

**EFFECTO DE LA MICROALGA *Pavlova lutheri* (DROOP) HIBBERD
CULTIVADA CON FERTILIZANTES AGRICOLAS EN EL
CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE LARVAS Y
POSTLARVAS DEL MEJILLON *Mytilus edulis* (L.)**

**EFFECT OF THE MICROALGA *Pavlova lutheri* (DROOP) HIBBERD
CULTURED WITH AGRICULTURAL FERTILIZERS ON THE
GROWTH AND SURVIVAL OF LARVAE AND POSTLARVAE
OF THE MUSSEL *Mytilus edulis* (L.)**

Lewis S. McAnally Salas
Francisco Jacob Ocampo Aranda
Luis E. García Pámanes

Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado Postal 453
Ensenada, Baja California, México

Recibido en noviembre de 1991; aceptado en febrero de 1992

RESUMEN

Se evalúan el crecimiento y la supervivencia de larvas de *Mytilus edulis* hasta la metamorfosis, alimentadas con *Pavlova lutheri* cultivada con tres fuentes de nitrógeno: dos fertilizantes agrícolas, urea y sulfato de amonio, y nitrato de grado reactivo, medio f/2. En el estadio larvario, la supervivencia entre muestreo y muestreo fue superior al 92.0% mientras que la supervivencia total fue mayor del 87.0%, no existiendo diferencias significativas entre los tres tratamientos. Fueron iguales los crecimientos de las larvas mantenidas con *Pavlova lutheri* cultivada con sulfato de amonio y con f/2 durante los primeros veinte días del desarrollo larvario, excepto al sexto y décimo día. Del tratamiento con urea se obtuvo menor crecimiento la mayor parte del tiempo, con diferencias significativas respecto a los otros dos medios, excepto a los veinte días de edad, cuando fue igual al tratamiento con sulfato de amonio. La supervivencia de la semilla fue superior en los dos tratamientos con fertilizante agrícola, sin diferencias entre ellos, mientras que la semilla del tratamiento con f/2 tuvo un porcentaje de supervivencia menor, con diferencias significativas respecto a urea y sulfato de amonio. El crecimiento fue superior en la semilla cultivada con sulfato de amonio, mientras que las semillas tratadas con urea y f/2 tuvieron crecimientos similares sin diferencias significativas entre ellos. Los resultados obtenidos sugieren que los fertilizantes agrícolas urea y sulfato de amonio -principalmente este último- pueden ser un buen sustituto en laboratorios productores de microalgas, cuyos costos se reducen respecto al f/2 hasta en un 98.81%.

ABSTRACT

An evaluation was made of the growth and survival of *Mytilus edulis* larvae to metamorphosis, fed on *Pavlova lutheri* cultured with three nitrogen sources: two agricultural fertilizers (urea and ammonium sulphate) and laboratory-grade nitrate (medium f/2). In the larval stage, survival between trials was greater than 92.0%, whereas total survival was greater than 87.0% and there were no significant differences between the three treatments. Growth of larvae fed *Pavlova lutheri* cultured with ammonium sulphate and f/2 was the same during the first 20 days of larval development, except on days 6 and 10. Lesser growth occurred in the

treatment with urea and there were significant differences relative to the other two treatments, except on day 20 when growth was the same as in the treatment with ammonium sulphate. Seed survival was better in the two treatments with agricultural fertilizers, with no differences between the two, than in the f/2 treatment, with significant differences relative to urea and ammonium sulphate. Better seed growth was obtained in the treatment with ammonium sulphate, whereas growth in the urea and f/2 treatments was similar and there were no significant differences between the two. The results indicate that urea and ammonium sulphate, especially the latter, can be considered good alternatives for use in the laboratory production of microalgae, reducing costs by 98.81% relative to f/2.

INTRODUCCION

Mytilus edulis es un molusco bivalvo de importancia comercial que está presente en ambos hemisferios, distribuido prácticamente en todo el mundo (Stubbins, 1954). En la costa oeste de América del Norte los mejillones están restringidos a la zona litoral, comúnmente en aguas quietas de esteros y algunas bahías, aunque también pueden existir en número considerable sobre costas expuestas y semixpuestas (Harger, 1970).

En México, uno de los principales riesgos de cultivar este bivalvo a gran escala es no contar con la cantidad suficiente de semilla para lograr que la producción de mejillón sea rentable y/o de menor riesgo. Aun cuando se conozca la época de captación de semilla silvestre, ésta varía notablemente año con año (Waterstrat *et al.*, 1980); por tanto, es necesario producirla en laboratorios comerciales para así satisfacer parte de las necesidades de semilla (Waterstrat *et al.*, 1980; Zhang, 1984).

La producción masiva de semilla de moluscos bivalvos implica la producción de volúmenes sustanciales de algas microscópicas apropiadas para alimentarlos (Persoone y Claus, 1980) y es precisamente en esta etapa donde se encuentra un cuello de botella en los laboratorios comerciales, ocasionado sobre todo por los altos costos que éstas implican. Algunos investigadores han tratado de superar este problema buscando alternativas a los medios de cultivo tradicionales.

Se han realizado diversos estudios para conocer la posibilidad de producir microalgas utilizando medios de cultivo de bajo costo, como fertilizantes agrícolas (Loosanoff y Engle, 1942), harinas de pescado, girasol y algodón (de la Cruz y Alfonso, 1975; de la Cruz, 1985), biodigeridos de macroalgas y biodigeridos de excrementos de aves y ganado (Granados-Machuca y Bückle-Ramírez, 1984). A pesar de la gran variedad de alternativas,

INTRODUCTION

Mytilus edulis is a commercially important bivalve mollusc found in both hemispheres and distributed throughout most of the world (Stubbins, 1954). On the western coast of North America, the mussels are restricted to the littoral zone, usually occurring in calm waters of estuaries and some bays, although they can also be found in considerable numbers on exposed or semi-exposed coasts (Harger, 1970).

In Mexico, one of the main problems in the large-scale production of this bivalve is the lack of enough seed to ensure a profitable and/or low-risk mussel culture. Even when the collecting time of natural seed is known, this period varies notably from year to year (Waterstrat *et al.*, 1980). Therefore, in order to solve the problem of seed shortage, it must be produced in commercial laboratories (Waterstrat *et al.*, 1980; Zhang, 1984).

The mass culture of seed bivalve molluscs requires the production of substantial volumes of appropriate microscopic algae for feeding them (Persoone and Claus, 1980), and it is precisely in this stage where a bottleneck occurs in commercial laboratories mainly due to the high costs involved. Researchers have tried to overcome this problem by searching for alternatives to the traditional culture media.

Several studies have been carried out to determine the possibility of producing microalgae using low-cost culture media, such as agricultural fertilizers (Loosanoff and Engle, 1942); sunflower, cottonseed and fish meals (de la Cruz and Alfonso, 1975; de la Cruz, 1985); biodigested organics derived from macroalgae and bird and livestock excrement (Granados-Machuca and Bückle-Ramírez, 1984). Despite the wide variety of alternatives, agricultural fertilizers have certain advantages over the others in that they offer a range of formulations, they are economical and they

los fertilizantes agrícolas presentan ventajas sobre los demás por la gama de formulaciones que ofrecen, su economía y la sencillez de su preparación; sin embargo, no hay información sobre los efectos negativos secundarios causados por su uso, si es que existe alguno.

Guerrero *et al.* (1981) realizaron experimentos en los que cultivaron microalgas al aire libre en grandes volúmenes, utilizando fertilizantes agrícolas y realizando bioensayos con semilla de dos bivalvos; obtuvieron buenos resultados para la almeja *Venerupis decussata* y el ostión europeo *Ostrea edulis*. Igualmente Riva y Lelong (1981) encontraron resultados satisfactorios para la semilla de dos especies de almeja, *Ruditapes philippinarum* y *Ruditapes decussata*, utilizando fertilizantes agrícolas.

Aunque los resultados conocidos sobre semilla de bivalvos alimentada con este tipo de alimento son muy satisfactorios, su utilización para el cultivo de larvas no se ha evaluado, o al menos no se ha divulgado ningún estudio al respecto.

El comprobar que este tipo de alimento puede ser utilizado sin problemas en el cultivo de larvas significaría, aparte del abaratamiento de costos, una simplificación de las técnicas para producir larvas y semilla para laboratorios rústicos, lo que apoyaría a los sectores productivos brindándoles alternativas para el desarrollo de proyectos acuaculturales con menor inversión. Debido a lo anterior, el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto que tiene el alimento cultivado con dos fertilizantes agrícolas sobre las larvas del mejillón *Mytilus edulis*.

La microalga seleccionada para este bioensayo, *Pavlova lutheri*, es considerada una especie de alto valor nutritivo, y tamaño adecuado; ésta, además, se utiliza con regularidad en laboratorios tanto de producción como de investigación para el cultivo de una amplia variedad de larvas y juveniles de moluscos bivalvos (Parson *et al.*, 1961; Bayne, 1965; Chanley, 1975; Winter, 1978; De Pauw, 1981).

MATERIALES Y METODOS

Se cultivó *Pavlova lutheri* con tres medios de cultivo: dos preparados con fertilizantes agrícolas, sulfato de amonio y urea, y el tercero, con el medio f/2 de Guillard (1975), utilizado como testigo. Los fertilizantes son de origen nacional y distribuidos por FERTIMEX.

are simple to prepare. However, there is no information on the negative secondary effects caused by their use, if there are any at all.

Guerrero *et al.* (1981) cultured large volumes of microalgae outdoors using agricultural fertilizers and made bioassays with two seed bivalves. They obtained good results for the clam *Venerupis decussata* and the European oyster *Ostrea edulis*. Likewise, Riva and Lelong (1981) obtained satisfactory results for the seed of two species of clam, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussata*, using agricultural fertilizers.

Even though very satisfactory results have been obtained in the culture of seed bivalves using this type of food, its use for the culture of larvae has not been evaluated or at least has not been reported.

The use of this type of food in the culture of larvae would mean, apart from a reduction in costs, a simplification of the techniques for the laboratory production of larvae and seed, and would give productive sectors alternatives for the development of aquacultural projects requiring less investment. Hence, the objective of this study is to evaluate the effect of food cultured with two agricultural fertilizers on the larvae of the mussel *Mytilus edulis*.

The microalga chosen for this bioassay, *Pavlova lutheri*, is of high nutritional value and adequate size. Furthermore, this species is regularly used in production and research laboratories for the culture of a wide variety of larvae and juveniles of bivalve molluscs (Parson *et al.*, 1961; Bayne, 1965; Chanley, 1975; Winter, 1978; De Pauw, 1981).

MATERIAL AND METHODS

Pavlova lutheri was cultured with three media: two prepared with agricultural fertilizers, urea and ammonium sulphate, and one with the medium f/2 as control. The fertilizers are produced in Mexico and distributed by FERTIMEX.

The stock solutions of the agricultural fertilizers were prepared according to the information provided by the manufacturer on the packing. The fertilizer was weighed in order to use the equivalent to the same amount of nitrogen as in the medium f/2, that is 882.143 μg at.N/l (Wilburn-González, 1990). Thus, in a glass container, 26.46 g/l of urea or 58.22 g/l of ammonium sulphate were

Para la preparación de las soluciones "stock" de los fertilizantes agrícolas se utilizó la información suministrada por el fabricante en el empaque. El fertilizante se pesó para usar el equivalente a la misma cantidad de nitrógeno que el medio f/2, es decir, 882.143 μg at.N/l (Wilburn-González, 1990). De tal manera, según sea el caso, se disuelven en un matraz de aforación, 26.46 g/l de urea o 58.22 g/l de sulfato de amonio en agua destilada. De esta solución se utiliza un mililitro por cada litro de medio de cultivo que se va a preparar. El medio f/2 se preparó según la fórmula y procedimientos descritos por Guillard (1975).

Los cultivos empleados para la alimentación se mantuvieron en tanques de fibra de vidrio de 400 l y se cosecharon diariamente al final de la fase de crecimiento exponencial del cultivo.

Los experimentos con las larvas de *Mytilus edulis* se llevaron a cabo por triplicado utilizando nueve cubetas aforadas a 15 l, distribuidas al azar en el área de experimentación. La temperatura se mantuvo entre 19 y 20°C, con ayuda de un sistema de aire acondicionado; el agua de mar utilizada se filtró previamente a una micra y se trató con un sistema de luz ultravioleta (UV).

Para el experimento se utilizaron larvas veliger D de 48 horas, retenidas en el tamiz de 70 μm , las cuales se distribuyeron en las nueve cubetas experimentales a una densidad aproximada de 10 larvas/ml. En la segunda y tercera semana la cantidad de larvas en cultivo se ajustó a una densidad de 5 y 3 larvas/ml, respectivamente.

Las raciones diarias utilizadas para la alimentación de las larvas fueron las recomendadas por McAnally-Salas (1988): 30,000 cel/ml durante las dos primeras semanas y 50,000 cel/ml de la tercera semana al final del desarrollo. Durante la metamorfosis se les proporcionó 100,000 cel/ml y cada semana consecutiva se realizaron incrementos en la dieta de 50,000 cel/ml.

Los muestreos y cambios de agua de cada cubeta se realizaron cada dos días, utilizando durante todo el experimento el tamiz de 70 μm para evitar la pérdida de larvas más pequeñas y la sobrestimación del crecimiento. Durante el cambio de agua, las larvas se enjuagaron con agua de mar clorada a 4 ppm como medida de profilaxis y, para evitar la proliferación de bacterias durante el

dissolved in distilled water. Of this solution, one millilitre was used per each litre of culture medium to be prepared. The medium f/2 was prepared according to Guillard (1975).

The cultures used for feeding were kept in 400-l fibreglass tanks and were harvested daily at the end of the phase of exponential growth of the culture.

The trials with *Mytilus edulis* larvae were carried out in triplicate using nine 15-l buckets, distributed at random in the experimentation area. Temperature was maintained at 19-20°C with an air conditioning system. Previously filtered seawater (1 μm), treated with ultraviolet (UV) rays, was used.

For the experiment, 48-hour veliger *D* larvae were used. They were retained on a 70- μm sieve and distributed among the nine buckets at an approximate density of 10 larvae/ml. During the second and third week, larvae were cultured at a density of 5 and 3 larvae/ml, respectively.

The daily rations used for feeding the larvae were those recommended by McAnally-Salas (1988): 30,000 cells/ml during the first two weeks and 50,000 cells/ml from the third week to the end of development. During metamorphosis, 100,000 cells/ml were supplied and each consecutive week the diet was increased by 50,000 cells/ml.

The buckets were drained every two days. Larvae were recovered on 70- μm sieves throughout the experiment so that smaller larvae would not be lost and growth overestimated. At each water change, the larvae were rinsed with chlorinated seawater (4 ppt) as a measure of prophylaxis and, to prevent the proliferation of bacteria during the culture, 50 mg/l of sodium sulfamethazine (SULMET) were added to each bucket (Hrs-Brenko and Calabrese, 1969).

Forty-five organisms were measured per sample during the larval stage, and between 75 and 105 organisms in the case of seed. The length of the larvae and seeds was measured taking the anteroposterior axis.

The appearance of the eyespot was recorded for each treatment. When approximately 75% of the larvae in the sample had the eyespot, they were considered ready for settlement.

In order to better evaluate metamorphosis, no substrate was provided for settlement and the larvae were allowed to settle on the walls of the containers. Hence, during

cultivo, a cada cubeta se le agregó 50 mg/l de sulfametazina de sodio (SULMET) (Hrs-Brenko y Calabrese, 1969).

Durante el estadio larvario se midieron 45 organismos por muestra y en el caso de la semilla, entre 75 y 105; las mediciones tanto de larvas como de semilla se hicieron sobre el eje anteroposterior de las mismas.

Se registró la aparición de la mancha ocular para cada tratamiento y, cuando aproximadamente el 75% de la muestra presentó la mancha ocular, las larvas se consideraron listas para su fijación.

Con el fin de evaluar mejor la metamorfosis, no se proporcionó sustrato alguno para la fijación y se dejó que las larvas se fijaran en las paredes del recipiente de cultivo, debido a lo cual, durante los cambios de agua, las cubetas sólo se enjuagaron en agua dulce filtrada a una micra y tratada con rayos UV.

Para evaluar el proceso de metamorfosis, cada cuatro días se determinó el número de larvas pediveliger existentes en cada cubeta. A partir del momento en que se encontraron sólo postlarvas, éstas se dejaron una semana más para valorar su cantidad y crecimiento.

El total de semilla por cubeta se determinó mediante una relación entre el número de organismos encontrados por alícuota y su peso correspondiente del total encontrado en cada cubeta; así se secó y pesó la semilla y, de este total, se tomaron aleatoriamente tres submuestras, las cuales se pesaron y contaron por separado, estimando los pesos a una diezmilésima de precisión.

Para determinar el efecto de los tratamientos utilizados, siempre que fue posible se utilizaron análisis de varianza (ANOVA) anidados entre cubetas y simples, así como pruebas de comparaciones múltiples en los casos en que hubo diferencias significativas.

En todos los casos se aplicaron pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianza (Hartley) como requisito para manejar las pruebas paramétricas; los porcentajes de supervivencia de las larvas se transformaron previamente al arc sen de la raíz de p , donde p es la proporción de 0 a 1 del porcentaje (Sokal y Rohlf, 1981).

RESULTADOS

La densidad alcanzada por los cultivos de *Pavlova lutheri* en el momento de la cosecha fue aproximadamente de 1.5×10^6 ; el

water changes, the buckets were only rinsed with filtered freshwater ($1 \mu\text{m}$), treated with UV rays.

To evaluate the process of metamorphosis, the number of pediveligers in each bucket was determined every four days. As of the moment when only postlarvae were found, they were left for one more week to evaluate their quantity and growth.

The total of seed per bucket was determined by means of a relation between the number of organisms found per aliquot and their corresponding weight of the total found in each bucket. The seed was dried and weighed and, from this total, three subsamples were taken at random, which were weighed and quantified separately, estimating the weights to an accuracy of 10^{-4} .

To determine the effect of the treatments used, whenever possible nested ANOVA among buckets and one-way ANOVA were used. When significant differences were found, multiple comparison tests were made.

In all cases, tests of normality (Kolmogorov-Smirnov) and homogeneity of variance (Hartley) were applied in order to be able to conduct the parametric tests. The larval survival percentages were previously transformed to arc sen of root p , where p is the proportion of 0 to 1 of the percentage (Sokal and Rohlf, 1981).

RESULTS

The density of the *Pavlova lutheri* cultures on harvesting was approximately 1.5×10^6 ; the average pH was 8.8 and, during the culture of larvae and seed, temperature was maintained at $18.1 \pm 1.7^\circ\text{C}$.

Even though only 47.6% of the growth data obtained during the larval stages were normal, 100% of the data, of both the percentage of survival and of larval growth, had homogeneous variance. Of the seed growth data, 66.66% complied with the normality and 100% with the test of homogeneity of variance. Consequently and since dependent variables are considered robust to the non-normality, the parametric tests proposed were used.

Growth of the larvae treated with f/2 and ammonium sulphate was similar, whereas growth of the larvae treated with urea was slower throughout most of the experiment (Fig. 1).

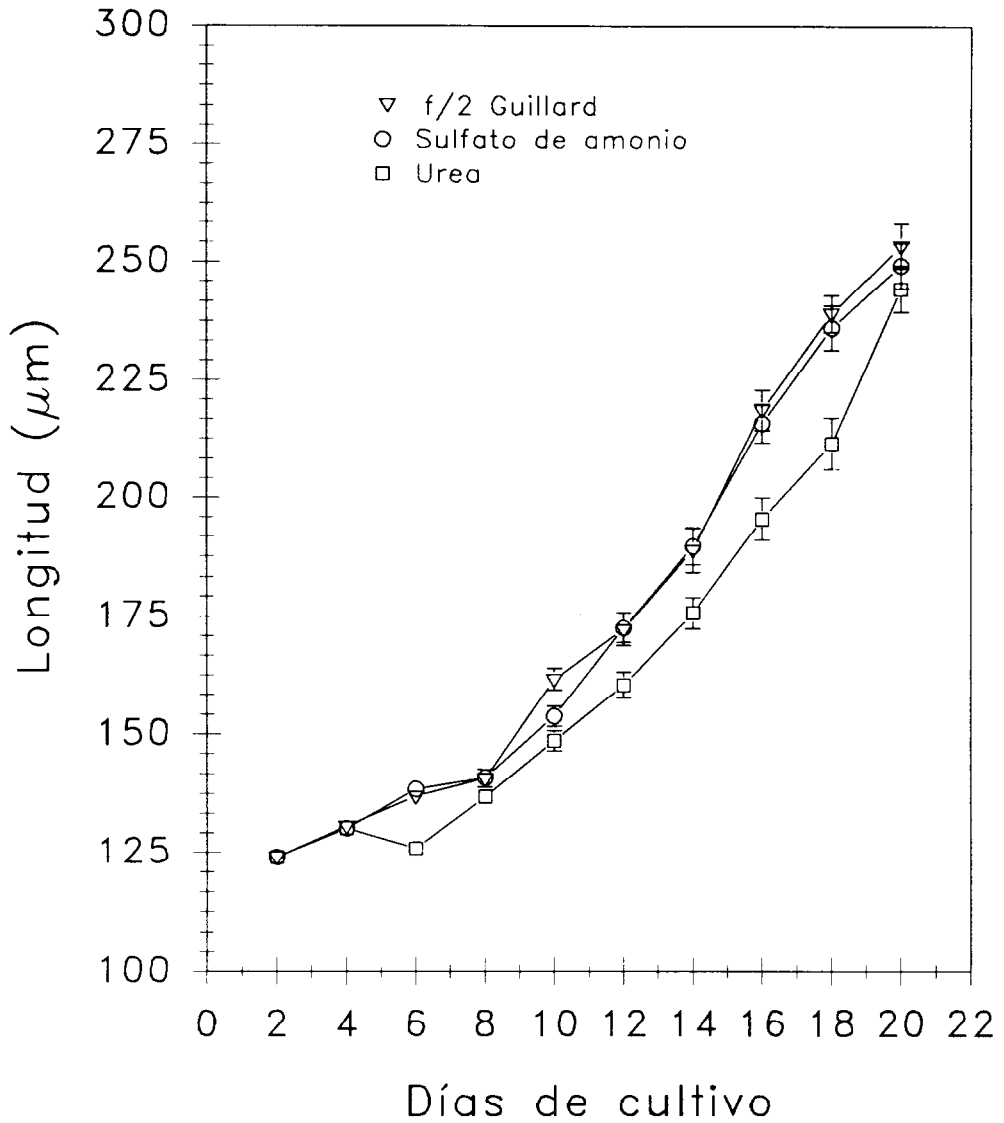


Figura 1. Crecimiento larvario de *Mytilus edulis* alimentado con *Pavlova lutheri* cultivada con tres diferentes medios de cultivo. Se muestran los límites de confianza al 95%.

Figure 1. Growth of *Mytilus edulis* larvae fed on *Pavlova lutheri* cultured with three different media. The 95% confidence limits are shown.

pH tuvo un promedio de 8.8, y durante el cultivo de larvas y semilla la temperatura se mantuvo a $18.1 \pm 1.7^{\circ}\text{C}$.

A pesar de que sólo el 47.6% de los datos de crecimiento obtenidos durante los estadios larvarios fueron normales, el 100% de ellos, tanto en el porcentaje de supervivencia como en el de crecimiento larval resultaron con varianza homogénea. De los datos de crecimiento de la semilla, el 66.66% cumplió con la normalidad y el 100% con la prueba de homogeneidad de varianza. Debido a lo anterior y a que las variables dependientes son consideradas robustas a la no normalidad, se utilizaron las pruebas estadísticas paramétricas propuestas originalmente.

Los crecimientos de las larvas para f/2 y para sulfato de amonio son similares, mientras, que las larvas tratadas con urea crecieron más lentamente en la mayor parte del experimento (Fig. 1).

El ANOVA anidado y la comparación múltiple realizados para cada muestreo nos indican que, para la mayor parte del desarrollo larval, los tratamientos con f/2 y sulfato de amonio tuvieron un efecto parecido sobre el crecimiento, con excepción de los días sexto y décimo. El tratamiento con urea fue significativamente diferente al de los otros dos medios durante la mayor parte del crecimiento, con excepción del cuarto día en que fue igual y del día 20, al final del cultivo, en que igualó sólo al tratamiento con sulfato de amonio.

La mancha ocular apareció el día 16 del cultivo, primero en las larvas del tratamiento con el medio f/2; la Figura 2 muestra los porcentajes encontrados y su incremento en los últimos tres muestreos. Para el día 18, en todos los muestreos el ANOVA de una vía indica diferencias significativas en la aparición de la mancha ocular. Las comparaciones múltiples señalan diferencias entre los tres tratamientos, donde al f/2 le corresponde el 74.2%, con menores porcentajes le siguen el sulfato de amonio con 50.2% y urea con 24.0%. En el último muestreo, el día 20, las comparaciones múltiples denotan que el único medio que presenta diferencias significativas es el f/2, con el mayor porcentaje, 83.7%; mientras que, sulfato de amonio y urea resultan estadísticamente iguales, con 75.0 y 73.2% respectivamente (Fig. 2).

La supervivencia promedio entre cambios de agua fue superior al 92%. Los análisis de varianza aplicados a los muestreos indican

The nested ANOVA and the multiple comparison made for each trial indicate that, during most of the larval development, the treatments with f/2 and ammonium sulphate had a similar effect on growth, except on days 6 and 10. The treatment with urea had a significantly different effect on growth than the other two media, except on day 4 when it was the same and on day 20, at the end of the culture, when it was only the same as the ammonium sulphate treatment.

The eyespot appeared on day 16 of the culture, first in the larvae treated with f/2. The percentages of larvae with eyespot in the last three trials are shown in Figure 2. In all trials, the one-way ANOVA indicates significant differences in the appearance of the eyespot. The multiple comparisons show differences between the three treatments on day 18, 74.2% corresponding to f/2, 50.2% to ammonium sulphate and 24.0% to urea. In the last trial, on day 20, the multiple comparisons show that f/2 is the only medium that presents significant differences, with the highest percentage, 83.7%, whereas ammonium sulphate and urea are statistically the same, with 75.0 and 73.2%, respectively (Fig. 2).

Average survival between water changes was greater than 92%. The analyses of variance applied to the trials indicate that there were no significant differences in the percentage of survival between treatments and between one trial and another. Therefore, the averages were used to plot Figure 3 which shows larval survival between trials, which in general terms was greater than 85%. In the case of urea, survival fell on day 14 to 74.4%, whereas in the other trials it was greater than 86.64%. For ammonium sulphate, survival was above 88.37% throughout the larval stage, except in the last trial when it fell to 78.95%.

So as not to underestimate survival, considering as dead the larvae eliminated during the adjustments of density of larvae per millilitre, the average survival per treatment was obtained for each of the three weeks (Fig. 4). In order to know the percentage of total survival during larval development to pediveliger stage, the weekly means were averaged for each treatment and 88.95, 88.88 and 87.03% were obtained for f/2, urea and ammonium sulphate, respectively.

The total number of pediveligers was similar for f/2 and urea, 43,745 and 44,492 organisms respectively, whereas a lower aver-

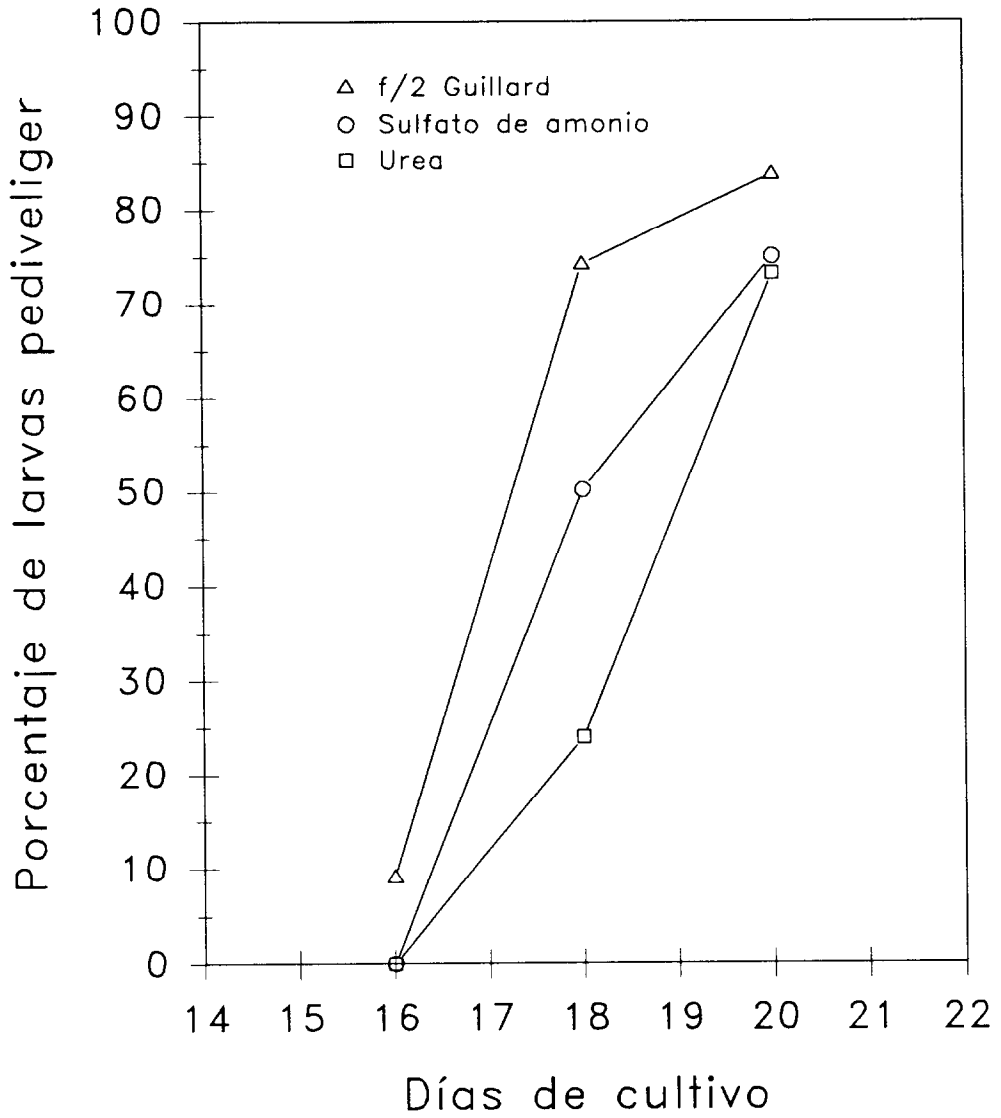


Figura 2. Porcentajes de larvas con mancha ocular en los últimos días del desarrollo de *Mytilus edulis*, alimentadas con *Pavlova lutheri* cultivada con tres diferentes medios de cultivo.

Figure 2. Percentage of larvae with eyespot during the last days of the development of *Mytilus edulis* fed on *Pavlova lutheri* cultured with three different media.

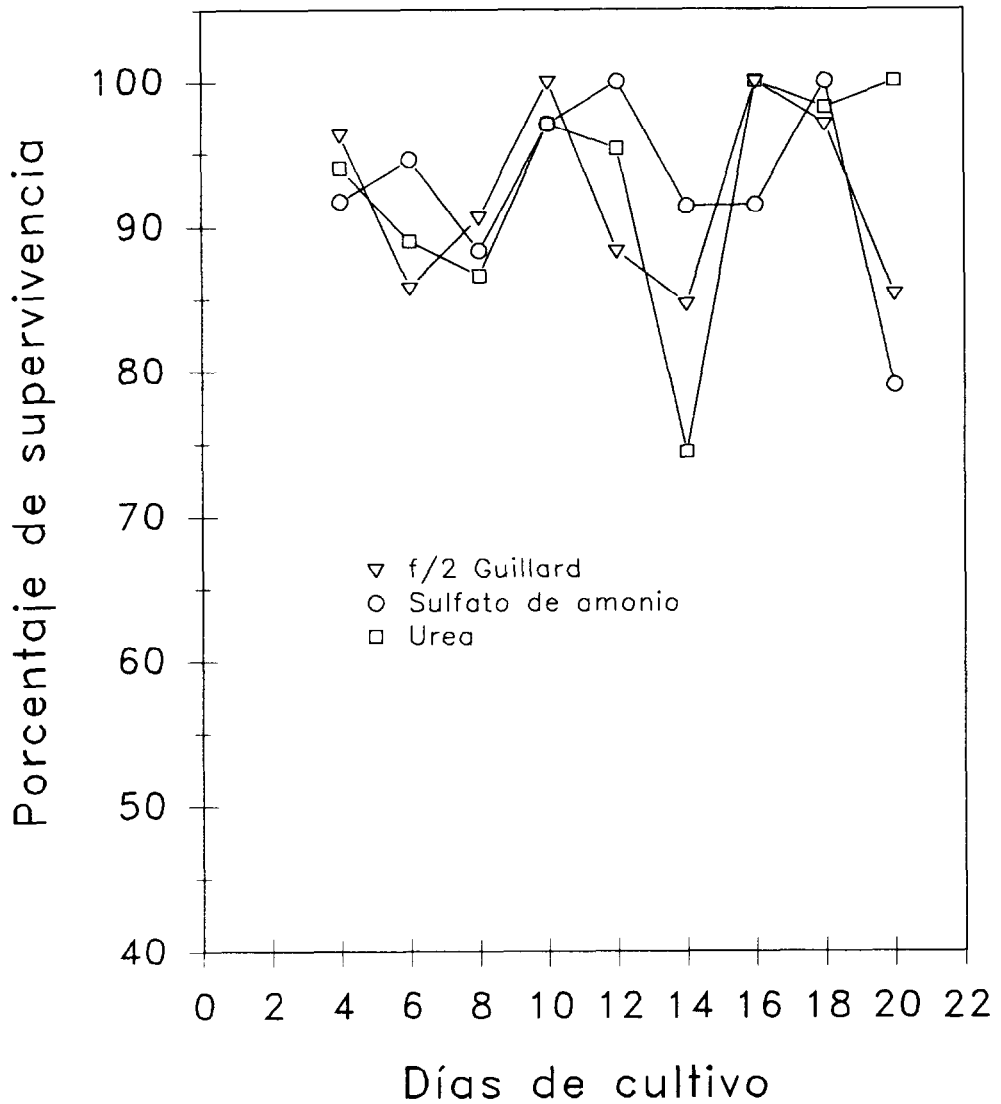


Figura 3. Supervivencia entre cambios de agua de las larvas de *Mytilus edulis* alimentadas con *Pavlova lutheri* cultivada con tres diferentes medios de cultivo.

Figure 3. Survival between water changes of *Mytilus edulis* larvae fed on *Pavlova lutheri* cultured with three different media.

que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia entre tratamientos, ni entre un muestreo y otro. Por ello, se utilizaron los promedios para realizar la gráfica de la Figura 3; donde se muestra la supervivencia larval entre muestreos, que en términos generales fue superior al 85%. En el caso de urea la supervivencia bajó el día 14 al 74.4%, mientras que en los demás muestreos fue superior al 86.64%; en cambio para el sulfato de amonio la supervivencia se encontró por encima del 88.37% durante todo el estadio larvario, a excepción del último muestreo en que bajó al 78.95%.

Para no subestimar la supervivencia considerando como muertas las larvas eliminadas durante los ajustes de densidad de larvas por mililitro, para cada una de las tres semanas se obtuvo un promedio de supervivencia por tratamiento (Fig. 4), y con el objeto de saber el porcentaje de supervivencia total durante el desarrollo larvario hasta el estadio pediveliger, se promediaron los promedios semanales para cada tratamiento. Se obtuvo así 88.95, 88.88 y 87.03%, respectivamente para f/2, urea y sulfato de amonio.

El número total de larvas pediveliger fue similar para los medios f/2 y urea, con 43,745 y 44,492 organismos respectivamente, mientras que con el sulfato de amonio se obtuvo un promedio menor, de 37,740 organismos. Sin embargo, el ANOVA indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos, en cuanto al número de organismos obtenidos.

Como era de esperar, la cantidad de larva pediveliger disminuyó durante el tiempo de metamorfosis. Para el tratamiento con urea fue significativamente mayor durante las evaluaciones de los días 26 y 30, mientras que para el día 34 no se encontraron larvas pediveliger en el tratamiento con f/2, y no hubo diferencia significativa entre urea y sulfato de amonio (Fig. 5).

Para evaluar el porcentaje de metamorfosis se usó como base la larva pediveliger puesta a fijar y el total de semilla cosechada al final del experimento, así el porcentaje de organismos que alcanzaron la metamorfosis fue del 75.92% para el medio f/2, 91.59% para la urea y el mayor porcentaje para el sulfato de amonio, con 97.33%.

En la evaluación del crecimiento de la semilla hasta el día 41, el ANOVA realizado mostró que existen diferencias entre los medios, mientras que la prueba de compara-

age, 37,740 organisms, was obtained for ammonium sulphate. However, the ANOVA indicated that there were no significant differences between the treatments with regard to the number of organisms obtained.

As expected, the number of pediveligers decreased during metamorphosis. In the treatment with urea, it was significantly greater during the evaluations on days 26 and 30, whereas on day 34, pediveligers were not found in the treatment with f/2 and there was no significant difference between urea and ammonium sulphate (Fig. 5).

The evaluation of the percentage of metamorphosis was based on the pediveliger allowed to settle and the total of seed harvested at the end of the experiment. The percentage of organisms that reached metamorphosis was 75.92% in the treatment with f/2, 91.59% with urea and 97.33% with ammonium sulphate.

In the evaluation of seed growth until day 41, the ANOVA showed that there were differences between the media. The multiple comparison test indicated that the different medium was ammonium sulphate, in which organisms had greater growth (Fig. 6).

With the total of seed harvested data, the ANOVA indicated significant differences between the media and the multiple comparison test showed that the treatment with urea was the one that produced most seed, 40,751 organisms, followed by ammonium sulphate, 36,733 organisms, and finally f/2, 33,213 organisms. Therefore, the only significantly different treatment was the one with urea.

DISCUSSION

The handling of the rearing tanks, the quantity and quality of the food and the physico-chemical processes, are factors that influence the growth and survival of larvae and seed of bivalves (Lucas, 1979). As the buckets were handled in the same way during this experiment, the differences found cannot be attributed to variations in handling. Likewise, the temperature in the three media fluctuated within the optimum range for good growth and survival of *Mytilus edulis* and *M. californiensis* larvae (Lough, 1974; Falmagne, 1984; Anguiano-Beltrán, 1989). Therefore, it is possible to assume that the effect produced on the growth, survival and percentage of settlement of larvae and seed of *Mytilus edulis*

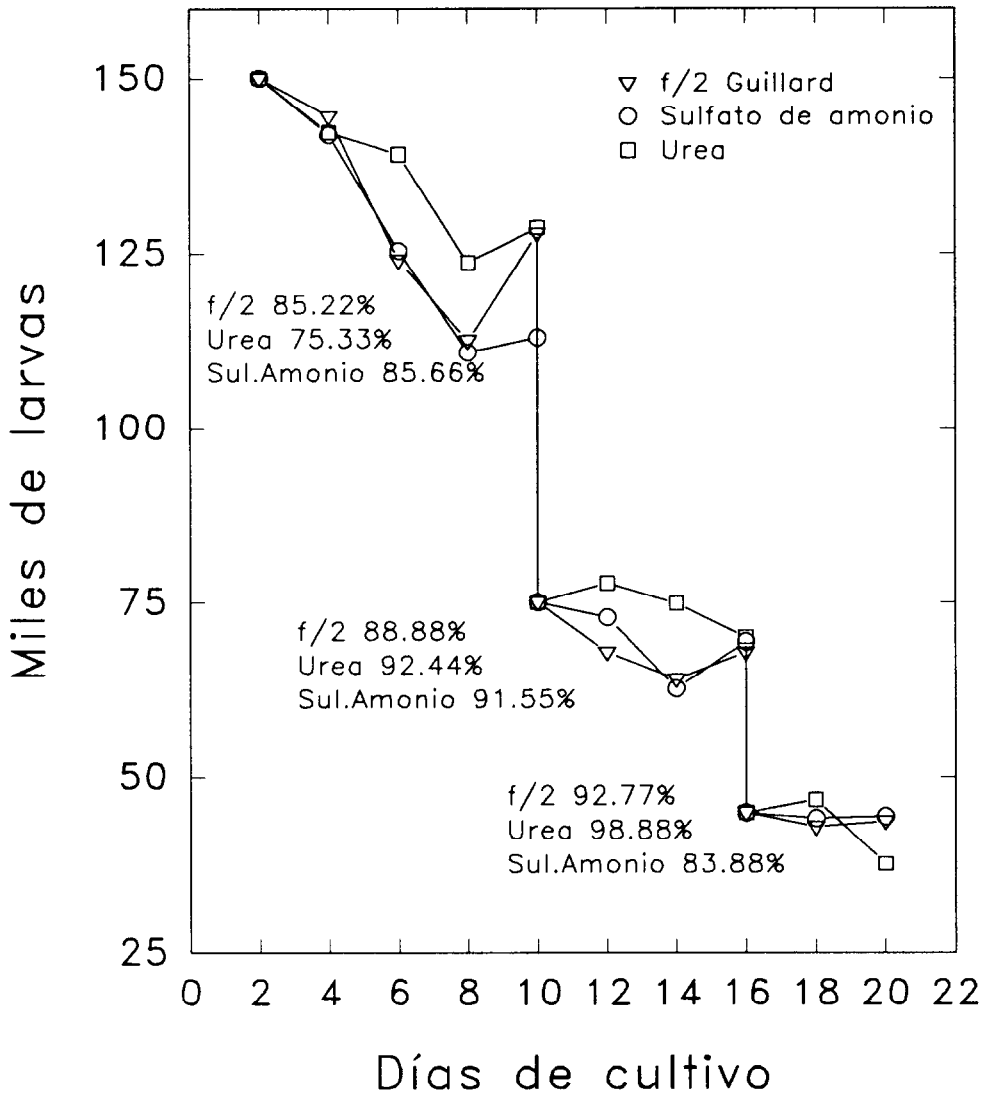


Figura 4. Promedio semanal de supervivencia, registrada para las larvas de *Mytilus edulis* alimentadas con *Pavlova lutheri* cultivada con tres diferentes medios de cultivo.

Figure 4. Weekly survival average recorded for *Mytilus edulis* larvae fed on *Pavlova lutheri* cultured with three different media.

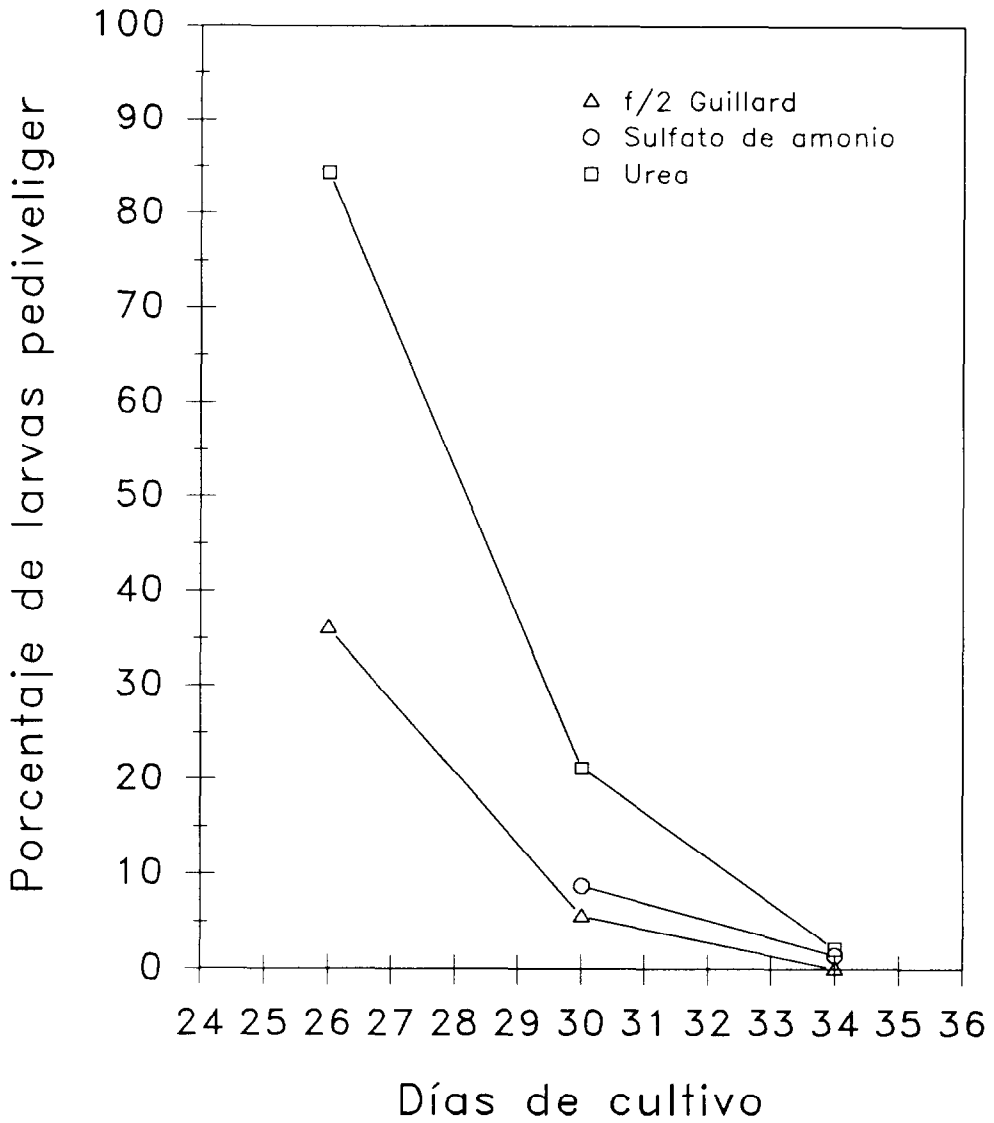


Figura 5. Disminución de larvas pediveliger de *Mytilus edulis* durante el proceso de fijación y metamorfosis, alimentadas con *Pavlova lutheri* cultivada con tres diferentes medios.

Figure 5. Decrease in pediveligers of *Mytilus edulis* during settlement and metamorphosis, fed on *Pavlova lutheri* cultured with three different media.

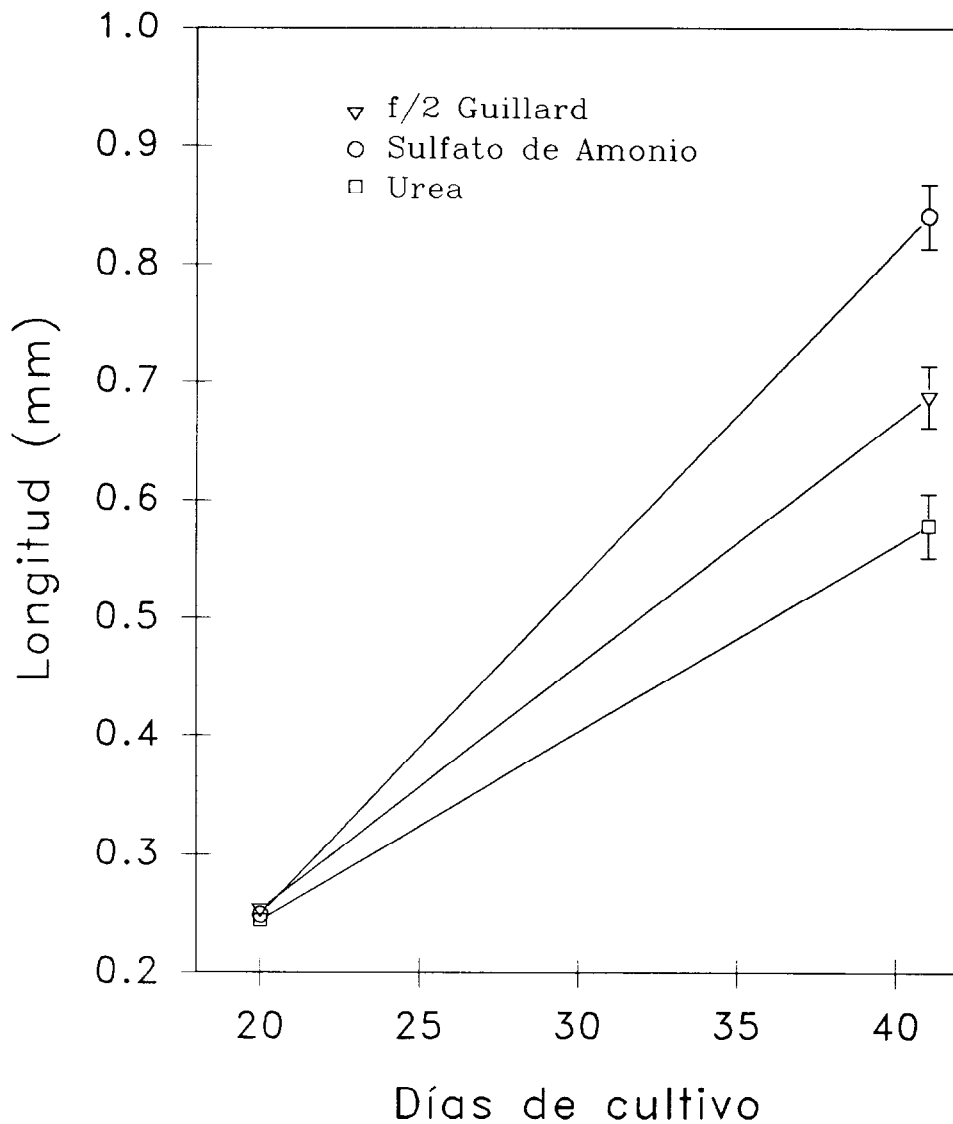


Figura 6. Crecimiento de la semilla de *Mytilus edulis* alimentada con *Pavlova lutheri* cultivada con tres diferentes medios de cultivo. Se muestran los límites de confianza al 95%.

Figure 6. Growth of *Mytilus edulis* seed fed on *Pavlova lutheri* cultured with three different media. The 95% confidence limits are shown.

ción múltiple indicó que el medio diferente es el sulfato de amonio, donde los organismos alcanzan mayor talla (Fig. 6).

Con los datos del total de semilla cosechada, la prueba ANOVA señaló que existen diferencias significativas entre los medios, y la prueba de comparación múltiple indicó que fue el medio alimentado con urea el que produjo más semilla, con 40,751 organismos, después el sulfato de amonio, con 36,733, y finalmente el f/2, con 33,213 organismos. Por tanto, el tratamiento con urea es el único significativamente diferente.

DISCUSION

El manejo de los recipientes de cultivo, la cantidad y calidad del alimento, junto con los procesos fisicoquímicos, son factores que modifican el buen crecimiento y supervivencia de larvas y semilla de bivalvos (Lucas, 1979). Durante la realización de este trabajo los recipientes de cultivo tuvieron un manejo idéntico, por lo que las diferencias encontradas no pueden atribuirse a variaciones de manejo; de igual manera, la temperatura en los tres medios fluctuó dentro del intervalo óptimo para un buen crecimiento y supervivencia de larvas de *Mytilus edulis* y *M. californianus* según lo reportan Lough (1974), Falmagne (1984) y Anguiano-Beltrán (1989), por lo tanto, es posible suponer que el efecto producido en el crecimiento, supervivencia y porcentaje de fijación sobre las larvas y semilla de *Mytilus edulis* es debido solamente a las diferencias en composición bioquímica que la microalga contenga debido a la fuente de nitrógeno en un medio de cultivo.

Muy poco se conoce acerca de los nutrientes específicos requeridos en cada fase del desarrollo de los moluscos bivalvos. Bayne (1975) informa que el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos para larvas de *Mytilus edulis* es, en promedio, de 8.6, 1.9 y 0.9% respectivamente; Enright *et al.* (1986) mencionan que los carbohidratos y lípidos son los componentes bioquímicos más importantes en la dieta de los moluscos bivalvos, y otros autores como Webb y Chu (1982) piensan que la calidad del alimento dado a larvas y juveniles de bivalvos no depende de su composición bioquímica gruesa, sino de la cantidad específica de otros nutrientes como ácidos grasos, aminoácidos, monosacáridos, minerales y vitaminas.

is only due to differences in the biochemical composition of the microalga because of the nitrogen source in the culture medium.

Little is known about the specific nutrients needed in each phase of development of bivalve molluscs. Bayne (1975) reports that protein, lipid and carbohydrate content for *Mytilus edulis* larvae is, on average, 8.6, 1.9 and 0.9%, respectively. Enright *et al.* (1986) mention that carbohydrates and lipids are the most important biochemical components in the diet of bivalve molluscs. Other authors, like Webb and Chu (1982), consider that the quality of the food given bivalve larvae and juveniles does not depend on its gross biochemical composition, but rather on the specific amount of other nutrients like fatty acids, amino acids, monosaccharides, minerals and vitamins.

Biochemical analyses have shown that when *Chlorella* sp. is cultured with urea, it lacks sufficient amounts of two amino acids: methionine and cysteine (Geldenhuys *et al.*, 1988). Likewise, *Isochrysis galbana* and *Chlorella* sp., among other microalgae, when cultured with different nitrogen sources such as urea, ammonium and nitrates, have a very similar biochemical composition under optimum culture conditions (Eppley *et al.*, 1971; Dortch *et al.*, 1984; Geldenhuys *et al.*, 1988).

Based on the above and since *Isochrysis galbana* and *Pavlova lutheri* have similar requirements and composition (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989), it can be inferred that *P. lutheri* cultured with urea as nitrogen source may also lack methionine and cysteine. This lack, at least in quantities required by *Mytilus edulis* larvae, may be responsible for the lesser growth recorded in the treatment with urea until before pediveliger stage.

Bayne (1965) mentions that bivalve molluscs, both juveniles and adults, have the same nutritional requirements. Malek (1977) found that, of 15 amino acids present in the adductor muscle of *Mytilus edulis*, methionine is found in considerable quantities. Slabyj (1980) reported a sufficient amount of methionine in natural and cultured mussels. Therefore, this amino acid can be considered an important nutritional requirement for bivalve molluscs.

The increase in growth of the larvae treated with urea at the end of larval development, may indicate that the larva's requirements during its development change qualita-

Análisis bioquímicos han demostrado que al cultivar *Chlorella* sp. con urea, ésta carece de cantidades suficientes de dos aminoácidos: metionina y cisteína (Geldenhuys *et al.*, 1988). De igual manera se sabe que *Isochrysis galbana* y *Chlorella* sp., entre otras microalgas, al ser cultivadas con diferentes fuentes de nitrógeno como urea, amonio y nitratos, tienen una composición bioquímica muy similar bajo condiciones óptimas de cultivo (Eppley *et al.*, 1971; Dortch *et al.*, 1984; Geldenhuys *et al.*, 1988).

Con base en lo anterior y debido a que *Isochrysis galbana* y *Pavlova lutheri* tienen requerimientos y composición similar (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989), podemos inferir que *P. lutheri*, cultivada con urea como fuente de nitrógeno pudiera carecer también de metionina y cisteína. Aparentemente esta carencia, al menos en cantidades requeridas por la larva de *Mytilus edulis*, podría ser la causante del menor crecimiento registrado con urea hasta antes del estadio pediveliger.

Bayne (1965) menciona que los moluscos bivalvos, tanto juveniles como adultos, tienen los mismos requerimientos nutricionales. Malek (1977) encontró que, de 15 aminoácidos presentes en el músculo aductor de *Mytilus edulis*, la metionina se encuentra en cantidades considerables, y Slabyj (1980) informa de cantidades suficientes de metionina en mejillones silvestres y cultivados. Por tanto, se puede considerar importante este aminoácido dentro de los requerimientos nutricionales de los moluscos bivalvos.

El incremento en el crecimiento de las larvas tratadas con urea al final del desarrollo larvario, pudiera sugerir que los requerimientos de la larva durante su desarrollo van cambiando cualitativa y/o cuantitativamente, o bien, que en el estadio pediveliger la larva de *Mytilus edulis* adquiere la capacidad de suplir la falta de metionina y/o cisteína con otros compuestos contenidos en *Pavlova lutheri* cultivada con urea, asumiendo que efectivamente hubiera una carencia de estos dos aminoácidos en *Pavlova lutheri*.

El comportamiento similar en el crecimiento de las larvas tratadas con f/2 y con sulfato de amonio es un indicador de que éstas durante todo su desarrollo encontraron en *Pavlova lutheri* sus requerimientos esenciales para un buen crecimiento, lo que ubica al sulfato de amonio como un buen sustituto del f/2 para abaratar costos y obtener buenos

tivamente and/or quantitatively, or rather, that in the pediveliger stage, the larva of *Mytilus edulis* acquires the ability to make up for the lack of methionine and/or cysteine with other compounds found in *Pavlova lutheri* cultured with urea, that is assuming that there is a lack of these two amino acids in *P. lutheri*.

The similar behaviour in the growth of larvae treated with f/2 and with ammonium sulphate indicates that throughout their development, the larvae obtained their essential requirements for good growth from *P. lutheri*. This shows that ammonium sulphate is a good substitute for f/2 in order to reduce costs and obtain good yields in the laboratory production of at least *Mytilus edulis*.

The appearance of the eyespot is intimately related to growth. Hence, it appeared earlier in the treatment with f/2 than in the other two, although on day 20 there was no longer any significant difference between the treatments with ammonium sulphate and urea (Fig. 2).

The high percentages (>87%) of total survival obtained in this experiment from stage D to pediveliger larva, are very different from those reported by Zhang (1984), 34 and 30% for spring 1981 and summer 1982 respectively, and by Waterstrat *et al.* (1980), 0.4% from embryo to pediveliger. In this respect, the effect of two factors that may be interacting should be considered: the initial selection of larvae at the beginning of the experiment (only larvae retained on 70- μ m sieves were used) and differences in the volumes handled, since Zhang (1984) used 3 and 5-m³ tanks whereas in this experiment 15-l containers were used. Lucas (1979) indicates that the handling of a large volume in a culture causes stress in the organisms, resulting in low survival.

A similar percentage of metamorphosis was obtained with urea (91.59%) and ammonium sulphate (97.33%), whereas that obtained with f/2 was significantly different (75.92%). Similar values as the one for f/2 have been reported by other authors: 76.6% by Waterstrat *et al.* (1980), and 82.1 and 72.4% by Zhang (1984). In general, it may be said that the percentages of metamorphosis were similar to those obtained by other authors, being slightly higher in this bioassay in which agricultural fertilizers were used.

During metamorphosis, the postlarvae treated with ammonium sulphate had a homo-

rendimientos en laboratorios de producción, al menos para el mejillón *Mytilus edulis*.

Como es natural, la aparición de la mancha ocular está íntimamente relacionada con el crecimiento, de aquí que en el tratamiento con f/2, la aparición de ésta fue más temprana en comparación con los otros dos medios, aunque en el día 20 ya no hubo diferencia significativa entre el de sulfato de amonio y el de urea (Fig. 2).

El porcentaje tan alto (>87%) de supervivencia total obtenido en este experimento desde el estadio D hasta larva pediveliger, contrastan fuertemente con los indicados por Zhang (1984), en la primavera de 1981 y el verano de 1982, cuando obtuvo el 34 y 30% respectivamente, y los resultados de Waterstrat *et al.* (1980), quienes informaron de una supervivencia del 0.4% desde embriones hasta pediveliger. En este punto habría que tomar en consideración el efecto de dos factores que pudieran estar interactuando: la selección inicial realizada sobre las larvas al inicio del experimento -utilizando solamente las larvas retenidas en el tamiz de 70 μm - o bien, el efecto ocasionado por la diferencias en el manejo debido al escalamiento, ya que Zhang (1984) utilizó tanques de 3 y 5 m³, mientras que en este experimento se utilizaron recipientes de 15 l. Lucas (1979) indica que el manejar un volumen grande en el cultivo causa cierto estrés en los organismos ocasionando bajas supervivencias.

El porcentaje de metamorfosis no fue significativamente diferente para urea (91.59%) y sulfato de amonio (97.33%), los cuales fueron diferentes del f/2 (75.92%). Valores similares a este último han sido proporcionados por otros autores como Waterstrat *et al.* (1980), quienes informan de un 76.6% de metamorfosis, y Zhang (1984), quien obtuvo el 82.1 y 72.4%. De manera general se podría decir que los porcentajes de metamorfosis fueron parecidos a los encontrados por otros autores, aunque ligeramente mayores en el presente bioensayo que utilizó fertilizantes agrícolas.

Durante la metamorfosis las postlarvas tratadas con sulfato de amonio mostraron una distribución homogénea en el fondo de los recipientes de cultivo, mientras que la semilla tratada con f/2 y urea presentó aglomeraciones de organismos. Este pudo ser el factor que permitió que los organismos tratados con sulfato de amonio tuvieran un mayor creci-

geneous distribution at the bottom of the containers, whereas those treated with f/2 and urea formed clumps of organisms. This may have been the factor that allowed the organisms treated with ammonium sulphate to have greater growth (Fig. 6), since the clumping of seed creates a competition for food and space and causes lesser growth (Walne, 1965). However, there is the possibility that microalgae cultured with ammonium sulphate may really be the better food for seed than those cultured with the other two media, or rather, that both factors are acting in a joint manner.

Wilburn-González (1990) cultured *Pavlova lutheri* with the same nitrogen sources that were used in this study and found that production costs based on the reactives are reduced by 98.81 and 99.19% with ammonium sulphate and urea, respectively, relative to f/2. This and the results obtained herein, confirm that the abovementioned agricultural fertilizers can be used in the laboratory production of microalgae, with the advantage that they are simple and economical alternatives for the preparation of culture media to be used in the production of food for bivalve molluscs.

English translation by Christine Harris.

miento (Fig. 6), ya que esta aglomeración de la semilla origina una competencia por alimento y espacio, que ocasiona menor crecimiento (Walne, 1965). Sin embargo, existe la posibilidad de que las microalgas cultivadas con sulfato de amonio realmente sean un mejor alimento para la semilla que las cultivadas con los otros dos medios, o bien, que ambos factores están actuando de manera combinada.

Wilburn-González (1990) cultivó *Pavlova lutheri* con las mismas fuentes de nitrógeno utilizadas en este estudio y encontró que los costos de producción con base en los reactivos se reducen en un 98.81 y 99.19% con sulfato de amonio y urea, respecto al f/2. De acuerdo con lo anterior y con los resultados de este trabajo, se confirma la posibilidad de utilizar los fertilizantes agrícolas mencionados anteriormente en laboratorios de producción, con la ventaja de que éstos son alternativas sencillas y económicas para la preparación de medios de cultivo destinados a la producción de alimento de moluscos bivalvos.

LITERATURA CITADA

- Anguiano-Beltrán, C. (1989). Efecto de la temperatura, salinidad y concentración de alimento sobre el desarrollo larval de *Mytilus californianus*. Tesis profesional, FCM, UABC, Ensenada, B.C., México, 95 pp.
- Bayne, R.L. (1965) Growth and the delay of metamorphosis of larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia*, 2(1): 1-17.
- Bayne, B.L. (1975). Reproduction in bivalve molluscs under environmental stress. In: F.J. Vember (ed.), *Physiological Ecology of Estuarine Organisms*. Univ. of South Carolina Press, Columbia, pp. 259-277.
- Chanley, P. (1975). Laboratory cultivation of assorted bivalve mollusks. In: W.L. Smith and M.H. Chanley (eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*, Plenum Press, pp. 297-318.
- De la Cruz, A. (1985). Crecimiento de fitoplancton en cultivo bialgal. Univ. de La Habana, *Rev. Invest. Mar.*, 6(2-3): 109-116.
- De la Cruz, S. y Alfonso, E. (1975). Cultivo masivo de algas planctónicas marinas mediante fertilización. Univ. de La Habana, *Rev. Invest. Mar.*, 8(17): 1-25.
- De Pauw, N. (1981). Use and production of microalgae as food for nursery bivalves, pp. 35-69. In: C.N. Claus, N. De Pauw and E. Jaspers (eds.), *Nursery Culturing of Bivalve Molluscs*. EMS Special Pub. No. 7, European Mariculture Society, Bredene, Belgium, 394 pp.
- Dortch, Q., Clayton, J.R., Thoresen, S.S. and Ahmed, S.I. (1984). Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. *Mar. Biol.*, 81: 237-250.
- Enright, C.T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S. and Castell, J.D. (1986). Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilaris*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 96: 15-26.
- Eppley, R.W., Carlucci, A.F., Holm-Hansen, O., Kiefer, D., McCarthy, J.J., Venrick, E. and Williams, P.M. (1971). Phytoplankton growth and composition in ship board culture supplied with nitrate, ammonium, or urea as the nitrogen source. *Inst. of Mar. Resources, Univ. of California*, 16(5): 741-751.
- Falmagne, C.M. (1984). The combined effect of temperature/salinity on survival and growth of *Mytilus californianus* larvae (a response surface analysis). M.Sc. thesis, Univ. of Washington, 85 pp.
- Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., Ferreira, M.J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M.J. and Labarta, V. (1989). Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, 83: 17-37.
- Geldenhuis, D.J., Walmsley, R.D. and Toerien, D.F. (1988). Quality of algal material produced on a fertilizer-tap water medium in outdoor plastic-enclosed systems. *Aquaculture*, 68: 157-164.
- Granados-Machuca, C. y Bückle-Ramírez, L.F. (1984). Cultivo de las microalgas *Pavlova lutheri* y *Skeletonema costatum* con nutrientes producidos con estiércoles digeridos. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol.*, UNAM, 1(11): 241-256.
- Guerrero, V.S., Farina, T.T. and Silva, A.A. (1981). Large-scale outdoor algal production for rearing seed oysters and clams to juvenile stage, pp. 117-139. In: C.N. Claus, N. De Pauw and E. Jaspers (eds.), *Nursery Culturing of Bivalve Molluscs*. EMS Special Pub. No. 7, European Mariculture Society, Bredene, Belgium, 394 pp.
- Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, pp. 29-60. In: W.L. Smith and M.H. Chanley (eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Publishing Corp., New York, 338 pp.
- Harger, J.R.E. (1970). Comparison among growth characteristics of two species of sea mussel, *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. *The Veliger*, 13(1): 44-55.
- Hrs-Brenko, M. and Calabrese, A. (1969). The combined effects of temperature and salinity on larvae of mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 4: 224-226.
- Loosanoff, V.L. and Engle, J.B. (1942). Use of complete fertilizers in cultivation of microorganisms. *Science*, 95: 487-488.
- Lough, R.G. (1974). A re-evaluation of the combined effects of temperature and salinity on survival and growth of *Mytilus edulis* larvae using response

- surface techniques. Proc. National Shellfisheries Association, 64: 73-76.
- Lucas, R. (1979). Croissance de jeunes palourdes (*Venerupis semidecussata*) en nurserie et en mer, en fonction des conditions d'élevage. Publi. Sci. Tech. CNEXO, Actes Colloq., 7: 85-104.
- Malek, E.A. (1977). Diets and culture media for mollusks. In: M. Rechigl Jr. (ed.), CRC Handbook Series in Nutrition and Food. Section G: Diets, Culture Media, Food Supplements, Vol. II, pp. 107-116.
- McAnally-Salas, L.S. (1988). Evaluación y adaptación de rutinas para la producción de semilla suelta de ostión japonés *Crassostrea gigas* a nivel piloto. Tesis profesional, FCM, UABC, Ensenada, B.C., México, 139 pp.
- Parson, T.R., Stephen, K. and Strickland, J.D.H. (1961). On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. J. Fish. Res. Bd. Canada, 18: 1001-1016.
- Persoone, G. and Claus, C. (1980). Mass culture of algae: a bottle-neck in the nursery culturing of molluscs. In: G. Shelef and C.J. Soeder (eds.), Algae Biomass. Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 265-285.
- Riva, A. and Lelong, P. (1981). Growth of juvenile bivalve molluscs associated with continuous cultures of natural marine phytoplankton, pp. 253-268. In: C.N. Claus, N. De Pauw and E. Jaspers (eds.), Nursery Culturing of Bivalve Molluscs. EMS Special Pub. No. 7, European Mariculture Society, Bredene, Belgium, 394 pp.
- Slabyj, B.M. (1980). Storage and processing of mussels. In: R.A. Lutz (ed.), Mussel Culture and Harvest: A North America Perspective. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, 7: 247-265.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1981). Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. Second edition, W.H. Freeman and Co., pp. 859.
- Stubbins, H.G. (1954). Biology of the common mussel in relation to fouling problems. Research, London, 7: 222-229.
- Walne, P.R. (1965). Observations on the influence of food supply and temperature on the feeding and growth of the larvae of *Ostrea edulis* L. Fish. Invest., London, Ser. 2, 24(1): 45 pp.
- Waterstrat, P., Chew, K., Johnson, K. and Beattie, J.H. (1980). Mussel culture: a West Coast perspective. In: R.A. Lutz (ed.), Mussel Culture and Harvest: A North America Perspective. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, 7: 141-165.
- Webb, K.L. and Chu, F.L. (1982). Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In: G. Pruder, C.J. Langdon and D.E. Conkling (eds.), Proc. Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition, 2. Louisiana State Univ., Baton Rouge, pp. 272-291.
- Wilburn-González, J.G. (1990). Cultivo masivo de *Pavlova lutheri* (Droop) Green con fertilizantes agrícolas como fuente de nitrógeno y bióxido de carbono. Tesis profesional, FCM, UABC, Ensenada, B.C., México, 50 pp.
- Winter, J. (1978). Fundamental knowledge of suspension-feeding in lamelibranchiate systems. Aquaculture, 13: 1-33.
- Zhang, F. (1984). Mussel culture in China. Aquaculture, 39: 1-10.