 0.05$; ***= $p < 0.001$).

	LC	1 día	2 días	6 días	8 días	10 días
LC		***	***	***	***	***
1 día	***		n.s.	***	***	***
2 días	***	n.s.		***	***	***
6 días	***	***	***		***	***
8 días	***	***	***	***		***
10 días	***	***	***	***	***	

Tabla VIII. Pruebas *a posteriori* de Tukey en el contenido de nitrógeno durante la metamorfosis del erizo blanco *L. pictus*, para los días 0 como larva competente (LC), 1, 2, 6, 8 y 10 (ns = no significativa con $p \geq 0.05$; ***= $p < 0.001$).

	LC	1 día	2 días	6 días	8 días	10 días
LC		***	***	***	***	***
1 día			n.s.	***	***	***
2 días	***	n.s.		***	***	***
6 días	***	***	***		n.s.	n.s.
8 días	***	***	***	n.s.		n.s.
10 días	***	***	***	n.s.	n.s.	

En la Figura 15 se muestra que la supervivencia de las postlarvas de erizos durante la metamorfosis a los 8 días fue mayor ($p < 0.05$) en el tratamiento con la adición de COD con 131 ± 12 (45 %) al compararla con tan solo 61 ± 11 (21 %) postlarvas supervivientes con agua filtrada de $0.2 \mu\text{m}$.

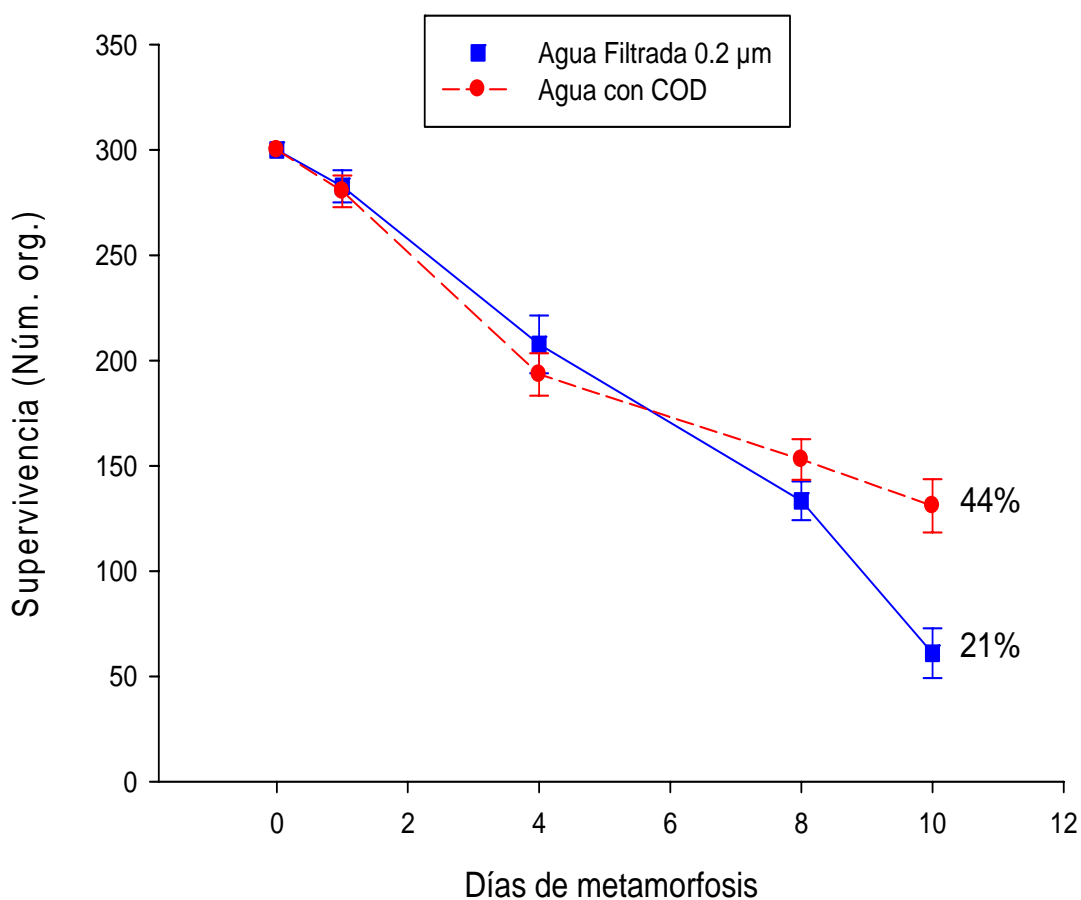


Figura 15. Supervivencia de la postlarva de erizo blanco *Lytechinus pictus* cultivada, a partir de la metamorfosis con agua de mar filtrada (AF) a $0.2 \mu\text{m}$ y con agua con carbón orgánico disuelto (COD). Las barras verticales corresponden al error estándar.

VII. Tasa Metabólica o Consumo de Oxígeno

La tasa de consumo de oxígeno ($\text{pmol O}_2 \text{ ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$), por hora, por individuo, presentó los valores más bajos antes del inicio de la metamorfosis, con un valor de $280 \pm 17 \text{ pmol O}_2 \text{ ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en el estadio de larva competente (LC) (Figura 16).

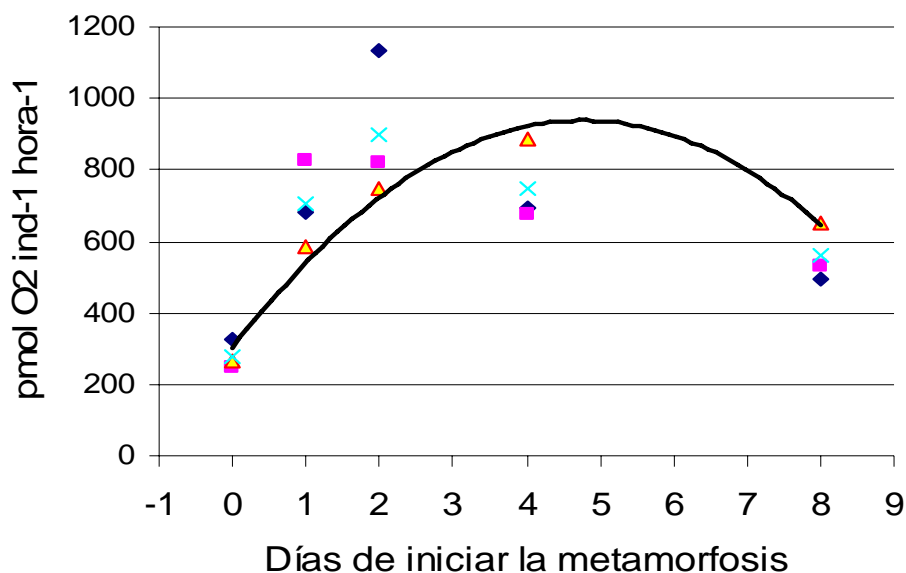


Figura 16. Tasa de consumo de oxígeno $\text{pmol O}_2 \text{ ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (18°C) a diferentes intervalos de tiempo durante la metamorfosis de *L. pictus* a partir de larva competente (LC), hasta los 8 días, cultivada en agua de mar filtrada hasta $0.2 \mu\text{m}$. Cada símbolo corresponde a una cámara de respiración.

La tasa se incrementó significativamente a las 12 horas y a los 2 días de haber iniciado la metamorfosis donde alcanzó un valor máximo de $901 \pm 84 \text{ pmol O}_2 \text{ ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Posteriormente, disminuyó hasta $559 \pm 48 \text{ pmol O}_2 \text{ ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a los 8 días. Las diferencias significativas en los valores de consumo de oxígeno de los erizos fueron obtenidas en la

prueba ANOVA ($p < 0.05$). El consumo de oxígeno $\text{pmol O}_2 \text{ ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ se incrementó las primeras 12 horas, sin embargo no se presentaron diferencias significativas hasta los 2 días y los días posteriores el consumo disminuyó sin diferencias significativas entre estos valores (Tabla IX).

Tabla IX. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey, para los valores de consumo de oxígeno (18°C) en $\text{pmol O}_2 \text{ ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en diferentes intervalos de tiempo, a partir de la larva competente (LC) y durante 8 días de metamorfosis del erizo blanco *L. pictus* (ns = no significativa con $p = \geq 0.05$; significativa * = $p \leq 0.05$; muy significativa ** = $p \leq 0.01$).

	LC	12 horas	2 días	4 días	8 días
LC		ns	**	ns	ns
12 horas	ns		ns	ns	ns
2 días	**	ns		ns	*
4 días	ns	ns	ns		ns
8 días	ns	ns	*	ns	

La TME, mostró un incremento casi constante desde el estadio de larva competente (Figura 17). Los valores de la TME fueron variables aunque mantuvieron una tendencia a incrementarse. Sin embargo, la TME de larvas competentes tuvieron un valor promedio inicial de $40 \text{ pmol O}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, para incrementarse a $84 \pm 11 \text{ pmol O}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y alcanzar los valores máximos a los 2 días con $102 \pm 7 \text{ pmol O}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y a los 4 días, 120

$\pm 8 \text{ pmol O}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (ambos con $P < 0.005$), el día 8. La TME disminuyó significativamente ($P < 0.005$) hasta un valor de $95 \pm 5 \text{ pmol O}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

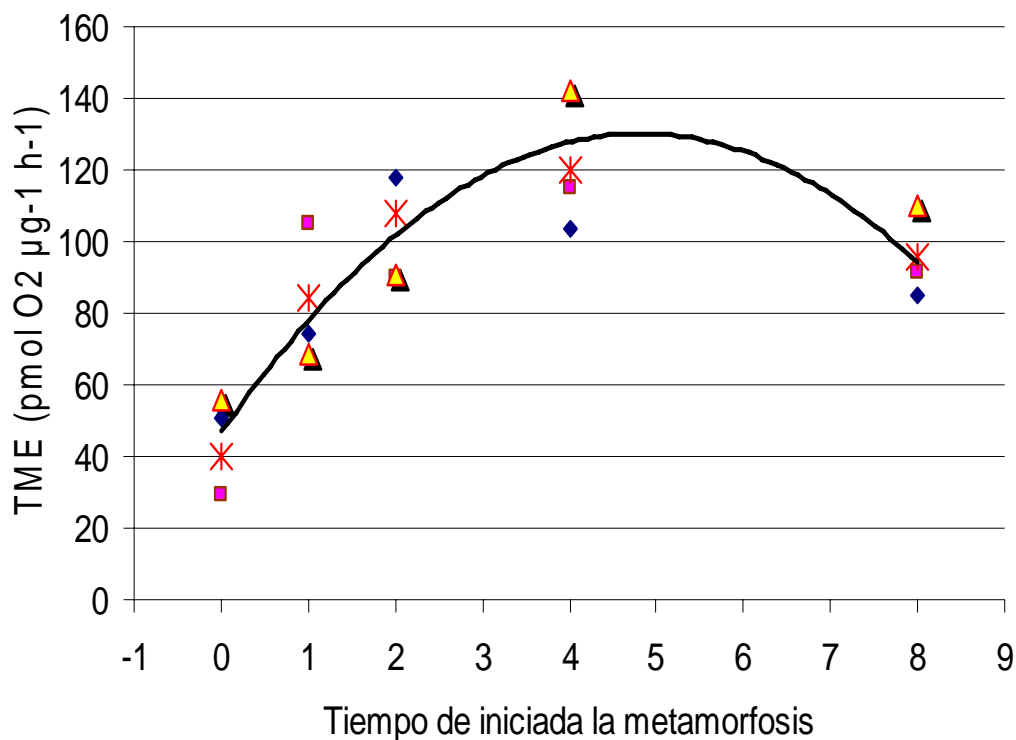


Figura 17. Tasa metabólica específica (TME) del erizo blanco *L. pictus* desde larva competente hasta los 8 días de metamorfosis. Fue calculada dividiendo la tasa metabólica entre el peso seco de los organismos en cada ocasión. Cada símbolo representa una repetición.

Se presentaron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los valores de la tasa metabólica específica en el tiempo de metamorfosis de acuerdo a la prueba Kruskal-Wallis y los resultados de la prueba *a posteriori* de Tukey (en Rangos) se presenta en la Tabla X.

Tabla X. Prueba de comparación múltiple de Tukey (en Rangos), para los valores de la TME ($\text{pmol O}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$), en diferentes intervalos de tiempo, a partir de la larva competente (LC) y durante 8 días de metamorfosis del erizo blanco *L. pictus* (ns = no significativa con $p \geq 0.05$; ** = $P < 0.01$).I

	LC	12 horas	2 días	4 días	8 días
LC		n.s.	**	**	n.s.
12 horas	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.
2 días	**	n.s.		n.s.	n.s.
4 días	**	n.s.	n.s.		n.s.
8 días	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

VII. 1. Contenido de Carbón

El contenido de carbón de las postlarvas se mantuvo constante los primeros dos días con valores de $1.9 \pm 0.3 \mu\text{g ind}^{-1}$ a $2.4 \pm 0.2 \mu\text{g ind}^{-1}$. El mayor contenido de carbón ocurrió en el día 6 con $6.6 \pm 0.5 \mu\text{g ind}^{-1}$, para disminuir luego y llegar a $4.9 \pm 0.3 \mu\text{g ind}^{-1}$ (Figura 18). El contenido de carbón durante su desarrollo presentó diferencias significativas a partir del día 6 al compararlo con los valores iniciales.

El tamaño inicial de las larvas competentes fue de $480 \pm 8 \mu\text{m}$ y el crecimiento promedio de las postlarvas a partir de larva competente en un período de 8 días, durante

la metamorfosis fue de $130 \mu\text{m}$ y alcanzaron una longitud final promedio de $610 \pm 23 \mu\text{m}$ (Figura 19).

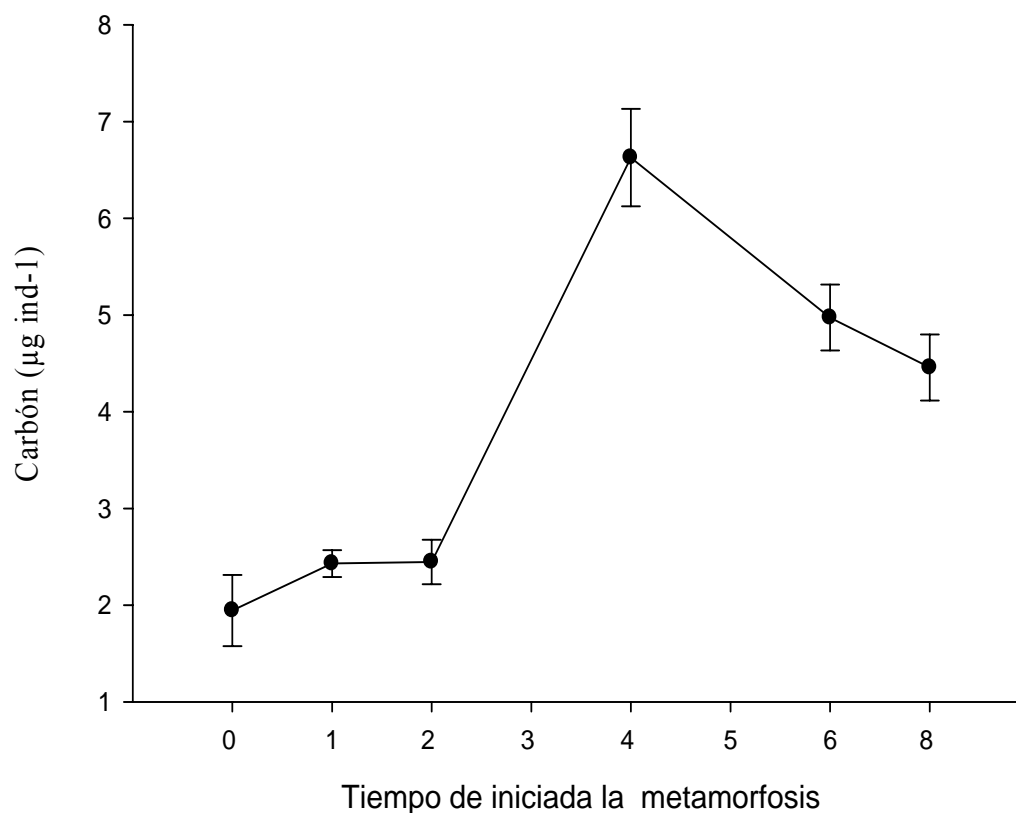


Figura 18. Contenido de carbono ($\mu\text{g ind}^{-1}$) promedio de las larvas competentes (LC) y de las postlarvas de erizo blanco *L. pictus* desde el inicio de la metamorfosis, hasta los 8 días de cultivo en agua de mar filtrada a $0.2 \mu\text{m}$. Las barras verticales corresponden al error estándar.

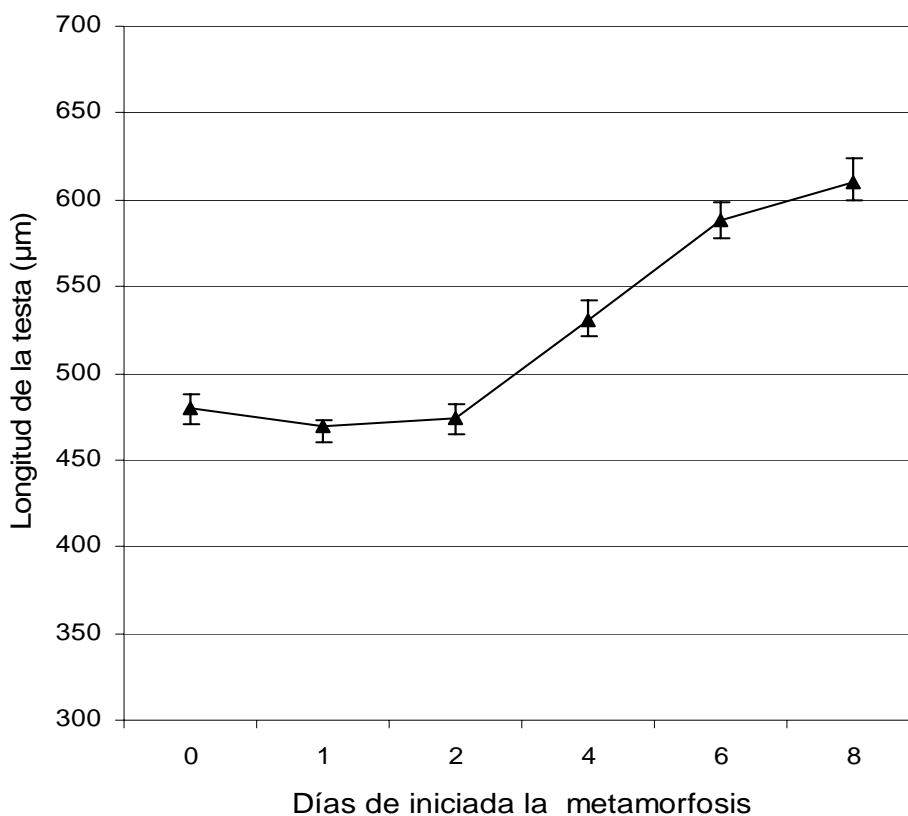


Figura. 19. Crecimiento promedio (μm) de las postlarvas cultivadas de erizo blanco *L. pictus* a partir de larva competente y utilizadas en el experimento de respirometría. Día 0 = larva competente (LC), antes de iniciar la metamorfosis. Las barras verticales corresponden al error estándar

Los datos promedio de peso seco en $\mu\text{g ind}^{-1}$ para las larvas competentes y las postlarvas durante la metamorfosis se presentan en la figura 20. Las larvas competentes presentaron un peso seco promedio de $3.41 \pm 0.4 \mu\text{g ind}^{-1}$, y se incrementó en un intervalo de 8 días, para alcanzar un peso promedio de $8.1 \pm 0.52 \mu\text{g ind}^{-1}$. Los valores Se ajustaron a una curva exponencial.

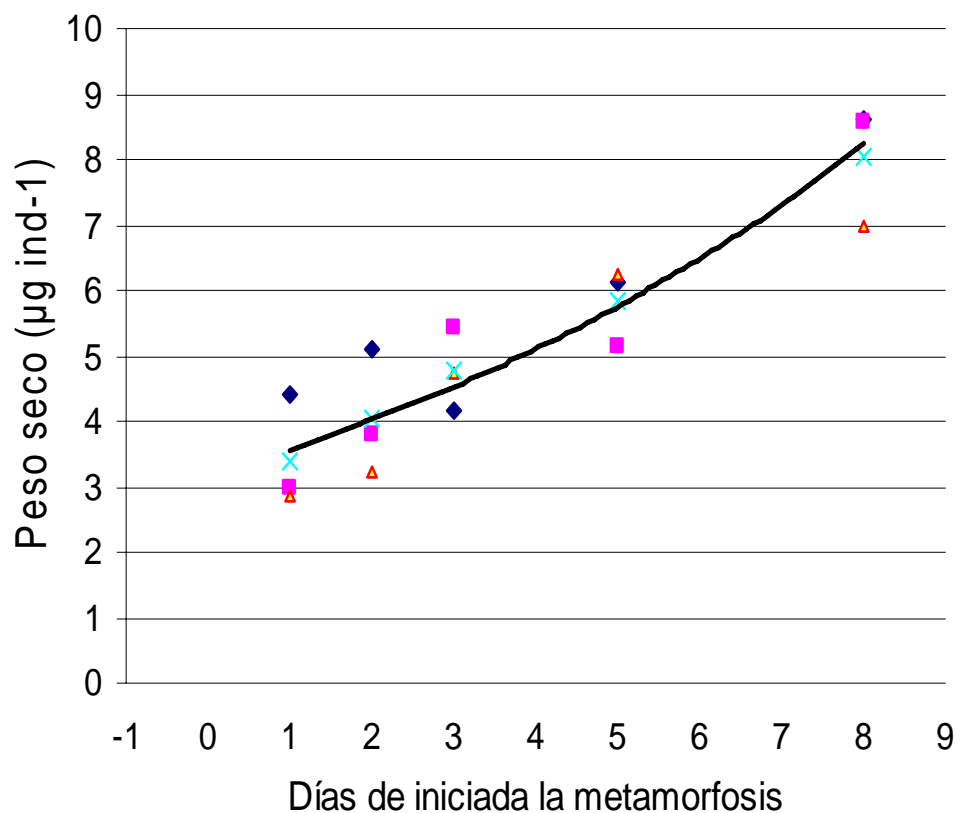


Figura 20. Crecimiento promedio en peso seco ($\mu\text{g ind}^{-1}$) de la postlarva de erizo blanco *L. pictus* durante la metamorfosis a partir de larva competente (LC). Cada símbolo representa un valor de una réplica.

VII. 2. Contenido energético de la postlarva

La energía mostró un incremento ascendente en función de los incrementos de la biomasa. El valor más bajo se presentó en su estadio de larva competente con 243 ± 14 y se incrementa significativamente hasta los 8 días de edad a 410 ± 5 mJoules ind^{-1} (Figura 21).

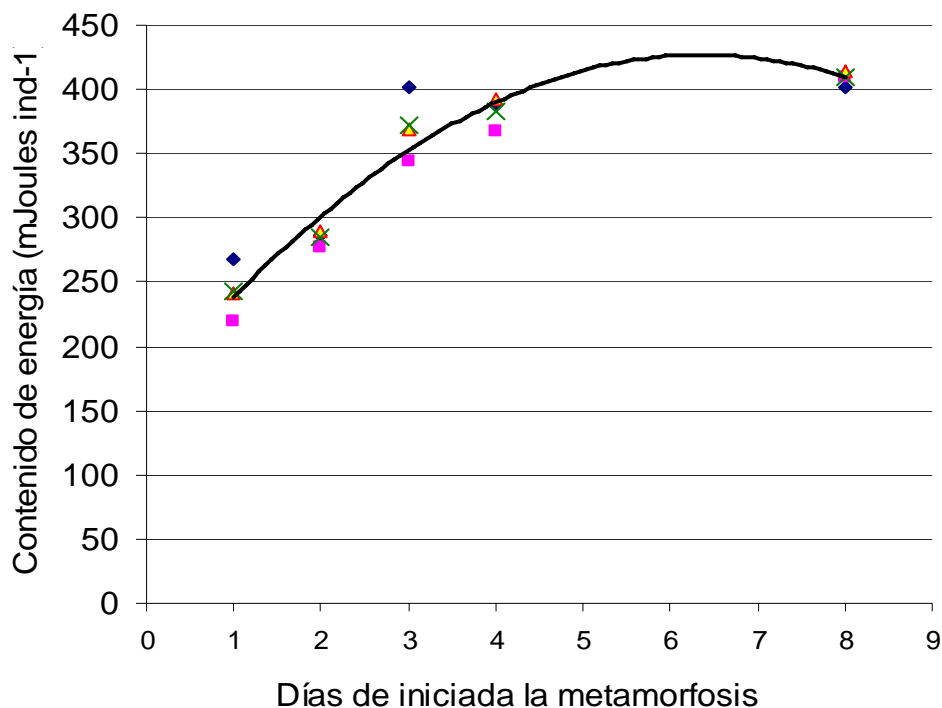


Figura 21. Contenido de energía promedio en mJoules ind⁻¹ con base en el peso seco de las postlarvas de erizo *L. pictus* durante la metamorfosis a partir de la larva competente; LC en el día 0. Cada símbolo representa el valor de una muestra.

El contenido promedio de energía proveniente de los lípidos estimados a partir de los valores de C:N mostraron, cambios, con un patrón casi continuo de disminución después de los primeros 2 días, con cambios significativos durante la metamorfosis (Figura 22). Su contenido inicial como larva competente fue de 174 ± 7 mJoules ind⁻¹, el día 6 disminuyó a 154 ± 7 mJoules ind⁻¹ y el día 10 fue significativamente menor de 98 ± 9 mJoules⁻¹. Los valores de la prueba ANOVA de una vía, resultaron.

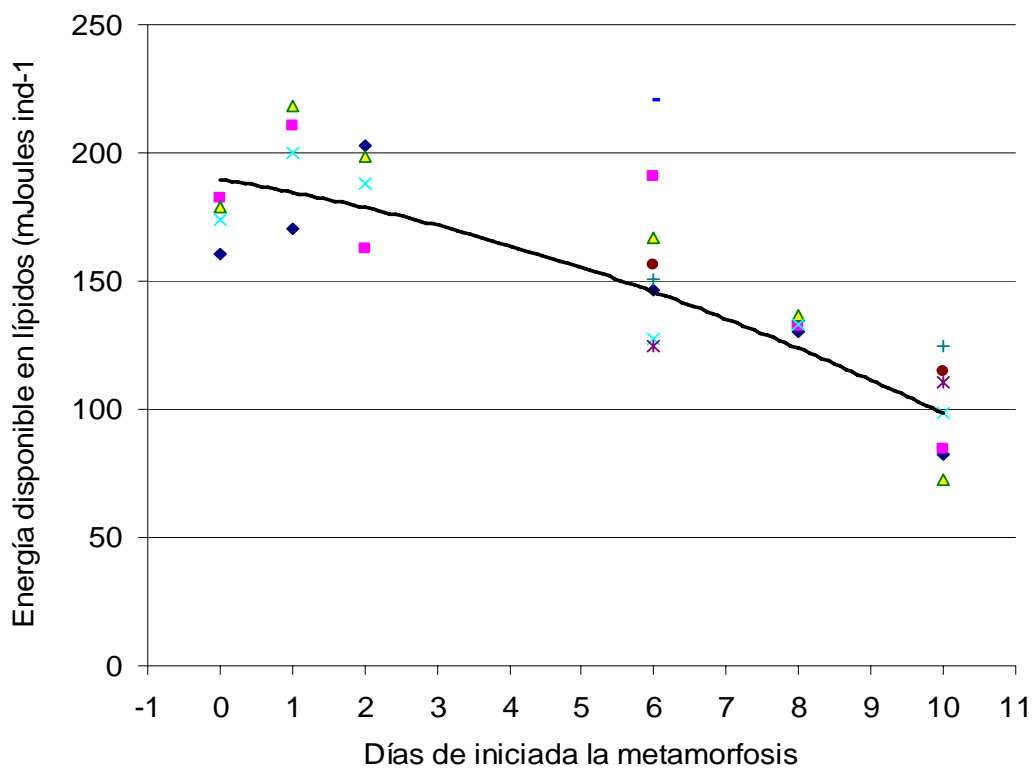


Figura 22. Cantidad de energía (mJoules ind⁻¹) disponible en forma de lípidos, y calculada a partir de la determinación de la relación de C:N de las postlarvas del erizo blanco *L. pictus* mantenidas en agua filtrada a 0.2 μm . Cada símbolo representa el valor de una réplica.

Los cambios en el contenido promedio de lípidos evaluados por el método directo de Pande *et al* (1963) (modificado por López *et al.*, 1995) se presentan en la Figura 23.

Se presentaron cambios significativos en su contenido energético, con un promedio máximo al inicio como larva competente de 107 ± 4 mJoules ind⁻¹ y sin cambios significativos los 2 primeros días. Posteriormente ocurrió una reducción significativa el día 6 con un valor de 88 ± 6 mJoules ind⁻¹, continuando con la

disminución de energía proveniente de los lípidos los días 8 y 10, con un valor final de 62 ± 2 mJoules ind^{-1} , hasta el octavo día.

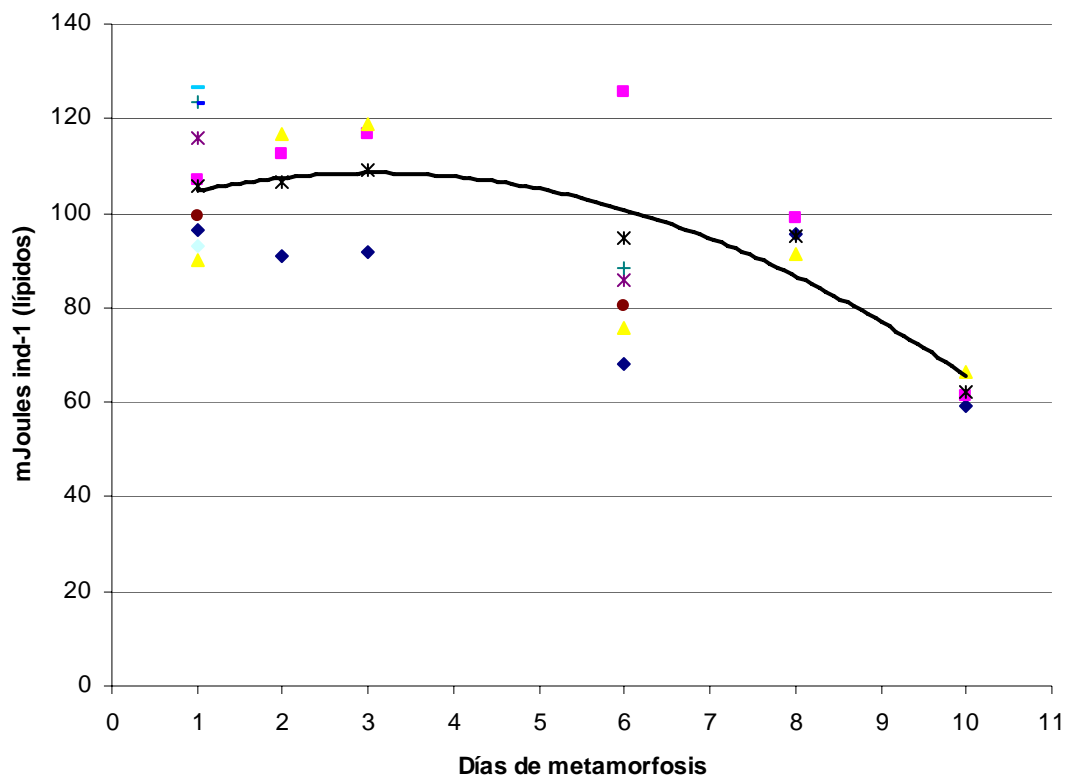


Figura 23. Cantidad de energía en mJoules ind^{-1} , disponible en forma de lípidos, y calculada a partir de la determinación directa de lípidos directos por el método de Pande (1963), de postlarvas del erizo blanco *L. pictus* mantenidas en agua filtrada $0.2 \mu\text{m}$ y adición de COD. Cada símbolo corresponde a una muestra.

La larva competente presentó el valor más bajo de consumo de energía con 1.25 ± 0.05 mJoules $\text{ind}^{-1} \text{h}^{-1}$ y se incrementó a las 12 horas a 2.19 ± 0.11 mJoules $\text{ind}^{-1} \text{h}^{-1}$, hasta

llegar a un máximo de 3.37 ± 0.12 mJoules $\text{ind}^{-1} \text{h}^{-1}$ a los 2 días (Figura 24). Posteriormente disminuyó hasta obtenerse un consumo de energía en el día 8 de 2.51 ± 0.10 mJoules $\text{ind}^{-1} \text{h}^{-1}$. Se presentaron diferencias significativas en los valores del consumo de energía de los erizos de acuerdo con los resultados de la prueba ANOVA de una vía.

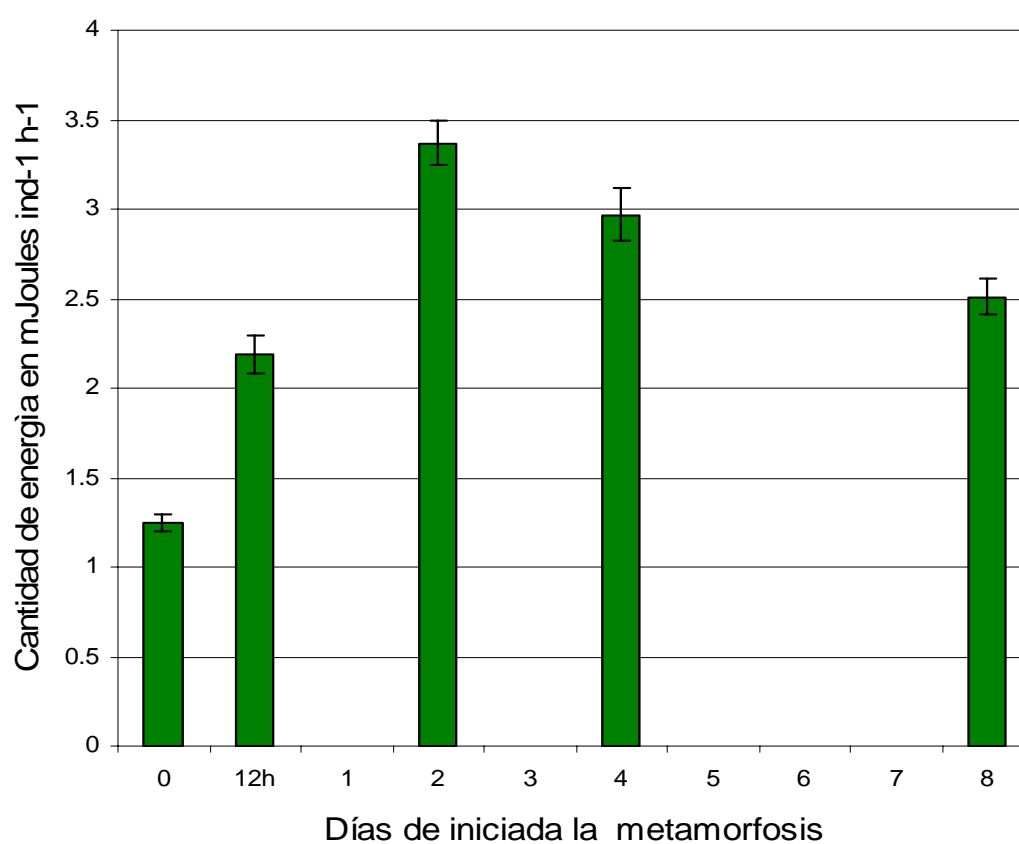


Figura 24. Cantidad de energía consumida en mJoules $\text{ind}^{-1} \text{h}^{-1}$, del erizo blanco *L. pictus*, en diferentes tiempos durante el proceso de metamorfosis, a partir del día 0 como larva competente y hasta los 8 días de metamorfosis. Las barras verticales corresponden al error estándar.

La suma del producto de cada consumo de mJoules por las horas transcurridas entre cada medición, desde larva competente hasta los 10 días de iniciada la metamorfosis, resultó en un consumo total de 668 mJoules (Tabla XI).

Este valor corresponde a la energía estimada que requirió cada larva para llevar a cabo la metamorfosis, a partir de larva competente y hasta ser un juvenil. El tiempo estimado es para 10 días, sin embargo, el periodo de metamorfosis para algunas postlarvas puede ser mayor, como se presentó en los experimentos con la presencia de diatomeas bentónicas.

En la figura 11, se muestra como algunas postlarvas requieren hasta 15 días para concluir su metamorfosis, por lo tanto sus requerimientos energéticos se verán incrementados y serán mayores que los 668 mJoules.

La energía calculada a partir del peso de la larva competente fue de 243 mJoules ind^{-1} y como a partir de ese momento inicia su metamorfosis y no se alimenta, de los 668

mJoules de energía que requiere para concluir la metamorfosis, necesita incorporar al menos 425 mJoules durante ese proceso y la alternativa es a través del COD.

Tabla XI. Gasto metabólico $\text{mJoules ind}^{-1} \text{h}^{-1}$ para diferentes tiempos de desarrollo durante la metamorfosis de *L. pictus*, desde larva competente (LC) hasta postlarva de diez días y su energía integrada para producir un organismo juvenil.

Tiempo de metamorfosis	Energía consumida $\text{mJoules ind}^{-1} \text{h}^{-1}$	Energía integrada mJoules/ind
L.C	1.25 $\text{mJoules ind}^{-1} \text{h}^{-1}$	15
12 h	2.19 $\text{mJoules ind}^{-1} \text{h}^{-1}$	79
2 d	3.37 $\text{mJoules ind}^{-1} \text{h}^{-1}$	162
4 d	2.97 $\text{mJoules ind}^{-1} \text{h}^{-1}$	285
8 d	2.51 $\text{mJoules ind}^{-1} \text{h}^{-1}$	127
10 días		668

VIII. DISCUSIÓN

VIII. 1. Determinación de Carbón Orgánico Disuelto (COD)

Las postlarvas de erizo *L. pictus*, se beneficiaron con el COD disponible en el agua y el producido por las diatomeas bentónicas *N. incerta*. Los resultados mostraron una relación positiva de crecimiento entre la exposición temprana de las postlarvas de erizo a las diatomeas bentónicas y el mejor crecimiento de las larvas. El cultivo de las postlarvas en presencia de la biopelícula, favoreció el desarrollo de los organismos, el cual se manifestó con un crecimiento significativamente mayor al alcanzado en ausencia de la microalga *N. incerta* o con un retraso de 3 días en su interacción. Otra evidencia de la importancia de la presencia de las películas de diatomeas fue el menor crecimiento obtenido con el mayor tiempo de retraso del inóculo, que correspondió al tratamiento D6. El efecto que se observó en el crecimiento siguió el mismo patrón en el caso de la supervivencia, con los valores más altos para la exposición temprana con la biopelícula y el COD. Lo anterior, fue confirmado en el segundo experimento, donde se demostró que al exponer las postlarvas con COD desde el inicio de la metamorfosis, y sin presencia de *N. incerta*, favoreció también el crecimiento y la supervivencia. Por lo tanto, la asimilación de COD para las postlarvas a partir de la metamorfosis sugiere que las reservas del erizo durante este proceso pueden ser complementadas por el COD. Estos resultados apoyan lo establecido por Shilling y Manahan (1990), los cuales reportan que

para algunas larvas de invertebrados la energía almacenada no es suficiente para completar la metamorfosis. Las larvas planctotróficas hacen el uso de las reservas endógenas en este estadio no pueden ingerir partículas, como ya fue señalado. Además, el período largo de metamorfosis particularmente para *S. franciscanus*, *S. purpuratus* y *L. pictus*, hace que este proceso sea complejo ya que es posible que durante los cambios anatómicos y morfológicos se incremente el metabolismo y ocurra un mayor consumo de energía. Esto fue señalado anteriormente en otras especies de invertebrados como el abulón rojo *Haliotis rufescens* (Shilling, *et al.*, 1996) y otros gasterópodos como *Littorina littorea*, *L. saxatilis*, *L. littoralis* y *L. neritoides*, crustáceos, *Balanus balanoides* (Holland, 1978) y bivalvos como *Ostraea edulis* (Lucas, 1996). También en equinodermos como *Heliocidaris tuberculata*, su tasa metabólica se incrementó casi al doble durante este período y después decrece a más de la mitad (Hoegh-Guldberg y Emler, 1997).

La eficiencia en la incorporación de COD por las postlarvas de erizo fue notable a diferentes concentraciones, desde las bajas concentraciones de $138 \mu\text{mol C L}^{-1}$, hasta mayores concentraciones de $587 \mu\text{mol C L}^{-1}$. En ambos casos se pudo observar su reducción en los tratamientos correspondientes, 24 horas después de haber sido adicionado (Figura 8). Se ha reportado que embriones y larvas de *S. purpuratus* pueden incorporar COD del agua de mar, ya que asimilaron 18 aminoácidos que estaban a una concentración de 125 nmol L^{-1} y las larvas de *Dendraster excentricus* removieron 14 aminoácidos a una concentración de $250\text{-}500 \text{ nmol L}^{-1}$ (Davis y Stephens, 1982).

Debido a que los patrones de crecimiento y supervivencia que presentaron las postlarvas fue el mismo en presencia y ausencia de *N. incerta*, se puede concluir que fue la presencia del COD presente en los recipientes y no la presencia de las diatomeas bentónicas las que influyeron en esos resultados. Además, los valores de COD que se alcanzaron en ausencia de *N. incerta* fueron consistentemente mayores, por diferentes razones. Por un lado debido a que las concentraciones de COD incorporadas a los tratamientos fueron más elevadas y debido a que no estaban presentes las diatomeas bentónicas, pues tampoco estuvieron presentes las bacterias en concentraciones tan grandes como debieron haber estado en los tratamientos con presencia de diatomeas bentónicas, que están asociadas a bacterias, como se discute mas adelante. En cambio las postlarvas en presencia de la biopelícula deben estar asimilando el COD cuando este se produce, por eso el COD no alcanzó valores más altos que $178 \mu\text{mol C L}^{-1}$ (Figuras 6 y 9).

La mejor condición de crecimiento y supervivencia mostrada con los valores más altos de COD, sugiere el uso de este sustrato energético durante la metamorfosis de las postlarvas de erizo. La utilización de la materia orgánica disuelta por larvas de invertebrados ya fue mencionada anteriormente, sin embargo, se puede destacar que las larvas del equinodermo *Acanthaster planci* incorporaron a través de la MOD hasta el 29.9% de la energía de sus requerimientos totales (Hoegh-Guldberg, 1994). Para las larvas, el potencial y valor energético de la MOD depende de la cantidad y calidad de sus compuestos químicos, cuya composición de sustancias húmicas, aminoácidos, azúcares y

otros compuestos varía con la profundidad (Wakeham, 1997) y también dependerá de la capacidad fisiológica del organismo (Jaeckle, 1995). Los organismos podrían adaptarse a circunstancias adversas, Hay evidencia que larvas de ostión *C. gigas* sometidas por períodos de inanición largos, de hasta 17 y 33 días, la capacidad de aprovechar otras fuentes alternas de energía como el material detrítico o el COD (Moran y Manahan, 2004).

Debido a el tiempo que demanda la filtración y el alto costo de los filtros para la obtención de agua filtrada a 0.2 μm , se decidió que en el segundo experimento se utilizará agua filtrada a 1.0 μm . La diferencia en el filtrado, no afectó los resultados, ya que la diferencia en la concentración de COD inicial entre el agua de 0.2 μm y 1 μm , es pequeña comparada con la concentración que el COD alcanza en pocos días. La mejor evidencia es que los resultados de ambos experimento fueron consistentes con la utilización de la MOD.

El COD en los cultivos de *N. incerta* se incrementó rápidamente (Figura 6), lo cual pudo ser el resultado del crecimiento poblacional de la diatomea, que a pesar de no haber sido cuantificada, se pudo observar una coloración café más intensa causada por una biopelícula más densa. Simental-Trinidad (2002), reporta que esta microalga en un sistema muy similar, en los primeros cuatro días la población inoculada incrementó ocho veces su densidad poblacional. La producción de COD por las diatomeas tiene una tendencia casi exponencial, sin embargo, en este caso, los valores pueden estar subestimados, ya que parte del COD debió ser consumido por las bacterias, ya que el

bacterioplancton heterotrófico debido a su densidad son los consumidores dominantes de la MOD en el océano, convirtiendo esta a biomasa o nutrientes inorgánicos (Azam et al., 1983; Azam, 1998).

En donde se incorporó el agua con COD, se observó una disminución de COD, resultando casi en todos los casos con un consumo superior al 60 % y hasta el 74% en tan solo 24 horas. Si se considera la cantidad de COD contenida en el agua vertida en los tratamientos y su concentración 24 horas después, se registró una disminución máxima de COD de 398 a 436 $\mu\text{mol C L}^{-1}$ en los tratamientos. Este valor debió de ser muy aproximado al que fue utilizado por las postlarvas cada 24 horas en estas condiciones. Se observó una reducción significativa en tan solo 24 horas, en parte consecuencia del transporte pasivo de asimilación del COD por la diferencias de gradiente y los incrementos en las tasa metabólicas, que se asocian con los incrementos de transporte con alanina en esta especie, de acuerdo a lo reportado por Manahan, et al., (1983) y Manahan (1989).

Debido a que los recipientes no contenían biopelículas asociadas a bacterias, que asimilaran el COD, aunque no era un medio axénico, el consumo por bacterias debió ser mínimo. En cambio, en el primer experimento donde las biopelículas de diatomeas estuvieron presentes el consumo de COD debió haber sido por las postlarvas y las bacterias. Es necesario, realizar una evaluación para cuantificar este consumo, sin embargo, hay antecedentes de que el consumo de COD por las bacterias no interfiere con el consumo de aminoácidos por larvas de invertebrados, en cultivos no axénicos

(Stephens, 1982). Las postlarvas de *L. pictus* demostraron ser eficientes en la asimilación de COD, como ocurre en algunos invertebrados adultos de acuerdo a lo reportado, por Yahel, *et al.*, (2003), para la esponja *Theonella swinhoei*. En el caso de los equinodermos del océano profundo se reportó que las postlarvas del ofiúrido *Ophiecten gracilis* < 0.6 mm, se alimentan del flujo de carbón particulado (COP) compitiendo con otros organismos bentónicos (Sumida, 1998), pero no se consideró el COD como posible fuente de alimento.

VIII. 2. Evaluación de juveniles

Los juveniles de mayor tamaño que fueron obtenidos a los 18 días, en presencia de las diatomeas bentónicas, y en contraste con los de menor tamaño obtenido en ausencia de diatomeas, demostró la ventaja de cultivar las postlarvas de erizo con la biopelícula. Sin embargo, esta ventaja no fue notable en la supervivencia en ningún caso, ya que en ambos casos fue similar. Esto sugiere que la disponibilidad de COD en todos los tratamientos estuvo a una concentración tal que su asimilación, para las postlarvas en ambos casos proporcionó suficiente energía para que no fuera afectada la supervivencia (Figuras 6 y 8). El mejor desarrollo obtenido en presencia de diatomeas debido al constante aporte de COD, además de haber tenido un efecto positivo en el crecimiento, favoreció el desarrollo de la postlarva, obteniendo un porcentaje más alto de erizos que finalizaron la metamorfosis y alcanzaron su estadio juvenil. Las diferencias en el desarrollo son notables al inicio del experimento, hasta en los tratamientos que tuvieron

diferencias de inóculo por 3 días, sin embargo, al permanecer después en condiciones similares, las diferencias se reducen.

VII. 3. Relación C:N

VIII. 3. 1. Relación Carbón:Proteínas y energía en Joules

Los cambios en el contenido de carbón y de proteína a partir de las larvas competentes significan un aporte continuo de ambos sustratos energéticos para el suministro de energía de los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren durante esta etapa de cambio. Sin embargo, las aportaciones energéticas del carbón y de la proteína en el gasto metabólico de los organismos fueron diferentes.

La evaluación del contenido de carbón y nitrógeno más temprana realizada fue en el estadio de larva competente, a partir del cual la larva debió haber acumulado reservas energéticas para prepararse a la siguiente etapa de metamorfosis, en la cual se incrementa su consumo de oxígeno y su tasa metabólica, además de perder su boca, razón por la cual deja de alimentarse, como ya se describió. El erizo, *Sterechinus neumayeri* durante el desarrollo larval mostró una ganancia diaria de proteína de 8.1 nanogramos y en condiciones de inanición mostró un decremento sostenido diario de $1.27 \text{ ng larva}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (Marsh, et al., 1999).

En el estadio de competencia de la larva de *L. pictus* los contenidos en porcentaje del carbón y nitrógeno fueron muy diferentes, sin embargo, la proporción de proteína fue

similar al realizar la conversión, y también fue diferente el contenido energético. El carbón aportó el 56 % (137 kj), en comparación con el 44 % (108 kj) que aportó la proteína. Este valor es muy similar al encontrado en otro equinodermo, como *Heliocidaris tuberculata*, cuya larva contiene un 58% de lípidos, un 39 % de proteína y solo un 3% de carbohidratos (Hoegh-Guldberg y Emlet, 1997).

La utilización de estos sustratos energéticos durante la metamorfosis mostró un patrón muy similar durante todos los experimentos. En el ajuste de la regresión que se realizó entre el carbón y la proteína, también se confirmó la disminución de los dos sustratos energéticos, aunque se haya mostrado variabilidad en las pendientes, las diferencias no fueron significativas, de acuerdo con la prueba ANCOVA. Sin embargo, en dichas regresiones es posible observar una amplia dispersión en los valores obtenidos en las concentraciones de carbón y proteína, lo cual puede ser consecuencia de una variabilidad natural en su contenido por los organismos. Esta variabilidad, que forma parte de su historia de vida como embrión y como larva, manifiesta sus consecuencias muchas veces ya como juvenil (Pechenik, 2006), y también podría tratarse de “efectos maternos” relacionados con la calidad de los óvulos y de las crías (McCormick, 1998).

El aporte energético por el carbón y la proteína aunque fue durante todo el proceso y se presentaron cambios en su contribución durante este, ya que los valores muestran un mayor aporte del carbón durante los primeros días de la metamorfosis durante este estudio. La diferencia en la energía consumida que presentó de larva del primer día como larva competente a los últimos días de su metamorfosis fue de

aproximadamente 47 mJoules (Figura 23). Esta es la cantidad mínima de energía que debió ser consumida en la forma de lípidos, y que formó parte del proceso de transformación a juvenil. Otra fuente de energía también importante fueron las proteínas, como puede observarse en las figuras 12-15, su reducción más importante fue durante la segunda mitad de la metamorfosis. El aporte energético de los lípidos fue mayor debido a su contenido calórico, de 39 kJ por un gramo de peso seco, contra 24 kJ por gramos seco de proteína.

Los valores estimados del contenido de energía de los lípidos, puede considerarse como su posible aportación potencial en mJoules durante la metamorfosis. Esta energía se redujo gradual y constantemente debido al consumo de energía. El aporte energético por los lípidos fue más importante al principio y posteriormente se incrementó el aporte energético de las proteínas. Se presentaron diferencias significativas en su aporte durante el tiempo experimental y fue en estadio de larva competente, antes de iniciar la metamorfosis cuando presentó su valor más grande. La participación de los lípidos debido a su reducción de mJoules en el metabolismo fue al menos de 76 mJoules ind⁻¹, considerando que la concentración de lípidos inicial de la larva competente de 174 ± 7 mJoules ind⁻¹, y una concentración final a 98 ± 9 mJoules ind⁻¹. Esto, sin considerar la energía asimilada de la MOD, y la cual no está considerada en este cálculo. Son diversas las estrategias que se conocen, en el uso de esta energía; desde el uso de los lípidos como principal fuente de energía y también el uso de las proteínas o la alternancia de estas. La utilización de los sustratos energéticos en los organismos es fundamental en esta etapa

del desarrollo y se han realizado esfuerzos para generar esta información. La utilización de lípidos y proteínas durante la metamorfosis ha sido ampliamente documentada en diferentes grupos de organismos marinos. Las estrategias de utilización de energía son diversas; (Crisp, 1974; Holland 1978; Gallager *et al.*, 1986; Anger *et al.*, 1989; Shilling and Manahan, 1994; Marsh *et al.*, 2001). Como en el caso del erizo blanco son varias las diferentes especies con estrategias parecidas, tanto crustáceos, como bivalvos y gasterópodos, como se describe a continuación; Durante el desarrollo larval del cangrejo *Lithodes maja*, la relación de C:Prot estimada cambió en el estadio zoea III indicando que la fracción de lípidos fue el principal sustrato energético durante la etapa de embrión y desarrollo larval y posteriormente esta relación cambió mostrando un incremento importante de carbón como consecuencia de la formación inicial del exoesqueleto (Anger, 1996). En cambio en postlarvas de *Crassostrea gigas* que tuvieron una mayor supervivencia durante el proceso de metamorfosis, la pérdida de energía fue del 76 al 82%, el catabolismo de lípidos fue del 34 al 62%. La parte complementaria de 66 al 38% fue contribución de las proteínas. El ostión, incrementó sus reservas de lípidos y en períodos cortos de inanición utilizó tanto los lípidos como las proteínas, sin embargo durante el proceso de metamorfosis principalmente los lípidos neutrales. La mayor supervivencia de las larvas estuvo correlacionada principalmente con una mayor cantidad de proteínas. Sin embargo, lo anterior pudo deberse a la mala calidad de las larvas por su baja reserva en lípidos (García-Esquivel, *et al.*, 2001). En cuatro especies de *Littorinas spp* (Holland, 1978) hay evidencias que muestran que los lípidos son la principal fuente

de energía utilizada durante la metamorfosis. En *Balanus balanoides* solamente el 50% de las larvas cypri completan metamorfosis y aproximadamente el 50% de los lípidos originales y del 25% de las proteínas han sido utilizadas durante el proceso y muy poco de carbohidratos (Lucas, *et al*, 1979). En la larva del crustáceo *Lepidophthalmus louisianensis* la relación C:N mostró que la larva utilizó mas lípidos que proteínas al principio de su desarrollo, al disminuir la proporción de carbón, sin embargo, esta relación se invirtió en sus estadios de zoea I y zoea II (Nates y McKenney, 2000), donde las proteínas tienen un papel relevante. En el camarón *Litopenaeus vannamei* también la proteína fue la principal fuente de energía metabólica durante su estadio postlarval (Jiménez-Yan *et al.*, 2006).

Se encontraron resultados similares en otros crustáceos (Anger, K. 1995). En el caso de la escalopa chilena *Argopecten purpuratus*, durante su metamorfosis mantuvo bajas reservas de proteínas, lípidos y carbohidratos lo que fue un indicador de la alta demanda energética de todos sus constituyentes (Farías y Castilla, 1998).

Las postlarvas de erizo blanco *L. pictus* recibieron un beneficio por la presencia y asimilación de elementos energéticos, ya que la supervivencia de las postlarvas fue mayor en los 10 días de metamorfosis, sugiere la conveniencia para las postlarvas de una fuente de energía adicional, como el COD. También, es evidente que existen mayores limitantes energéticas si se utiliza únicamente la reserva que la larva competente contiene desde el inicio de la metamorfosis. El análisis de la información mostró que los valores promedio de supervivencia de las postlarvas entre tratamientos fueron incrementándose

en la medida que transcurría el tiempo desde los 0, 4, 8 y 10 días. Lo anterior, es posible que sea debido a que las limitaciones de energía se presentan en la medida que van disminuyendo algunas de sus reservas, o algún componente particular de estas se vuelve cada vez más crítico, resultando con diferencias con las postlarvas que pueden recibir el beneficio adicional del COD. Algunos autores han reportado de las larvas no tienen gran control de las reservas energéticas en relación a la longitud del período de competencia (Orellana et al., 1996; Wilson y Harrison, 1998), no siempre sus reservas con suficientes para terminar el desarrollo larvario, sin embargo, la cantidad de reservas en la larva controla en parte la longitud del tiempo larval, ya que la larva tiene que nadar y posteriormente completar su metamorfosis de acuerdo con Wendt (2000). Este autor reportó en el briozooario *Bugula neritina*, que su contenido de nitrógeno no decreció consistentemente, debido a un uso primario de las reservas de carbohidratos y lípidos utilizado durante el nado y a un uso posterior de las proteínas, las cuales son metabolizadas una vez que han disminuido las otras reservas (Wendt, 2000). Es de esperar entonces, que si hay limitaciones energéticas, estas ocurran en un estado avanzado de metamorfosis y estas podrían disminuir la supervivencia de la población postlarval.

IX. Respirimetría

IX. 1. Tasa metabólica

La ausencia de crecimiento corporal en la testa, durante los primeros dos días, pudo ser consecuencia de que al inicio de la metamorfosis se llevan a cabo una serie de cambios externos, e internos que se consideran radicales al inicio de la metamorfosis. Esta etapa, la describen Cameron y Hinegardner (1978) y Amador-Cano (2007), para *L. picuts* en tres partes; la primera cuando la larva se adhiere al sustrato con los pies ambulacrales y el doblar de sus brazos que deja expuesto el rudimento al exterior; la segunda con el colapso de la epidermis larval debido al cambio de forma de las células epiteliales y por último el ensamble del epitelio adulto. En estas condiciones de transformación y reorganización es difícil una manifestación del crecimiento por parte de la reciente postlarva. Es a partir del cuarto día que se observa un cambio en la curva de crecimiento y hasta el día 8 cuando el crecimiento fue de 130 μm , que es similar a los 106 μm obtenido anteriormente con el uso de COD y a una temperatura promedio de 20 a 22 $^{\circ}\text{C}$.

El consumo de oxígeno presenta generalmente un patrón similar al de la biomasa, sin embargo, para esta última, en este estudio el patrón solo se cumplió parcialmente. Se puede apreciar como al inicio de la metamorfosis la tasa de consumo de oxígeno es casi constante hasta las 12 horas con un incremento significativo, hasta alcanzar un máximo a los 2 días. En cambio el contenido de carbón permaneció sin cambios hasta alcanzar un

máximo el día 4 y posteriormente con una tendencia a la baja, coincidiendo ambas variables. Estas diferencias pueden ser el producto de la etapa en los procesos de cambios morfológicos y anatómicos que ocurren durante la metamorfosis como fue descrito por Hinegardner (1969) y Cameron y Hinegardner (1974). La metamorfosis es un proceso que termina para algunas postlarvas después del día 10, y puede continuar por varios días más para otras, como fue demostrado que aun al día 12 de haber iniciado la metamorfosis un 40% de las postlarvas la había concluido. Es de esperar que en la parte final de esta etapa la mayor parte de los cambios se hayan llevado a cabo. Externamente, el cambio más drástico se observa dentro de las primeras 24-36 horas, donde pasó de tener una apariencia larval a ser un erizo pequeño con la forma adulta. En varios estudios se ha documentado este incremento metabólico durante esta etapa para otras especies. En la etapa metamorfosis el abulón rojo *Haliotis rufescens* incrementó su consumo de oxígeno de manera significativa de 222 pmol O₂ a 1659 pmol O₂ (Shilling, et al., 1996). El equinodermo *Heliocidaris tuberculata* de su desarrollo larvario a la metamorfosis presentó un incremento en su consumo de oxígeno de 600 a 1000 pmol O₂ y después de la metamorfosis decreció a 200-400 pmol O₂. Este patrón fue similar al obtenido para las postlarvas de erizo. En el ascideo *Diplosoma listerianum* al extender su periodo larval se afectan su periodo post metamorfosis debido a la disminución de reservas principalmente por la natación de la larva, una larva nadadora consume más energía, hasta un 25% de sus reservas a diferencia de una larva no nadadora y su metamorfosis es de bajo costo energético. La larva del pez *Gadus morhua*, también incrementa su tasa metabólica hasta

1.7 veces, en relación a su metabolismo basal, dependiendo del nivel de actividad durante su alimentación (McCollum, et al., 2006). Durante la metamorfosis la postlarva de erizo blanco *L. pictus* permanece casi sin movimiento por varios días, lo cual le permite un ahorro de energía. Otro proceso que también responde aún menor consumo de energía es el porcentaje del metabolismo estimado para la síntesis de proteína en la larva concluyendo que el metabolismo estimado para la síntesis de proteína dependió del estado fisiológico de su alimentación, la cual fue del 16 ± 4 % para la larva sin alimentarse y del 75 ± 11 % para la larva que se alimenta (Pace y Manahan, 2006)

IX. 2. Tasa metabólica específica

La tasa metabólica específica (TME) ($\text{pmol O}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$) durante la metamorfosis del erizo blanco en este estudio fue menor al promedio reportado de 268-893 $\text{pmol O}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de peso seco, para las larvas de otros invertebrados como el asteroideo, *Asterina miniata*; el bivalvo, *Crassostrea gigas*; y el equinoideo, *Dendraster excentricus* (Hoegh-Guldberg y Manahan 1995) durante su alimentación y crecimiento. Las diferencias con otros invertebrados, puede ser el resultado de las características de desarrollo de *L. pictus*, que correspondió a su metamorfosis, el cual incrementó su demanda metabólica en más de tres veces en comparación a los valores en su estadio de larva competente, no obstante el gasto energético realizado durante la metamorfosis representa condiciones diferentes a las de la alimentación, crecimiento y desarrollo larval. En estadio larval, el organismo presenta cambios lentos en su desarrollo y una parte de la energía consumida, es

canalizada a el nado de la larva y su alimentación, y la otra a su crecimiento, en cambio durante este estudio, además de su crecimiento, en la metamorfosis ocurren cambios morfológicos y fisiológicos que son radicales, el movimiento es muy reducido o casi nulo y no hay alimentación durante más de 10 días. Lo anterior, podría ubicarla en un grupo de especies que tienen que enfrentar durante un largo período esta exigencia energética, en comparación con muchas otras, que tienen un tiempo de metamorfosis corto de pocas horas o pocos días y que su gasto energético es menor para luego iniciar su alimentación como juveniles. De esta manera, en *L pictus*, podría ser una estrategia de una TME inferior a la de otros invertebrados, lo cual, podría ser una ventaja, el tener un menor consumo de energía durante esta etapa crítica de su desarrollo en comparación con otros invertebrados.

Los primeros días, no se observó crecimiento, lo cual puede deberse a la reabsorción del cuerpo larval y a los cambios morfológicos que se realizan durante este tiempo, los cuales son radicales. En el abulón rojo *Haliotis rufescens*, la metamorfosis y el paso de vida larval a vida bentónica antes de que inicie su primera alimentación, se realiza en tan solo 24-36 horas, y durante este corto tiempo, de acuerdo con Shilling, *et al.*, (1996), el reacomodo de tejidos es energéticamente muy costoso y puede resultar en una reducción importante de las reservas energéticas, lo cual puede ser determinante para que en esta etapa, no se manifieste un crecimiento corporal y la energía sea canalizada al reacomodo morfológico y fisiológico. Moran y Allen (2007) sugieren que la tasa metabólica específica no cambia con el tamaño del huevo en una misma especie, ya que

las reservas son utilizadas principalmente para la construcción del cuerpo larval más que como una reserva para afrontar el período de inanición cuando escasea el alimento externo para mantener su metabolismo. En un estudio metabólico de los peces *Solea senegalensis* y *Clupea harengus*, se encontró en ambos diferencias en el contenido de aminoácidos las larvas y las postlarvas manifestándose en estas últimas como una limitante (Conceição et al., 2003). Lo anterior sugiere que las larvas deben de ser eficientes en la procuración de energía externa, durante su etapa larval, capturando alimento y durante la etapa postlarval o metamorfosis, utilizando la MOD.

IX. 3. Cambios en longitud y biomasa en peso seco

Al incremento en peso seco, durante la metamorfosis correspondió a una tasa promedio de $0.58 \mu\text{g día}^{-1}$ y este siguió un patrón similar al crecimiento en longitud (μm). Los incrementos que definen el crecimiento en peso seco fueron lentos durante los primeros cuatro días de metamorfosis, lo cual se puede explicar por los cambios radicales morfológicos y fisiológicos, que ocurren durante este tiempo, desde el inicio de la metamorfosis, coincidiendo además con las tasas metabólicas elevadas, haciendo que la energía no sea utilizada para los incrementos en peso. En días posteriores, se dio el proceso inverso, disminuyó el consumo de oxígeno y se incrementó el peso seco de manera significativa. Sin embargo, durante la metamorfosis, la tasa de crecimiento fue alta considerando que el organismo carece de boca para alimentarse y que hubo consumo de energía, por lo que haya habido una fuente alterna de energía, y que en este caso debió

ser la MOD (COD). En el estadio de larva competente, cuando está bien desarrollado el rudimento juvenil (que ya contiene las espinas y también los pies ambulacrales, con los cuales explora el sustrato), el peso fue de 3.41 a 4.0 $\mu\text{g larva}^{-1}$, es muy similar al reportado para la larva competente de otro equinodermo *Heliocidaris tuberculata* con 4.18 - 5.97 $\mu\text{g larva}^{-1}$, con un peso de $7.49 \pm 0.39 \mu\text{g juvenil}^{-1}$, para el juvenil de 2 días (Hoegh-Guldberg y Emllet, 1997). En cambio, la diferencia en peso encontrado en el erizo blanco *L. pictus* fue de 4.6 μg desde larva competente hasta poco tiempo antes de estar por concluir su estadio postlarva, antes de juvenil con 8.1 - 8.6 $\mu\text{g larva}^{-1}$. Se ha documentado que la demanda metabólica de las larvas en crecimiento se incrementan en proporción directa con la biomasa (Manahan *et al.*, 1983; Manahan, 1989).

En lo que podría haber ocurrido, como una disminución del peso y de las reservas metabólicas, debido a que no se alimentó durante este estadio de desarrollo y al continuo gasto metabólico, no se observó en el presente trabajo, lo cual es explicado por que debió darse una asimilación de energía externa, en forma de MOD o COD.

IX. 4. Gasto metabólico

La cantidad de energía requerida por el erizo blanco desde larva competente durante la metamorfosis para llegar a su estadio juvenil, de 668 mJoules ind^{-1} , el 36 % correspondió al contenido como larva competente y el restante 64 %, requirió una fuente de energía externa. La cantidad de energía que una larva posee determina el tiempo de nado y el tiempo de metamorfosis y por lo tanto la distancia que puede alcanzar para

reclutarse en poblaciones distantes. Por lo tanto, sin considerar la energía potencial que puede ser incorporada por la MOD, la energía disponible y la respiración deben de ser indicadores del tiempo en que debe de realizarse la metamorfosis (Wendt, 2000).

Se puede estandarizar el total de la energía necesaria para alcanzar la etapa de juvenil y esta se realiza considerando la energía que se requiere entre la biomasa necesaria para hacer ese juvenil. Realizando esta estandarización en el erizo blanco *Lytechinus pictus*, se estimaron los valores de 51 y 92 mJ μg^{-1} , los cuales fueron mayores a los valores presentados por otros equinodermos. Una explicación de esta diferencia puede ser el número de días que estas especies requiere para terminar la metamorfosis, en el caso del erizo blanco *L. pictus* requiere más de 10 días, *H. erythrogramma* mas de 3.5 días, *H. tuberculata* 2-3 días. Si se compara con otras especies de equinodermos, se tiene que para *H. tuberculata* corresponden de 37 a 42 mJ μg^{-1} y para *H. erythrogramma* de 34, 35 mJ μg^{-1} (Hoegh-Guldberg y Emlet, 1997) y en el caso de la estrella de mar *Acanthaster planci* de 37 mJ μg^{-1} (Hoegh-Guldberg, 1994).

El consumo de lípidos y proteínas durante la metamorfosis, fueron un aporte sustantivo para las postlarvas de erizo, ya que estos sustratos deben de aportar al menos el 64 % de las necesidades de las larvas, de acuerdo con la energía inicial disponible, como se describió anteriormente. La energía que los erizos demandaron durante todo el proceso no parece estar disponible en las larvas competentes en el inicio de la metamorfosis, por lo que deben de tener una fuente adicional de energía de más de la mitad de lo que tienen disponible y deben de incorporarse como COD como ya fue demostrado en este estudio.

X. CONCLUSIONES

El COD producido por las diatomeas bentónicas fue un aporte de energía que favoreció el crecimiento y la supervivencia de las postlarvas de erizo de mar *L. pictus* durante la metamorfosis.

No fue la presencia de diatomeas la que directamente favoreció el desarrollo de las postlarvas, sino el carbón orgánico disuelto que estas producen, reflejándose en un mayor crecimiento de los juveniles obtenidos al término de la metamorfosis.

Se estimó la contribución energética del carbón y el nitrógeno, en sus formas de lípidos y proteínas, durante el proceso de la metamorfosis. Los dos contribuyeron aportando energía desde el inicio de la metamorfosis. Fue evidente la contribución de los lípidos desde el inicio hasta los últimos días de la metamorfosis.

La tasa de consumo de oxígeno se incrementó hasta el 320 % durante los primeros días 6 días de la metamorfosis, y posteriormente disminuyó, sin embargo se mantuvo por arriba de la tasa metabólica que tenía como larva competente.

XI. BIBLIOGRAFIA

- Amador, Cano G. 2007. Cambios morfogénéticos y procesos reguladores en la metamorfosis de los erizos de mar *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Marinas, 137 p.
- Anger, K. 1995. The conquest of freshwater and land by marine crabs: adaptations in life-story patterns and larval bioenergetics. *Journal Exploration Marine Biology and Ecology*; 193: 119-145.
- Anger, K. 1996. Physiological and biochemical changes during lecithotrophic larval development and early juvenile growth in the northern stone crab, *Lithodes maja* (Decapoda: Anomura). *Marine Biology*, 126(2): 283-296.
- Azam, F. 1998. Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens. *Science*, 280: 694-696.
- Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L. A. Meyer-Reil y F. Thingstad. 1983. The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10: 257-263.
- Baker, S. M. y R. Mann. 1994. Feeding ability during settlement and metamorphosis in the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) and the effects of hypoxia on post settlement ingestion rates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 181: 239-253.
- Benner, R., 2002. Chemical composition and reactivity. En: D.A. Hansell and C.A. Carlson (Eds.), *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*. Academic Press, 59-90.
- Bennett, C. E. y D. J. Marshall. 2005. The relative energetic costs of the larval period, larval swimming and metamorphosis for the ascidia *Diplosoma listerianum*. *Marine and Freshwater Behavior and Physiology*, 38 (1): 21-29.
- Bligh, E. G. y W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Boidron-Metairon, I. F. 1995. Larval nutrition. En: *Ecology of marine invertebrate larvae*. L. R. McEdward (Ed.) CRC Press, Florida. 223-248.
- Bustos, E. y S. Olave. 2001. Manual: El cultivo del erizo (*Loxechinus albus*). Instituto de Fomento pesquero, Chile. 22 p.

- Bustos, R., C. Godoy, S. Olave y R. Troncoso. 1991. Desarrollo de técnicas de producción de semillas y repoblamiento de recursos bentónicos, Parte 1. Investigaciones en el erizo chileno *Loxechinus albus* (Molina, 1782). Instituto de Fomento Pesquero, Chile, PNUD. Impresos XIMPAUSER. 1-60.
- Cameron, R. A. y R. T. Hinegardner. 1978. Early events of metamorphosis in sea urchins, description and analysis. *J. Morph.* 157: 21-32.
- Carlson, C.A., 2002. Production and removal processes. En D.A. Hansell and C.A. Carlson (Eds.), *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*. Academic Press, 91-152
- Correa-Reyes, J.G., 2001. Selección de especies de diatomeas bentónicas para el cultivo del abulón. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior en Ensenada. Ensenada B. C., México, 131 p.
- Carpizo-Ituarte E., Salas-Garza A. y Parés-Sierra G. 2002. Inducción de la metamorfosis con KCl en tres especies de erizos de mar y sus implicaciones en la producción de juveniles. *Ciencias Marinas* 28: 157-166.
- Conceição, L. E. C., H. Grasdalen y I. Rønnestad. 2003. Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings. *Aquaculture* 227: 221-232.
- Crisp, D. J. 1974. Factors influencing the settlement of marine invertebrate larvae. En P. T. Grant and A. M. Mackie (eds.), *Chemoreception in marine organisms*. 167-275. Academic Press, New York.
- Davis, J. P. y G. C. Stephens. 1982. Bacteria- free sand dollar *Dendraster excentricus* larvae without antibiotics net up-take of amino-acids. *American Zoologist* 22: 879-884.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers y F. Smith, 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Duursma, E. K. y R. Dawson. 1981. *MARINE ORGANIC CHEMISTRY. Evolution, Composition, Interactions and Chemistry of Organic Matter in Seawater*. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam- Oxford-New York. 521 p.
- Ebert, E. E. y Houk J. L. 1984. Elements and innovations in the cultivation of red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture* 39: 375-392.

- Farías, A., I. Uriarte y J. C. Castilla. 1998. A biochemical study of the larval and postlarval stages of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture* 166: 37-47.
- Fenaux, L. 1982. Larval nutrition, M. Jangoux, y Lawrence, J. M. En: *Echinoderm Nutrition*, Eds., A. A. Balkema, Rotterdam, 479-489.
- Fonseca-Madrigal, J. 2001. Efecto de seis dietas microalgales en el desarrollo larvario, metamorfosis y obtención de juveniles del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* (STIMPSON). Tesis Maestría en Oceanografía Costera. Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California. 83 p.
- Gallager, S. M. Mann R. y G. C. Sasaki, 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture* 56: 81-103.
- García-Hernandez, V. C. 2003. Efecto del alimento en el desarrollo y sobrevivencia larval del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* (Echinoidea: Echinodermata). Tesis de Maestría en Oceanografía Costera. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California, México. 68 p.
- García-Esquivel, Z., V. M. Bricelj y M. A. González-Gomez. 2001. Physiological basis for energy demands and early postlarval mortality in the Pacific oyster. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 263: 77-103.
- Gnaiger, E. 1983. Appendix C. Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. In: Gnaiger, E., Fostner, H. (Eds.), *Polarographic Oxygen Sensors: Aquatic and Physiological Applications*. Springer, Berlin. 337-345.
- Gnaiger E. y G. Bitterlich. 1984. Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. 62(3), 289-298.
- González, L. P., J. C. Castilla y C. Guisado. 1987. Effect on the larval diet and rearing temperature on metamorphosis and juvenile survival of the edible sea urchin *Loxechinus albus* (Molina, 1782) (Echinoidea:Echinodae). *J. Shellfish Research*. 6(2): 109-115.
- Gosselin, P. y M. Jangoux. 1998. From competent larva to exotrophic juvenile: a morphofunctional study of the perimetamorphic period of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Zoomorphology*. 118: 31-43.

- Green, E.J, y Carritt D. E. 1967. New tables for oxygen saturation of seawater. *J. Marine Research*, 25:140–147.
- Hinegardner, R. T. 1969. Growth and development of the laboratory cultured sea urchin biological Bulletin 137: 465-475.
- Hoegh-Guldberg, O. 1994, Uptake of dissolved organic matter by larval stage of the crown-of-thorn starfish *Acanthaster planci*. *Mar. Biol.* 120: 55-63.
- Hoegh-Guldberg, O. y R. B. Emlet. 1997. Energy use during the development of a lecithotrophic and a planktotrophic echinoid. *Biol. Bulletin.* 192: 27-40.
- Hoegh-Guldberg, O. y D. T. Manahan 1995. Coulometric measurement of oxygen consumption during the development of marina invertebrate envryos and larva. *Journal Exploration Biology.* 198:19-30.
- Holland, D. L. 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. En: D.C. Malins y R Sargent (Eds); *Biochemical and biophysical perspectives in Marine biology.* Academic Press 4: 85-123.
- Jaekle, W. B., 1994. Rates of energy consumption and acquisition by lecithotrophic larvae of *Bugula neritina* (Bryozoa:Cheilostomata). *Mar. Biol.* 119: 517-523.
- Jaekle, W. B. 1995. Transport and Metabolism of Alanine and Palmitic Acid by Field Collected larvae of *Tedania ignis* (porifera, Demospongiae): Estimated Consequences of Limited Label Translocation. *Biol. Bull.* 189: 159-167.
- Jaekle, W. B. y D. T. Manahan, 1989 a. Growth and energy imbalance during the development of a lecithotrophic molluscan larva (*Haliotis rufescens*). *Biol. Bull.* 177: 237- 246.
- Jaekle, W. B. y D. T. Manahan. 1989 b. Feeding by a “nonfeeding” larva; uptake of dissolved amino acids from seawater by lecithotrophic larvae of gastropod *Haliotis rufescens*. *Mar. Biol.* 103: 87-94.
- Jaekle, W. B. y D. T. Manahan. 1992. Experimental manipulations of the organic chemistry of sea water: implications for studies of energy budgets in marine invertebrate larva (Mollusca, Echinodermata). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 156: 273-284.
- Jiménez-Yan, L., A. Britob, G. Cuzonc, G. Gaxiolab, T. Garcíab, G. Taboadab, L. A. Sotod y R. Brito. 2006. Energy balance of *Litopenaeus vannamei* postlarvae fed on animal or vegetable protein based compounded feeds. *Aquaculture*, 26: 337-345.

- Jonsson, P. R., K. M. Berntsson, C. Andre y S. A. Wangberg. 1999. Larval growth and settlement of the european oyster (*Ostera edulis*) as a function of food quality measured as fatty acid composition. 559-570 p.
- Keil, R. G., E. Tsamakis y J. I. Hedges. 2000. Early diagenesis or particulate amino acids in marine sediments. (eds) G. A. Goodfriend, M.J. Collins, M.L. Foget, S.A. Mako and J. F. Wehmiller, En: Perspectives in amino acids and protein Chemistry; 69-82.
- Kim, Abreu Elia Teresa. 2001. Uso alternativo de dietas formuladas en la alimentación de juveniles de rizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California. 96 p.
- Kitamura, H., S. Kitahara y H. B. Koh. 1994. Induction of larval settlement and metamorphosis in the sea urchins *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocidaris crassispina* by fatty acids. Fisheries Science, 60 (3): 311-313.
- Lawrence, J. M. McClintock, J. B. y Guille, A. 1984. Organic level and caloric content of eggs of brooding asteroids and an echinoid (Echinodermata) from Kerguelen (South indina Ocean). Int. Invert. Report. 7: 249-257.
- Lee, C., S. G. Wakeham y J. I. Hedges. 2000. Composition and flux of particulate amino acids and chloropigments in the ecuatorial Pacific sea Water and sediments. Deep sea res. 47: 1535-1568.
- Levine, D. M. y Sulkin S. D. 1984. Nutritional significance of long chain polyunsaturated fatty acids to the zoeal development of brachyuran crab *Eurypanopeus depressus* (Smith). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 81:211-223.
- López, J. A., M. C. Báez y N. Huerta. 1995. Manual de técnicas analíticas aplicadas al cultivo de microalgas. Universidad de Sonora, Public. Academ. CICTUS. No. 5: 47 pp.
- Lowry, H. O., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Biological Chemistry, 193:265-275.
- Lucas, M. I., G. Walker, D. L. Holland, and D. J. Crisp. 1979. An energy budget for the free swimming and metamorphosing larvae of *Balanus balanoides* (Crustacea: Cirripedia). Mar. Biol. 55: 221-229.
- Lucas, A. 1996. Bioenergetics of Aquatic Animals. (Ed): Taylor & Francis; Great Britain. 169 pp.

- Manahan, D. T. 1983. The uptake of dissolved glycine following fertilization of oyster eggs (*Crassostrea gigas*, Thunberg). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 68: 53-58.
- Manahan, D. T. 1989. Amino acid fluxes to and from seawater in axenic veliger larvae of a bivalve (*Crassostrea gigas*). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 53: 247-255.
- Manahan, D. T. 1990. Adaptations by invertebrate larvae for nutriment acquisition from seawater. *Am. Zool.* 30: 147-160.
- Marsh, A., T. G. Cohen y S. Epifanio. 2001. Larval energy metabolism and physiological variability in the Asian shore crab *Hemigrapsus sanguineus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 218: 303-309.
- Marsh, P. K., K. K. Leong y D. T. Manahan. 1999. Energy metabolism during embryonic development and larval growth an Antarctic sea urchin. *Journal of Experimental Biology* 202, 2041–2050.
- McCarthy, J. J., C. Garside y J. L. Nevins, 1999. Nitrogen dynamics during the Arabian Sea northeast Monsoon. *Deep Sea Res. II* 46: 1623-1664.
- McCormick, M. I. 1998. Behaviorally induced maternal stress in a fish influences progeny quality by a hormonal mechanism. *Ecology* 79; 1873-1883.
- McCollum, A., J. Geubtnerb y I. Hunt von Herbinga, 2006. Metabolic cost of feeding in Atlantic Cod (*Gadus morhua*) larvae using microcalorimetry. *Journal of Marine Science* 63 (2), 335-339.
- Moran, A.L. y D. T. Manahan, 2004. Physiological recovery from prolonged ‘starvation’ in larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 306 (1);17-36.
- Moran, A. L. y J. D. Allen, 2007. How Does Metabolic Rate Scale With Egg Size? An Experimental Test with Sea Urchin Embryos. *Biol. Bull.* 212: 143-150.
- Nagata, T., 2000. Production mechanisms of dissolved organic matter. In: *Microbial Ecology of the Oceans*. D. Kirchman (Eds.), Wiley Liss, New York, 121-152.
- Nates S. F. y C. L. McKenney, Jr. 2000. Growth, lipid class and fatty acid composition in juveniles mud crabs, *Rhithopanopeus harrissi*) following larval exposure Fenoxycrab, insect juveniles hormone analog. *Composition Biochemistry Physiological C. Thoxycology Pharmacological.*127: 317-325.
- Navarro, J. C. y R. Villanueva. 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture* 183: 161-177.

- Orellana, M. C., J. M. Cancino, y R. N. Huges. 1996. Is settlement in lecithotrophic bryozoan larvae constrained by energy reserves?. D. P. Gordon, A. M. Smith y J. A. Grant-Mackie. 221-226 p En, *Bryozoans in Space and Time.*, eds. NIWA (Natural Institute Water Atmospheric Research), Wellington, NZ.
- Pace, D. A. y D. T. Manahan. 2006. Fixed metabolic costs for highly variable rates of protein synthesis in sea urchin embryos and larvae. *Journal of Experimental Biology* 209: 158-170.
- Palleiro-Nayar, J. S. 1994. Pesquería de erizo rojo en Baja California, temporada 92-93. En *Memorias del X Simposium Internacional de Biología Marina*. 13-17 junio 1994; Ensenada, B.C., México. Universidad Autónoma de Baja California, Southern California Marine Institute 161 pp.
- Pande, S. V., R. Parvin Khan y T. A. Venkitasubramanian. 1963. Microdetermination of lipid and serum total fatty acid. *Analyt. Biochem.* 6: 415-423.
- Pavillon, R. M. 1976. Energy metabolism and amino acid transport during early development of Antarctic and temperate echinoderms. *Biol. Bull.* 187: 398-407.
- Pearce, C. M. y R. E. Sheibling. 1994. Induction of metamorphosis of larval echinoids ("*Strongylocentrotus droebachiensis*" and "*Echinarachinus parma*") by potassium chloride KCl. *Inv Rep. and Dev.* 26: 213-220.
- Preciado-Pinedo, M. 2000. KCl, GABA y L-glutamina como inductores a la metamorfosis en larvas del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*. Tesis Maestría. FCM. UABC. Ensenada, Baja California. 51 pp.
- Rogers-Bennett, L., H. C. Fasteneau, T. Hibbard-Robbins, Z. Kain y C. M. Dewees, 1994. Culturing red sea urchins for experimental outplanting in Northern California. Final report of Bodega Marine Laboratory and Santa Cruz University. No publicado.
- Saito, K., K. Yamashita, K. Tajima, A. Obara, Y. Nishihama, M. Sawasaki, K. Kawamata y K. Kawamura. 1985. Manual of artificial seed production of sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius*. Hokkaido Inst. Maricult. 22 p.
- Salas-Garza, A. y G. Parés-Sierra. 2000. Dietary treatments in the development of purple sea urchin larvae *Strongylocentrotus* and their impact on metamorphosis. American Aquaculture Society. New Orleans, L.
- Salas-Garza, A. Carpizo-Ituarte, E., G. Parés-Sierra, R. Martínez-López y R. Quintana-Rodríguez. 2004. Producción de juveniles de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* en Baja California, México. *Rev. Biol Trop.* 33: 345-355.

- Sato, N. y N. Murata. 1988. Membrane Lipid. *Methods in Enzymology* . 167: 251-259 .
- SEMARNAT. 2001. Informe de capturas del erizo de mar. Reporte. 5 pp.
- Sheltema, R. S. 1974. Biological interactions determining larval settle of marine invertebrates. *Thalassia Jugosl.* 110: 263-296.
- Shilling, F. M., Hoegh-Guldberg, O. y Manahan D. T. 1996. Sources of Energy for Increased Metabolic Demand during Metamorphosis of the Abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca). *Biol. Bull.*191: 402-412.
- Shilling, F. M., y I. Bosch. 1994. Pre-feeding embryos of Antarctic and temperate echinoderms use dissolved organic material for growth and metabolic needs. *Mar. Eco. Progr. Ser.* 109: 173-181.
- Shilling, F. M. y D. T. Manahan. 1990. Energetic of early marine development for the sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus* and *Lytechinus pictus* and the crustacean *Artemia* sp. *Marine Biology* 106: 119-128.
- Shilling, F. M. y D. T. Manahan. 1994. Energy metabolism and amino acid transport during early development of Antarctic and temperate echinoderms. *Biological Bulletin* 187: 398-407.
- Simental, J. A. & M. P. Sanchez-Saavedra. 2003. Effects of agricultural fertilizer on growth rate of three benthic diatoms. *Aquacultural Engineering* 27: 265-272.
- Simental-Trinidad, J.A., 2004. Enrichment of *Macrocystis pyrifera* seaweed blades with a biofilm of *Navicula incerta* and its use as food for juveniles red abalone (*Haliotis rufescens*). Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior en Ensenada. Ensenada B. C., México,, 120 p.
- Smith, D.F., 1986. Small-scale spatial heterogeneity in dissolved nutrient concentrations. *Limnol. Oceanogr.*, 31:167-170.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343. En: Stein, J. R. (Ed): *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Steel, G. B, Torrie H. J.1986. *Bioestadística. Principios y Procedimientos.* 2ª edición, Mc Graw Hill. México. 620 p.
- Stephens,. 1982. Nutritional Strategies of Cnidarians: The Absorption, Translocation and Utilization of Dissolved Nutrients by *Heteroxenia fuscescens*. *American Zoologist.* 22 (3): 659-669.

- Strathmann, M. F. 1987. "Phylum Echinodermata, Class Echinoidea", en *Reproduction and development of marine invertebrates of the Northern Pacific Coast*. University of Washington Press. Seattle, Washington. 670 pp.
- Sumida, P.Y.G. 1998. Post-larval development in deep-sea echinoderms. University of Southampton, Faculty of Science, School of Ocean and Earth Science, PhD Thesis, 296 p.
- Pechenik, J.A. 2006. Larval experience and latent effects—metamorphosis is not a new beginning *Integrative and Comparative Biology*, 46 (3): 323–333.
- Turner, R. L. y J. C. Rutherford. 1976. Organic, inorganic and caloric composition of eggs, pentaculae, and adults of the brooding sea cucumber *Cucumaria curata* Cowles (Echinodermata: Holothuroidea). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 24: 49-60.
- Videla, J. A., Chaparro, O. R., Thompson, R. J. 1998. Role of biochemical energy reserves in the metamorphosis and early development of oyster *Ostrea chilensis*. *Mar. Biol.* 132: 635-640.
- Wakeham, S. G. Lee C., Hedges J., Hernes P. J. y Peterson M. L. 1997. Molecular indicators of diagenetics status in marine organic matter. *Geochim Cosmochim. Acta* 61: 5363-5369.
- Webb, K. L. y Chu F. E. 1982. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. En Pruder G. D. Langdon C. J. Conklin D. E. (eds) *Second international conference on aquaculture nutrition biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition*. Louisiana State University. Baton Rouge. Pp 272-291.
- Welborn, J. R., y D. T. Manahan. 1990. Direct measurement of sugar uptake from seawater into molluscan larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 65: 233-239.
- Wendt, D. E. 2000. Energetics of Larval Swimming and Metamorphosis in Four species of *Bugula* (bryozoa). *Biol. Bull.* 198: 346-356.
- Wendt, D. E. and C. H. Johnson, 2006. Using latent effects to determine the ecological importance of dissolved organic matter to marine invertebrates. *Integrative and Comparative Biology*; 14:1-9.
- Whyte, J. N. C., Bourne, N., y Hodgson, C.A. 1987. Assessment of biochemical composition and energy reserves in larvae of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 113; 113-124.
- Wilson, D. P. 1951. A biological difference between natural seawaters. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 30: 1-20.

- Wilson, D. P. y F. A. J. Armstrong 1961. Biological differences between sea waters; Experiments in 1960. *Journal Marine Biological Assessments*, U.K.; 41; 663-681
- Wilson, J. R. y P. L. Harrison, 1998. Settlement competency periods of larvae of three species of scleractinian corals. *Marine Biology*. 131: 339-345.
- Yahel, G., J. H. Sharp, D. Marie, and A. Genin. 2003. In situ feeding and element removal in the symbiont-bearing sponge *Theonella swinhoei*: Bulk DOC is the major source for carbon. *Limnology and Oceanography*. 48: 141-149.
- Yazaki, I. y H. Arracima. 1994. Induction of metamorphosis in the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*, using L-Glutamine. *Zoological Science* 11:253-260.
- Yazaki, I., 1995. Quantitative analysis of metamorphosis induced by L-Glutamine in embryos of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Zoological Science* 12: 105-112.
- Yokota, Y., 2000. Sea urchin fishery in Japan. *Sea urchin Aquaculture Workshop Text book*. International Marine Center. Torregrande, Cerdeña, Italia.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*, Fourth Edition, N.J. Prentice Hall 718p.