

## Nota de Investigación/Research Note

### Effect of darkness on the early postlarval development of *Haliotis corrugata* abalone fed different diatom densities

### Efecto de la oscuridad sobre el desarrollo postlarval inicial del abulón *Haliotis corrugata* alimentado con diferentes densidades de diatomeas

E Gorrostieta-Hurtado, R Searcy-Bernal\*, C Anguiano-Beltrán, Z García-Esquivel, E Valenzuela-Espinoza

Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Km 103 Carretera Tijuana-Ensenada, Apartado postal 453, Ensenada CP 22860, Baja California, México. \* E-mail: rsearcy@uabc.mx

#### Abstract

Four-day-old postlarvae of the abalone *Haliotis corrugata* were exposed to different diatom densities (*Navicula incerta*, 0 to 8000 cells mm<sup>-2</sup>) under two illumination conditions: constant light (19–21  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and darkness. The effect of these two factors on postlarval grazing rate, survival, and growth was evaluated. The experiment was conducted for 14 days in 10-mL sterile wells following a split-plot experimental design with three replicates per treatment. The highest grazing rate was observed in the 2000 cells mm<sup>-2</sup> density treatment and it was higher in darkness ( $196 \pm 67 \text{ cells pl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) than in constant light ( $139 \pm 36 \text{ cells pl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Mean survival was also higher in darkness (59%) than under constant light (44%), as was mean growth rate (20 and 14  $\mu\text{m d}^{-1}$ , respectively). Growth rate at the end of the experimental period tended to decrease with the increase in diatom density. Higher grazing and growth rates in darkness reinforce the hypothesis that the nocturnal habits of abalone develop soon after metamorphosis and not at juvenile stages as usually considered.

**Key words:** abalone, darkness, growth, *Haliotis corrugata*, postlarvae.

#### Resumen

Se realizó un experimento con postlarvas del abulón *Haliotis corrugata* de cuatro días de edad en dos condiciones de iluminación, luz continua (19 a 21  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad, y alimentados con diferentes densidades de diatomeas (*Navicula incerta*, 0 a 8000 cél mm<sup>-2</sup>), para evaluar el efecto de estos dos factores sobre la tasa de pastoreo, la supervivencia, y la tasa de crecimiento postlarvales. El experimento se llevó a cabo durante 14 días en cámaras estériles de 10 mL siguiendo un diseño de parcelas divididas con tres réplicas por tratamiento. El promedio máximo de la tasa de pastoreo se presentó con una densidad de 2000 cél mm<sup>-2</sup>, siendo mayor en la oscuridad ( $196 \pm 67 \text{ cél pl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) que en la luz ( $139 \pm 36 \text{ cél pl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). El promedio de supervivencia también fue mayor en la oscuridad (59%) que en la luz (44%), al igual que la tasa media de crecimiento (20  $\mu\text{m d}^{-1}$  y 14  $\mu\text{m d}^{-1}$ , respectivamente). Al final del periodo experimental la tasa de crecimiento tendió a disminuir con el aumento de la densidad de diatomeas. Las mayores tasas de pastoreo y crecimiento en la oscuridad refuerzan la hipótesis de que los hábitos nocturnos en los abulones se desarrollan poco después de la metamorfosis y no hasta estadios juveniles como generalmente se considera.

**Palabras claves:** abulón, crecimiento, *Haliotis corrugata*, oscuridad, postlarvas.

#### Introduction

Juvenile and adult abalone have nocturnal habits and their most active feeding period begins at dusk and continues until they are satiated (Leighton 2000). Research conducted on juveniles and adults of different species of abalone has shown that in a dark environment the feeding rate can be from 0.9% to 24.1% higher and the growth rate from 16% to 259% higher than under light conditions (Kim *et al.* 1997, Huchette 2003, García-Esquivel *et al.* 2007). Whether postlarval abalone have similar nocturnal habits as those of juvenile and adult abalone is not known; however, experiments have shown that the grazing rate of 6-day-old *Haliotis rufescens* postlarvae is 37%

#### Introducción

Los abulones juveniles y adultos tienen hábitos nocturnos y su periodo de alimentación más activo inicia al oscurecer y continúa hasta saciarse (Leighton 2000). Los estudios realizados con juveniles y adultos de diferentes especies de abulón han demostrado que la tasa de alimentación puede ser de 0.9% a 24.1% mayor en cultivos en la oscuridad con respecto a cultivos en la luz. La tasa de crecimiento también puede alcanzar valores entre 16% y 259% mayores en la oscuridad (Kim *et al.* 1997, Huchette 2003, García-Esquivel *et al.* 2007). Se desconoce si las postlarvas de abulón tienen hábitos nocturnos similares a los abulones juveniles y adultos; sin embargo, a nivel

higher in the dark than in the light ( $19\text{--}33 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Searcy-Bernal and Gorrostieta-Hurtado 2007).

Growth of *Haliotis fulgens* postlarvae is favored by low intensity light ( $6 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Searcy-Bernal *et al.* 2003), while *H. rufescens* postlarvae grow up to three times more in the dark than in the light, an effect that can be observed since the first week of age (Gorrostieta-Hurtado and Searcy-Bernal 2004, Searcy-Bernal and Gorrostieta-Hurtado 2007). In general, postlarval growth depends on the amount of food supplied, but this dependency can also be modified by the illumination provided. Gorrostieta-Hurtado and Searcy-Bernal (2004) found that under constant dark conditions the growth rate of 2- to 12-day-old *H. rufescens* postlarvae was greater at a density of the diatom *Navicula incerta* of 1000 cells  $\text{mm}^{-2}$ , remaining more or less constant until 3000 cells  $\text{mm}^{-2}$ , as opposed to under constant light conditions, when the growth rate was similar at diatom densities of 250 to 3000 cells  $\text{mm}^{-2}$ . In a second evaluation, these authors found that growth of 12- to 20-day-old postlarvae increased in the dark until the maximum density tested (3000 cells  $\text{mm}^{-2}$ ), but under constant light postlarval growth was similar at different diatom densities.

The increase in grazing and growth rates of *H. rufescens* postlarvae in darkness suggests that abalone can develop nocturnal habits shortly after metamorphosis; that is, long before reaching the late juvenile stage as had been considered until now. This study therefore aims to determine the grazing, survival, and growth rates of *Haliotis corrugata* postlarvae (fed on densities of up to 8000 cells  $\text{mm}^{-2}$  of *N. incerta*) during the first two weeks of age under dark and light conditions, and to evaluate whether these rates are favored by darkness.

## Material and methods

*Haliotis corrugata* larvae were obtained in December 2002 from a commercial farm (B.C. Abalone, Ejido Eréndira, Baja California, Mexico), and the diatom *N. incerta* was provided by the Microalgal Laboratory at the Institute of Oceanological Research of the University of Baja California (UABC).

Larval metamorphosis was induced by  $1.5 \mu\text{M}$  gamma-aminobutyric acid (GABA) (Searcy-Bernal and Anguiano-Beltrán 1998). After one day a mixture of *Nitzschia* sp., *Amphora* sp., and *N. incerta* diatoms was supplied as postlarval feed until the beginning of the experiment. Ultraviolet-irradiated,  $1\text{-}\mu\text{m}$  filtered seawater was changed daily.

The effect of darkness and light, as well as of five different densities of the diatom *N. incerta* on grazing rate, survival, and growth of *H. corrugata* postlarvae was evaluated using a split-plot experimental design (Steel *et al.* 1997). The experimental system consisted of six cell culture plates with six 10-mL wells ( $9.45 \text{ cm}^2$ , Falcon 3046), maintained at  $17 \pm 1^\circ\text{C}$ . Five wells of each plate were inoculated with diatom densities of 0, 500, 750, 1000, and 2000 cells  $\text{mm}^{-2}$ . One day later, between 10 and 14 four-day-old postlarvae were transferred using a brush to each well, after having been starved for 12 h. For the dark condition, three culture plates were individually covered with a

experimental se ha encontrado que la tasa de pastoreo de las postlarvas de *Haliotis rufescens* de seis días de edad es 37% mayor en condiciones de oscuridad que en la luz ( $19\text{--}33 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Searcy-Bernal y Gorrostieta-Hurtado 2007).

El crecimiento de las postlarvas de *Haliotis fulgens* es favorecido por la luz de baja intensidad ( $6 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Searcy-Bernal *et al.* 2003) y las postlarvas de *H. rufescens* crecen hasta tres veces más en la oscuridad que en la luz. Este efecto se puede observar desde la primera semana de edad (Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal 2004, Searcy-Bernal y Gorrostieta-Hurtado 2007). En general, el crecimiento de las postlarvas depende de la cantidad de alimento suministrado, pero esta dependencia también se puede modificar por la iluminación proporcionada. Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal (2004) encontraron que en condiciones de oscuridad la tasa de crecimiento de las postlarvas de *H. rufescens* de 2 a 12 días de edad es mayor a una densidad de la diatomea *Navicula incerta* de 1000 cél  $\text{mm}^{-2}$ , y se mantiene más o menos constante hasta 3000 cél  $\text{mm}^{-2}$ , a diferencia de la condición de luz, donde la tasa de crecimiento fue similar en densidades de diatomeas de 250 a 3000 cél  $\text{mm}^{-2}$ . En un segundo periodo de evaluación, estos autores reportan que las postlarvas de 12 a 20 días de edad incrementaron su crecimiento hasta la densidad máxima probada (3000 cél  $\text{mm}^{-2}$ ) en la oscuridad, mientras que en condiciones de luz el crecimiento fue similar con diferentes densidades de diatomeas.

El incremento de las tasas de pastoreo y de crecimiento postlarval de *H. rufescens* en condiciones de oscuridad son elementos que sugieren que los abalones pueden desarrollar hábitos nocturnos poco después de la metamorfosis; es decir, mucho antes de llegar a la etapa juvenil tardía como se ha considerado hasta ahora. Este trabajo se realizó con la finalidad de conocer la tasa de pastoreo, supervivencia y tasa de crecimiento de las postlarvas de *Haliotis corrugata* durante las dos primeras semanas de edad en condiciones de oscuridad y luz, alimentadas con densidades de hasta 8000 cél  $\text{mm}^{-2}$  de *N. incerta*, para determinar si estas tasas son favorecidas por las condiciones de oscuridad.

## Materiales y métodos

Las larvas de *H. corrugata* fueron suministradas en diciembre de 2002 por la granja comercial BC Abalone, localizada en el Ejido Eréndira, Baja California, México. Las diatomeas *N. incerta* fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

La metamorfosis larval se indujo con ácido gamma-aminobutírico (GABA)  $1.5 \mu\text{M}$  (Searcy-Bernal y Anguiano-Beltrán 1998). Un día después se agregó una mezcla de diatomeas *Nitzschia* sp., *Amphora* sp. y *N. incerta*, como alimento de las postlarvas hasta el inicio del experimento. Se realizaron recambios de agua diarios con agua de mar filtrada hasta  $1 \mu\text{m}$  e irradiada con luz ultravioleta.

black polyethylene bag, and for the light condition, three plates were illuminated by fluorescent light at  $20 \pm 1 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The seawater in each well was changed daily (10 mL of 1- $\mu\text{m}$  filtered, ultraviolet-irradiated, sterilized seawater).

After seven days of treatment, the diatom biofilm was removed with a brush and rinsed in seawater. Densities of 0, 1000, 2000, 4000, and 8000 cells  $\text{mm}^{-2}$  of *N. incerta* were then reinoculated into the wells containing 0, 500, 750, 1000, and 2000 cells  $\text{mm}^{-2}$ , respectively, to compensate for postlarval growth. Postlarvae were maintained in these conditions for another seven days.

To estimate the initial grazing rate, after 2 h of having placed the postlarvae in the culture vessels the cleared area of the diatom biofilm was recorded using a video camera (Sony SSC-C374) connected to an inverted microscope (Meiji Techno). The images were digitized using the Hauppauge WinTV USB program for Windows. An inverted microscope was used to count the diatoms in the biofilm and in three randomly-selected fields ( $0.031 \text{ mm}^2$ ) of the cleared area. To avoid overestimating the grazing rate, the density of diatoms in the cleared area was subtracted from the density of diatoms in the biofilm. The grazing rate (cells  $\text{pl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) was obtained as follows:

$$\text{Grazing rate} = \frac{(\text{Cleared area}) (\text{Diatom density})}{(\text{Grazing time})(\text{Number of postlarvae})}$$

Survival percentage was determined by counting live postlarvae after 6 and 14 days (10 and 18 days of age). To determine the growth rate, the length of postlarvae was recorded on days 0, 8, and 14 (4, 12, and 18 days of age). The measurements and counting (cleared area, length and number of diatoms) were made using the Scion Image (4.0.2) program.

To evaluate the effect of constant light and darkness, the density of *N. incerta*, and the interaction of these factors on postlarvae, a split-plot analysis of variance was performed using JMP software (version 3.2.6, SAS Institute Inc.). Survival percentages were arcsine square-root transformed before the analysis of variance. Statistical tests were performed with a significance level of 0.05. Tukey's test was applied after the significance analyses. When the interaction was significant the tests were conducted separately for each factor (Steel *et al.* 1997).

## Results

### Grazing rate

The maximum mean grazing rate value was found in the 2000 cells  $\text{mm}^{-2}$  density treatment, both in constant light ( $139 \pm 36$  cells  $\text{pl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) and in darkness ( $196 \pm 67$  cells  $\text{pl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) (fig. 1). No significant differences were detected in relation to the light-dark factor, though in three of the four diatom densities grazing was higher in darkness. Significant differences were found in relation to diatom density (table 1):

Se analizó el efecto de la condición de luz y oscuridad así como de cinco diferentes densidades de diatomeas *N. incerta* sobre la supervivencia, la tasa de pastoreo y el crecimiento mediante un diseño experimental de parcelas divididas (Steel *et al.* 1997). El sistema experimental consistió de seis cajas de cultivo celular con seis cámaras con capacidad de 10 mL ( $9.45 \text{ cm}^2$ , Falcon 3046) que fueron mantenidas a  $17 \pm 1^\circ\text{C}$ . Se inocularon cinco cámaras de cada caja con diatomeas a densidades de 0, 500, 750, 1000 y 2000 cél  $\text{mm}^{-2}$  y un día después se transfirieron con un pincel de 10 a 14 postlarvas de cuatro días de edad a cada una de las cámaras, después de mantenerlas durante 12 h en inanición. Las tres cajas de cultivo en condiciones de oscuridad fueron cubiertas individualmente con una bolsa de polietileno negro y las cajas en condiciones de luz estuvieron iluminadas por luz fluorescente a  $20 \pm 1 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A cada cámara se le cambió el agua de mar diariamente con 10 mL de agua de mar filtrada hasta 1  $\mu\text{m}$ , irradiada con luz ultravioleta y esterilizada.

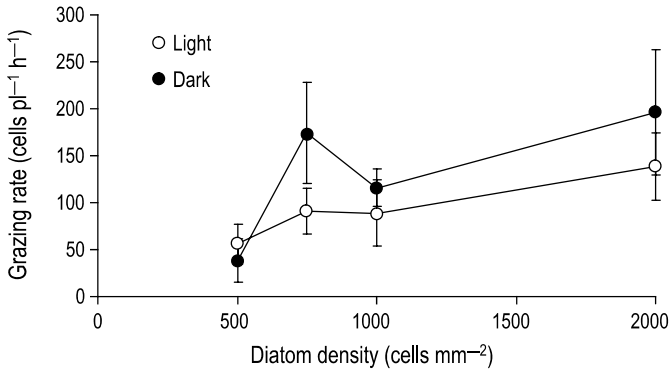
Después de siete días en el tratamiento, con un pincel se eliminó la biopelícula de diatomeas y se enjuagó con agua de mar para posteriormente reinocular densidades de 0, 1000, 2000, 4000 y 8000 cél  $\text{mm}^{-2}$  de *N. incerta* en las cámaras de 0, 500, 750, 1000 y 2000 cél  $\text{mm}^{-2}$ , respectivamente, para compensar el crecimiento postlarval. Las postlarvas permanecieron en estas condiciones durante otros siete días.

Para estimar la tasa de pastoreo inicial se videograbó el área clareada de la biopelícula de diatomeas después de 2 h de colocar las postlarvas en los recipientes, mediante una cámara de video (Sony SSC-C374) conectada a un microscopio invertido (Meiji Techno) y las imágenes fueron digitalizadas en una computadora con el programa WinTV Hauppauge USB para Windows. Posteriormente, con ayuda de un microscopio invertido, se contaron las diatomeas presentes en la biopelícula y en tres campos ( $0.031 \text{ mm}^2$ ) del área clareada, seleccionados al azar. Para evitar sobreestimar la tasa de pastoreo se restó la densidad de diatomeas del área clareada a la densidad de diatomeas de la biopelícula. La tasa de pastoreo (cél  $\text{pl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) se obtuvo mediante:

$$\text{Tasa de pastoreo} = \frac{(\text{Área clareada}) (\text{Densidad de diatomeas})}{(\text{Tiempo de pastoreo})(\text{No. de postlarvas})}$$

El porcentaje de supervivencia se evaluó por conteo directo de las postlarvas a los 6 y 14 días (10 y 18 días de edad). Para evaluar la tasa de crecimiento se realizaron videograbaciones de la longitud de las postlarvas a los 0, 8 y 14 días (4, 12 y 18 días de edad). Las mediciones y conteos (área clareada, longitud y número de diatomeas) se realizaron con el programa Scion Image (4.0.2).

Para evaluar el efecto de las condiciones de luz y oscuridad, la densidad de *N. incerta* y la interacción de estos factores en las postlarvas, se llevó a cabo un análisis de varianza de parcelas divididas utilizando el programa JMP (versión 3.2.6, SAS Institute Inc.). Los porcentajes de supervivencia fueron transformados a la raíz cuadrada de su arco seno antes del análisis



**Figure 1.** Mean grazing rate ( $\pm$  standard error) of four-day-old *Haliotis corrugata* postlarvae cultured using different densities of *Navicula incerta* and under light and dark conditions ( $n = 3$ ).

**Figura 1.** Tasa de pastoreo media ( $\pm$  error estándar) de las postlarvas de *Haliotis corrugata* de cuatro días de edad en diferentes densidades de *Navicula incerta* y condiciones de luz y oscuridad ( $n = 3$ ).

Tukey's test indicated that grazing was significantly higher in the 2000 cells mm<sup>-2</sup> than in the 500 cells mm<sup>-2</sup> treatment.

**Survival**

Mean survival of the 4- to 10-day-old postlarvae was greater than 83% and there were no significant differences among treatments (fig. 2, table 1). During the second week (10 to 18 days of age), mean survival was significantly greater in the dark (63%) than in the light (43%) (fig. 2, table 1), with highest survival occurring at diatom densities of 2000 and 1000 cells mm<sup>-2</sup> under dark and light conditions, respectively (fig. 2). Cumulative survival for the entire experiment was almost identical to that of the second period.

**Growth rate**

Postlarval length was generally greater under dark conditions (fig. 3), and significant differences were observed on day

de varianza. Las pruebas estadísticas se efectuaron con un nivel de significancia de 0.05. Después de los análisis de significancia se realizaron pruebas de Tukey. Cuando se encontró que la interacción era significativa se realizaron pruebas por separado para cada factor (Steel *et al.* 1997).

**Resultados**

*Tasa de pastoreo*

El promedio máximo de la tasa de pastoreo se observó en el tratamiento con 2000 cél mm<sup>-2</sup>, tanto en la luz (139  $\pm$  36 cél pl<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) como en la oscuridad (196  $\pm$  67 cél pl<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) (fig. 1). No se detectaron diferencias significativas con respecto al factor luz-oscuridad; sin embargo, en tres de las cuatro densidades de diatomeas el pastoreo fue mayor en la oscuridad. Con respecto a la densidad de diatomeas las diferencias fueron significativas (tabla 1) y la prueba de Tukey indicó que el pastoreo en presencia de 2000 cél mm<sup>-2</sup> fue significativamente mayor que con 500 cél mm<sup>-2</sup>.

*Supervivencia*

El promedio de supervivencia de las postlarvas de 4 a 10 días de edad fue superior a 83% y no se observaron diferencias significativas entre tratamientos (fig. 2, tabla 1). Durante la segunda semana (edades de 10 a 18 días) la supervivencia media fue significativamente mayor en la oscuridad (63%) que en la luz (43%) (fig. 2, tabla 1). En este segundo periodo la mayor supervivencia en la oscuridad se dió con 2000 cél mm<sup>-2</sup> y en la luz con 1000 cél mm<sup>-2</sup> (fig. 2) de diatomeas. La supervivencia acumulada durante todo el experimento fue casi idéntica a la del segundo periodo.

*Tasa de crecimiento*

En general la longitud de las postlarvas fue mayor en el tratamiento en la oscuridad (fig. 3). Estas diferencias fueron

**Table 1.** Split-plot analysis for grazing rate, survival, and growth rate.

**Tabla 1.** Análisis de parcelas divididas para la tasa de pastoreo, la supervivencia y la tasa de crecimiento.

	Experimental period (days)	Postlarval age (days)	Light-dark condition d.f. = (1, 4)		Density of <i>Navicula incerta</i> d.f. = (5, 20)		Interaction (d.f. = 5, 20)	
			F	P	F	P	F	P
Grazing	2 h	4	2.64	0.18	5.35	7 $\times$ 10 <sup>-3</sup>	0.95	0.43
Survival	0-6	4-10	0.05	0.83	0.81	0.53	2.33	0.09
	6-14	10-18	11.97	0.025	2.64	0.06	2.53	0.07
	0-14	4-18	4.07	0.114	2.19	0.105	1.69	0.18
Growth	0-8	4-12	12.03	0.025	39.01	4 $\times$ 10 <sup>-9</sup>	22.14	4 $\times$ 10 <sup>-7</sup>
	8-14	12-18	77.07	9 $\times$ 10 <sup>-4</sup>	4.32	0.01	10.8	8 $\times$ 10 <sup>-5</sup>
	0-14	4-18	70.27	0.001	24.09	2 $\times$ 10 <sup>-7</sup>	41.39	2 $\times$ 10 <sup>-9</sup>

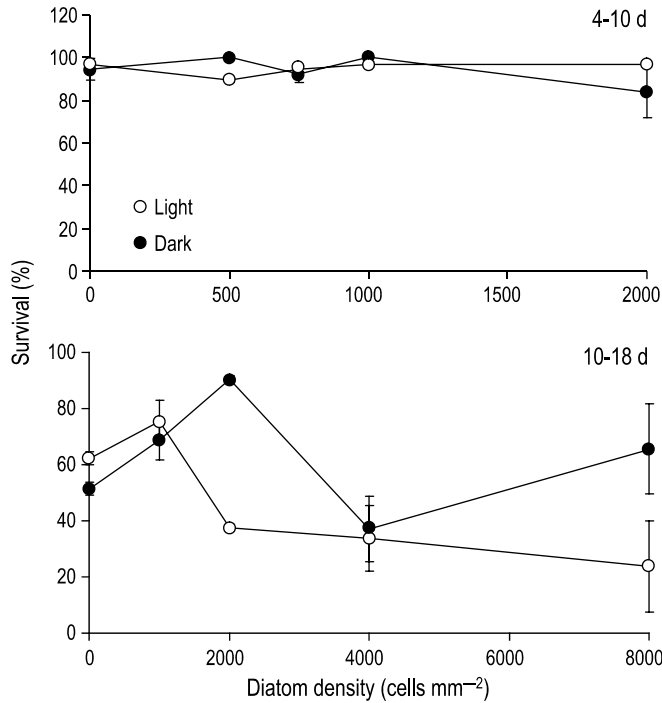


Figure 2. Mean survival percentage ( $\pm$  standard error) of *Haliotis corrugata* postlarvae of different ages (days) after settlement ( $n = 3$ ).

Figura 2. Porcentaje medio de supervivencia ( $\pm$  error estándar) de las postlarvas de *Haliotis corrugata* de distintas edades (días) después del asentamiento ( $n = 3$ ).

12 ( $F = 6.012$ ,  $P = 0.021$ ) and at the end of the experiment ( $F = 9.143$ ,  $P = 0.006$ ), when length in darkness was 17.6% greater than in constant light. Mean growth rate was 14 and 20  $\mu\text{m d}^{-1}$  in the light and dark, respectively, and differed significantly from all the factors and in all the periods assessed (table 1).

During the first period of evaluation (4 to 12 days of age), postlarval growth rate in darkness increased as the density of diatoms increased, until reaching a maximum of 28  $\mu\text{m d}^{-1}$  in the 750 cells  $\text{mm}^{-2}$  treatment. Tukey's test showed that organisms exposed to diatom densities of 500 to 1000 cells  $\text{mm}^{-2}$  presented a similar growth, which was higher than in the 0 and 2000 cells  $\text{mm}^{-2}$  treatments (fig. 4). Under light conditions, growth rate in the different diatom densities was almost constant (between 15 and 20  $\mu\text{m d}^{-1}$ ) (fig. 4).

Postlarval growth rate in darkness during the second period of evaluation (12 to 18 days of age) decreased as the density of diatoms increased (fig. 4). Maximum growth rate (28  $\mu\text{m d}^{-1}$ ) occurred in the 1000 cells  $\text{mm}^{-2}$  treatment. Tukey's test showed that postlarvae cultured in the dark and not fed exhibited lower growth than those exposed to diatom densities of 1000 and 2000 cells  $\text{mm}^{-2}$  (fig. 4). Growth rate under light conditions tended to decrease as the diatom density increased, though it showed a slight increase in the highest density treatment. Tukey's test indicated differences between the postlarval growth rates in the 0 and 4000 cells  $\text{mm}^{-2}$  treatments.

Total growth rate of fed postlarvae tended to decrease as the diatom density increased (fig. 4). Maximum growth rate

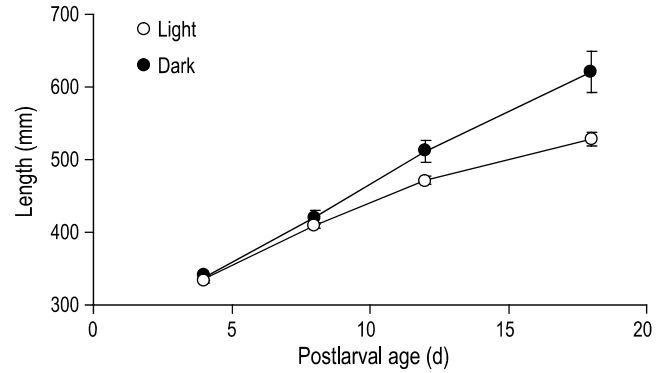


Figure 3. Mean length ( $\pm$  standard error) of *Haliotis corrugata* postlarvae throughout the experimental period under light and dark conditions, averaging the data of the different diatom density treatments ( $n = 15$ ).

Figura 3. Longitud media de las postlarvas ( $\pm$  error estándar) de *Haliotis corrugata* a lo largo del periodo experimental en condiciones de luz y oscuridad, promediando los datos de las distintas densidades de diatomeas ( $n = 15$ ).

significativas al día 12 ( $F = 6.012$ ,  $P = 0.021$ ) y al final del experimento ( $F = 9.143$ ,  $P = 0.006$ ), cuando la longitud en la oscuridad fue 17.6% mayor que bajo luz continua. La tasa media de crecimiento fue de 14 y 20  $\mu\text{m d}^{-1}$  en la luz y en la oscuridad, respectivamente, y difirió significativamente respecto a todos los factores y en todos los periodos evaluados (tabla 1).

Durante el primer periodo de evaluación (edades de 4 a 12 días), las postlarvas en la oscuridad incrementaron su tasa de crecimiento al aumentar la densidad de diatomeas, hasta alcanzar un máximo de 28  $\mu\text{m d}^{-1}$  con la densidad de 750 cél  $\text{mm}^{-2}$ . La prueba de Tukey mostró que los organismos alimentados con 500 y 1000 cél  $\text{mm}^{-2}$  presentaron un crecimiento similar, y éste fue mayor que en los tratamientos con 0 y 2000 cél  $\text{mm}^{-2}$  (fig. 4). En la luz la tasa de crecimiento con las diferentes densidades de diatomeas fue casi constante (entre 15 y 20  $\mu\text{m d}^{-1}$ ) (fig. 4).

La tasa de crecimiento de las postlarvas cultivadas en la oscuridad durante el segundo periodo de evaluación (edades de 12 a 18 días) disminuyó al aumentar la densidad de diatomeas (fig. 4). La tasa de crecimiento máxima (28  $\mu\text{m d}^{-1}$ ) se presentó con 1000 cél  $\text{mm}^{-2}$  de diatomeas. La prueba de Tukey mostró que las postlarvas cultivadas en la oscuridad y que no fueron alimentadas tuvieron un crecimiento menor que las cultivadas con 1000 y 2000 cél  $\text{mm}^{-2}$  (fig. 4). La tasa de crecimiento en la condición de luz tendió a disminuir con el incremento de la densidad de diatomeas; sin embargo, mostró un ligero incremento con la mayor densidad. La prueba de Tukey indicó diferencias entre las tasas de crecimiento de las postlarvas cultivadas con 0 y con 4000 cél  $\text{mm}^{-2}$ .

La tasa de crecimiento total de las postlarvas con alimento tendió a disminuir con el incremento de la densidad de diatomeas (fig. 4). La tasa de crecimiento máxima (27  $\mu\text{m d}^{-1}$ ) se obtuvo en el cultivo con 2000 cél  $\text{mm}^{-2}$  en la oscuridad, y la mínima (9  $\mu\text{m d}^{-1}$ ) en las postlarvas cultivadas sin alimento en

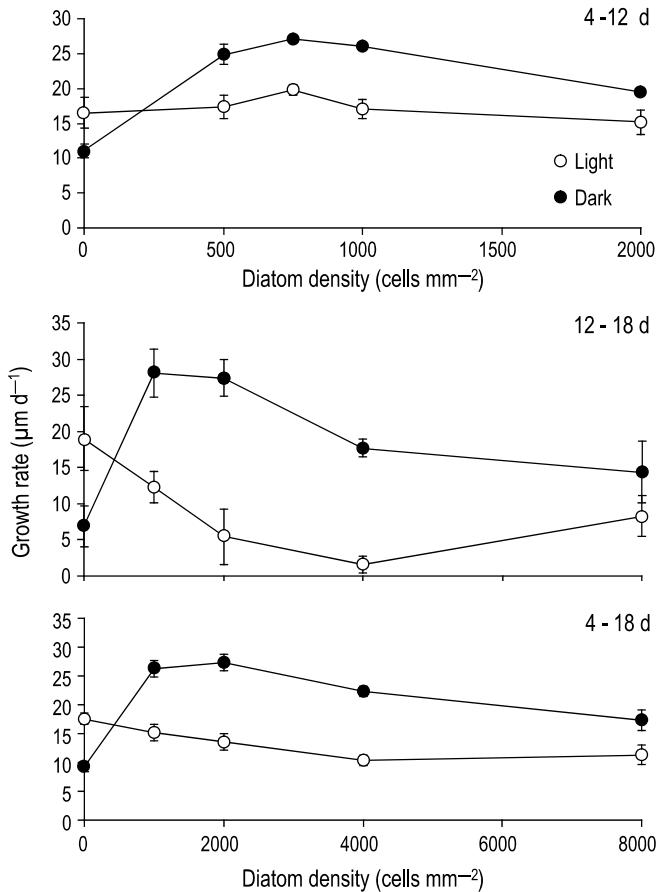


Figure 4. Mean growth rate ( $\pm$  standard error) of *Haliotis corrugata* postlarvae of different ages (days) after settlement ( $n = 3$ ).

Figura 4. Tasa media de crecimiento ( $\pm$  error estándar) en postlarvas de *Haliotis corrugata* de distintas edades (días) después del asentamiento ( $n = 3$ ).

(27  $\mu\text{m d}^{-1}$ ) was observed in the 2000 cells  $\text{mm}^{-2}$  treatment under dark conditions, whereas the minimum (9  $\mu\text{m d}^{-1}$ ) corresponded to postlarvae cultured without food, also in darkness. Tukey's test revealed significant differences between the growth rates of postlarvae cultured in darkness in the 1000 and 2000 cells  $\text{mm}^{-2}$  treatments and those cultured using diatom densities of 0 and 8000 cells  $\text{mm}^{-2}$  (fig. 4). Under light conditions, Tukey's test indicated that growth rates in the 4000 and 8000 cells  $\text{mm}^{-2}$  treatments differed from those found for postlarvae cultured without food.

## Discussion

### Effect of the illumination condition

Studies on different species of abalone have found that postlarval growth is greater in dark or low light intensity environments. For example, *Haliotis rubra* grew 15.65% more in covered than in uncovered tanks (Huchette 2003), *H. fulgens* grew 76.2% more at a light intensity of 6  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  than at 49  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Searcy-Bernal *et al.* 2003), and

condiciones de oscuridad. La prueba de Tukey mostró diferencias significativas en la tasa de crecimiento de las postlarvas cultivadas en la oscuridad y alimentadas con 1000 y 2000  $\text{cél mm}^{-2}$ , con las cultivadas con 0 y 8000  $\text{cél mm}^{-2}$  (fig. 4). En la condición de luz la prueba de Tukey indicó que las tasas de crecimiento en los tratamientos con densidades de 4000 y 8000  $\text{cél mm}^{-2}$  son diferentes de la tasa de crecimiento de las postlarvas que fueron cultivadas sin alimento.

## Discusión

### Efecto de la condición de luz

Estudios con distintas especies de abulón han encontrado que la condición de oscuridad o baja intensidad de luz incrementan el crecimiento postlarval. Por ejemplo, *Haliotis rubra* creció 15.65% más en tanques sombreados que en los no sombreados (Huchette 2003), *H. fulgens* creció 76.2% más a una intensidad de 6  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  comparado con 49  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Searcy-Bernal *et al.* 2003) y *H. rufescens* puede incrementar su crecimiento de 11.8% hasta 300% más en la oscuridad que en la luz (Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal 2004, Searcy-Bernal y Gorrostieta-Hurtado 2007). Los resultados de la tasa de crecimiento en este estudio con postlarvas de *H. corrugata* apuntan en la misma dirección, con un incremento de 42.9% en la oscuridad.

El mayor crecimiento postlarval en la oscuridad o con baja intensidad de luz se puede deber, entre otros factores, a: (1) el incremento de la tasa de alimentación como un indicio que los organismos presentan hábitos nocturnos desde esta etapa; (2) diferencias en el valor nutricional de las diatomeas en distintas condiciones de luz; y (3) el efecto de la supersaturación de oxígeno en la capa límite de la biopelícula en condiciones de luz, que pudiera dificultar un crecimiento óptimo.

Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal (2004) observaron que la producción de heces de postlarvas de *H. rufescens* fue cualitativamente mayor en la oscuridad que en la luz y mencionan que esto se puede deber a un incremento de la alimentación en la oscuridad. En un estudio realizado recientemente con postlarvas de esta especie de seis días de edad se encontró que la tasa de pastoreo fue 37.0% mayor en la oscuridad (Searcy-Bernal y Gorrostieta-Hurtado 2007). De forma muy similar la tasa de pastoreo de *H. corrugata* de cuatro días también se incrementó 39.7% en la oscuridad con respecto a la tasa en presencia luz.

El crecimiento en condiciones de luz-oscuridad puede estar influenciado por el valor nutricional de las diatomeas, que puede ser diferente dependiendo de la intensidad luminosa. Por ejemplo, para *Navicula jeffreyi* se ha reportado que contiene 30% de proteína a intensidades de luz de 4.7  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mientras que disminuye a 22% en intensidades de luz mayores (22  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Watson *et al.* 2005). En este sentido es probable que los organismos mantenidos en la oscuridad hayan ingerido una mayor cantidad de proteína por unidad de peso, que aquellos expuestos a la luz de manera

*H. rufescens* increased growth from 11.8% to 300% more in the dark than in the light (Gorrostieta-Hurtado and Searcy-Bernal 2004, Searcy-Bernal and Gorrostieta-Hurtado 2007). The growth rate results obtained in this study for *H. corrugata* postlarvae follow the same pattern, with an increase of 42.9% under dark conditions.

Greater postlarval growth in darkness or low light intensity can be attributed, among other factors, to: (1) increased feeding rate as an indication that they present nocturnal habits in this stage; (2) differences in the nutritional value of diatoms under different light conditions; and (3) the effect of oxygen supersaturation in the boundary layer of the biofilm under light conditions, which could hinder optimum growth.

Gorrostieta-Hurtado and Searcy-Bernal (2004) observed that faecal production by *H. rufescens* postlarvae was qualitatively higher in the dark than in the light, and they mention that this could be due to an increase in feeding in darkness. In a recent study on 6-day-old postlarvae of this same species, the grazing rate was found to be 37.0% higher in the dark (Searcy-Bernal and Gorrostieta-Hurtado 2007). Similarly, the grazing rate of 4-day-old *H. corrugata* postlarvae also increased 39.7% in darkness relative to constant light exposure.

Growth under light-dark conditions may be influenced by the nutritional value of the diatoms, which can differ depending on the light intensity. For example, a 30% protein content has been reported for *Navicula jeffreyi* at light intensities of  $4.7 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , decreasing to 22% at higher light intensities ( $22 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Watson *et al.* 2005). Thus, organisms maintained in the dark most likely received a higher amount of protein per unit of weight ingested than those exposed to constant light. On the other hand, *N. perminuta* produces more mucus in the dark than in the light (Smith and Underwood 1998, 2000). The mucus secreted by benthic diatoms can represent an important contribution to the initial nutrition of postlarvae (Kawamura *et al.* 1998).

A reason for the difference in postlarval growth under diverse illumination conditions could be that the diatom biofilm in darkness or constant light produces different levels of oxygen in the boundary layer as a result of the respiration and photosynthesis of the microalgae. High light intensities cause oxygen supersaturation in the biofilm that can affect postlarvae (Searcy-Bernal 1996). Though there is evidence that postlarvae can tolerate up to 150% of oxygen saturation (Loipersberger 1996), the potential sublethal effects are not known. Roberts *et al.* (2007) found that oxygen supersaturation levels under light conditions can be more extreme than oxygen subsaturation in darkness. Despite a lack of information on the effect of low oxygen levels, the high survival and growth values of postlarvae fed high diatom densities under dark conditions suggest that there is no significant effect on them (Gorrostieta-Hurtado and Searcy-Bernal 2004).

Under light conditions, the diatom densities greater than 4000 cells  $\text{mm}^{-2}$  provided during the first two weeks of life had a negative effect on the survival of *H. rufescens* (Gorrostieta-Hurtado and Searcy-Bernal 2004) and *H. corrugata* postlarvae

continua. Por otro lado, *N. perminuta* produce más mucus en la oscuridad que en la luz (Smith y Underwood 1998, 2000), y el mucus secretado por diatomeas bentónicas puede representar un aporte muy importante en la nutrición inicial de las postlarvas (Kawamura *et al.* 1998).

La diferencia en el crecimiento postlarval en distintas condiciones de iluminación se puede deber a que la biopelícula de diatomeas en la oscuridad o en la luz propicia diferentes niveles de oxígeno en la capa límite como resultado de la respiración y fotosíntesis de las microalgas. Las intensidades altas de luz en una biopelícula ocasionan una supersaturación de oxígeno que pudiera afectar a las postlarvas (Searcy-Bernal 1996). Aunque hay evidencia de que éstas pueden tolerar hasta un 150% de saturación de oxígeno (Loipersberger 1996), no se conocen los efectos subletales potenciales. Roberts *et al.* (2007) encontraron que los niveles de supersaturación de oxígeno en la luz pueden ser más extremos que la subsaturación de oxígeno en la oscuridad. Aunque no se tiene información sobre el efecto de niveles bajos de oxígeno, los valores altos de supervivencia y crecimiento de las postlarvas en densidades altas de diatomeas en la oscuridad sugieren que no existe un efecto negativo importante sobre éstas (Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal 2004).

En condiciones de luz, densidades de diatomeas mayores a 4000 cél  $\text{mm}^{-2}$  suministradas a los organismos en las dos primeras semanas de vida tienen un efecto negativo en la supervivencia de las postlarvas de *H. rufescens* (Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal 2004) y *H. corrugata* (este trabajo). Bajo estas condiciones la supervivencia es menor a 30%, lo que podría indicar un posible efecto de la supersaturación de oxígeno. En la oscuridad, la supervivencia de *H. rufescens* y *H. corrugata* fue similar con un óptimo entre 70% y 90% con la densidad de 2000 cél  $\text{mm}^{-2}$ , después de la cual la supervivencia de *H. rufescens* se mantiene constante (Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal 2004) y la de *H. corrugata* disminuye, pero siempre con un promedio mayor que en los tratamientos con luz.

#### *Efecto de la densidad de diatomeas*

Para lograr un desarrollo postlarval óptimo es necesario suministrar la cantidad adecuada de diatomeas, la cual depende de la tasa de pastoreo y la edad de las postlarvas. Una presión de pastoreo debajo de la óptima incrementa la densidad de diatomeas en la biopelícula y puede ocasionar tasas de supervivencia bajas debido a la proliferación de bacterias y protozoarios y/o a una sobresaturación de oxígeno en la capa límite (Martínez-Ponce y Searcy-Bernal 1998, Roberts *et al.* 2007). En contraste, si la densidad de diatomeas es baja las postlarvas se alimentan de manera deficiente y su crecimiento es menor que con densidades mayores (Day *et al.* 2004).

La actividad de pastoreo es mínima durante la primera semana de vida de las postlarvas de *H. rufescens* y se incrementa abruptamente en la segunda y tercera semanas (Martínez-Ponce y Searcy-Bernal 1998). Durante la primera

(this study). Under these conditions, survival was less than 30%, indicating a possible effect of oxygen supersaturation. In darkness, the survival of *H. rufescens* and *H. corrugata* was similar, with an optimum between 70% and 90% at a diatom density of 2000 cells mm<sup>-2</sup>, after which survival remained constant for *H. rufescens* (Gorrostieta-Hurtado and Searcy-Bernal 2004) and decreased for *H. corrugata*, but with a higher mean than in constant light.

#### Effect of diatom densities

To achieve optimum postlarval development it is necessary to provide the appropriate amount of diatoms, depending on the grazing rate and age of the organisms. A grazing pressure below the optimum increases the density of diatoms in the biofilm and can cause low survival rates due to the proliferation of bacteria and protozoa, and/or oxygen supersaturation in the boundary layer (Martínez-Ponce and Searcy-Bernal 1998, Roberts *et al.* 2007). In contrast, if the density of diatoms is low, postlarval feed intake will be deficient and growth will be lower than at higher densities (Day *et al.* 2004).

Grazing activity is minimal during the first week of life of *H. rufescens* postlarvae and increases abruptly in the second and third weeks (Martínez-Ponce and Searcy-Bernal 1998). During the first week postlarvae still use their vitelline reserve and dissolved organic matter, but in the second and third weeks they basically depend on bacteria and diatom mucus present in the biofilm, and slowly increase their dependence on the ingestion of diatoms (Kawamura *et al.* 1998, Takami and Kawamura 2003).

Survival of *H. corrugata* postlarvae fed different diatom densities was similar to that observed for *H. rufescens* (Gorrostieta-Hurtado and Searcy-Bernal 2004). During the first week it was high in all the diatom density treatments, but in the second week, both species showed greater survival in most densities under dark conditions (Gorrostieta-Hurtado and Searcy-Bernal 2004). These differences can be partially due to the use of the greater amount of mucus produced by diatoms in the dark, and that its secretion most probably increases at higher diatom densities.

Growth of *H. rufescens* and *H. corrugata* postlarvae during the first week was significantly dependent on diatom density in darkness; however, under constant light, this dependency was not observed, despite the initial grazing rate increasing with diatom density under both illumination conditions (fig. 1). This suggests that postlarvae may be using the diatom mucus (which can be more abundant in the dark and at higher diatom densities) since the first week. On the other hand, it is possible that under constant light conditions problems may exist associated with the boundary layer that do not favor optimum postlarval growth, even at low diatom densities.

It is interesting to note that, under dark conditions, postlarval growth decreased in the highest diatom density treatment (2000 cells mm<sup>-2</sup>) during the first week of the experiment (fig. 4), even though the initial grazing rate was highest at this

semana las postlarvas aún utilizan su reserva vitelina y materia orgánica disuelta, y se ha sugerido que en la segunda y tercera semanas dependen fundamentalmente de las bacterias y el mucus de las diatomeas presentes en la biopelícula, incrementando paulatinamente la dependencia sobre la ingestión de diatomeas (Kawamura *et al.* 1998, Takami y Kawamura 2003).

La supervivencia de *H. corrugata* alimentado con diferentes densidades de diatomeas fue similar a la observada en *H. rufescens* (Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal 2004). En la primera semana fue muy alta con todas las densidades de diatomeas; sin embargo, en la segunda semana, con la mayoría de las densidades de diatomeas se observó una supervivencia mayor en la oscuridad para ambas especies (Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal 2004). Estas diferencias pueden deberse parcialmente a la utilización del mucus producido por las diatomeas en mayor cantidad en la oscuridad, y cuya secreción seguramente aumenta a densidades mayores de diatomeas.

El crecimiento de las postlarvas de *H. rufescens* y *H. corrugata* durante la primera semana muestra una dependencia significativa de la densidad de diatomeas en la oscuridad; sin embargo, en la condición de luz no se observa esa dependencia, a pesar que la tasa de pastoreo inicial aumenta con la densidad de diatomeas en ambas condiciones de iluminación (fig. 1). Esto sugiere que las postlarvas pueden estar utilizando el mucus de las diatomeas desde la primera semana, el cual pudiera ser más abundante en la oscuridad y en densidades altas de diatomeas. Por otro lado, es posible que en condiciones de iluminación constante existan problemas asociados a la capa límite que no favorezcan un crecimiento postlarval óptimo, aun con densidades bajas de diatomeas.

Es interesante observar que, en la oscuridad, el crecimiento postlarval disminuyó con la densidad mayor de diatomeas (2000 cél mm<sup>-2</sup>) durante la primera semana del experimento (fig. 4), a pesar de que el pastoreo inicial fue mayor a esta densidad (fig. 1). Esto se podría deber a la subsaturación de oxígeno en densidades altas de diatomeas por debajo de los niveles óptimos para el crecimiento de las postlarvas en esta etapa.

La dependencia del crecimiento postlarval de la densidad de alimento se incrementa en la segunda semana de edad tanto para *H. rufescens* (Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal 2004) como para *H. corrugata*. En condiciones de oscuridad la tasa de crecimiento se incrementa gradualmente con el aumento de la densidad de diatomeas hasta un máximo de entre 2000 y 3000 cél mm<sup>-2</sup> para las postlarvas de *H. rufescens* (Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal 2004) y de 1000 a 2000 cél mm<sup>-2</sup> para *H. corrugata*. Estudios con diferentes especies de abulón reportan diferentes efectos del aumento de la densidad de diatomeas sobre el crecimiento postlarval en condiciones de iluminación constante: el crecimiento se incrementó en *H. fulgens* (Searcy-Bernal *et al.* 2001), se mantuvo constante en *H. rufescens* (Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal 2004), y disminuyó en *H. corrugata*. Estas diferencias se deben posiblemente a la tolerancia a concentraciones extremas de oxígeno y/o a otras características, propias de cada especie.



density (fig. 1). This can be attributed to the subsaturation of oxygen in high diatom densities, below the optimum levels for postlarval growth in this stage.

The dependency of postlarval growth on diatom density increased in the second week of age for both *H. rufescens* (Gorrostieta-Hurtado and Searcy-Bernal 2004) and *H. corrugata*. In darkness, the growth rate gradually increased with the increase in diatom density until a maximum of 2000–3000 cells mm<sup>-2</sup> for *H. rufescens* (Gorrostieta-Hurtado and Searcy-Bernal 2004) and of 1000–2000 cells mm<sup>-2</sup> for *H. corrugata*. Studies using different species of abalone report different effects of increased diatom density on postlarval growth under constant light conditions: growth increased in *H. fulgens* (Searcy-Bernal *et al.* 2001), remained constant in *H. rufescens* (Gorrostieta-Hurtado and Searcy-Bernal 2004), and decreased in *H. corrugata*. These differences may be due to a tolerance to extreme oxygen concentrations and/or to other particular characteristics of each species.

This study provides evidence that reinforces the hypothesis that abalone postlarvae can exhibit nocturnal habits since the first week of age. The possible implications of these results for the culture of this species depend on the feasibility of providing the appropriate amounts of diatoms in culture systems with low light intensities (Gorrostieta-Hurtado and Searcy-Bernal 2004, Searcy-Bernal and Gorrostieta-Hurtado 2007).

### Acknowledgements

The authors thank the farm B.C. Abalone for donating the abalone larvae and the Microalgal Laboratory at the Institute of Oceanological Research, UABC, for providing the diatom *N. incerta*. This study was partially funded by the UABC (projects No. 4403 and 585) and the Mexican Government (CONACYT: 3746-1B, SNI: 5532). This paper is part of the first author's doctoral dissertation, supported by CONACYT (grants 142912 and 6611).

English translation by Christine Harris.

### References

Day R, Gilmour P, Huchette S. 2004. Effects of density and food supply on postlarval abalone: Behaviour, growth and mortality. *J. Shellfish Res.* 23: 1009–1018.

García-Esquivel Z, Montes-Magallón S, González-Gómez M. 2007. Effect of temperature and photoperiod on the growth, feed consumption, and biochemical content of juvenile green abalone, *Haliotis fulgens*, fed on a balanced diet. *Aquaculture* 262: 129–141.

Gorrostieta-Hurtado E, Searcy-Bernal R. 2004. Combined effects of light condition (constant illumination or darkness) and diatom density on postlarval survival and growth of the abalone *Haliotis rufescens*. *J. Shellfish Res.* 23: 1001–1008.

Huchette S. 2003. Density-dependence in early life stage of abalone. Doctoral dissertation, Department of Zoology, University of Melbourne, Australia, 257 pp.

Este estudio provee evidencias que refuerzan la hipótesis de que las postlarvas de abulón pueden tener hábitos nocturnos desde la primera semana de edad. Las posibles implicaciones de estos resultados en el cultivo de esta especie dependen de la posibilidad de proveer diatomeas suficientes en sistemas de cultivo con bajas intensidades de luz (Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal 2004, Searcy-Bernal y Gorrostieta-Hurtado 2007).

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la granja BC Abalone por la donación de las larvas de abulón y al Laboratorio de Microalgas del IIO por haber proporcionado las diatomeas *N. incerta*. Este estudio fue parcialmente financiado por la UABC (proyectos: 4403 y 585) y el Gobierno Mexicano (CONACYT: 3746-1B y SNI: 5532). Este artículo es parte de la tesis de doctorado del primer autor apoyado por CONACYT (becas 142912 y 6611).

Kawamura T, Roberts R, Takami H. 1998. A review of feeding and growth of postlarval abalone. *J. Shellfish Res.* 17: 615–625.

Kim B, Kim J, Wom S, Wi C, Park H. 1997. Effects of complete dark conditions on the growth of four species of juvenile abalones. *Bull. Natl. Fish. Res. Dev. Inst.* 53: 103–110.

Leighton D. 2000. *The Biology and Culture of the California Abalones*. Dorrance Publishing Co., Pittsburgh, Pennsylvania, 216 pp.

Loipesberger M. 1996. The effect of enhanced oxygen levels on abalone survival and feeding behaviour. Presentation at the Third Annual Abalone Proceedings Aquaculture Workshop. August 1996. Port Lincoln, Australia.

Martínez-Ponce D, Searcy-Bernal R. 1998. Grazing rates of red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae feeding on the benthic diatom *Navicula incerta*. *J. Shellfish Res.* 17: 627–630 pp.

Roberts R, Revsbech P, Damgaard L. 2007. Effect of water velocity and benthic diatom morphology on the water chemistry experienced by postlarval abalone. *J. Shellfish Res.* 26: 745–750.

Searcy-Bernal R. 1996. Boundary layers and abalone postlarval culture: Preliminary studies. *Aquaculture* 140: 129–137.

Searcy-Bernal R, Anguiano-Beltrán C. 1998. Optimizing the concentration of gamma-aminobutyric acid (GABA) for inducing larval metamorphosis in red abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca: Gastropoda). *J. World Aquacult. Soc.* 29: 463–470.

Searcy-Bernal R, Gorrostieta-Hurtado E. 2007. Effect of darkness and water flow rate on survival, grazing and growth rates of abalone *Haliotis rufescens* postlarvae. *J. Shellfish Res.* 26: 789–794.

Searcy-Bernal R, Vélez-Espino A, Anguiano-Beltrán C. 2001. Effect of biofilm density on grazing and growth rates of *Haliotis fulgens* postlarvae. *J. Shellfish Res.* 20: 587–591.

Searcy Bernal R, Anguiano-Beltrán C, Esparza-Hernández A. 2003. The effect of irradiance on the survival and growth of abalone postlarvae *Haliotis fulgens* fed *Navicula incerta*. *Aquaculture* 228: 237–248.

Smith D, Underwood G. 1998. Exopolymer production by intertidal epipellic diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 43: 1578–1591.

Smith D, Underwood G. 2000. The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: The effects of growth phase and light and dark treatment. *J. Phycol.* 36: 321–333.

Steel R, Torrie J, Dickey P. 1997. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. McGraw-Hill, New York, 666 pp.

Takami H, Kawamura T. 2003. Dietary changes in the abalone *Haliotis discus hannai*, and relationship with the development of the digestive organ. *Jarq-Japan Agric. Res. Quart.* 37: 89–98.

Watson D, Daume S, Prince J, Beazley L, Knott B. 2005. The influence of culture conditions on the growth and biochemical composition of an algal feed for juvenile greenlip abalone (*Haliotis laevigata*). *Molluscan Res.* 25: 1–8.

*Recibido en junio de 2008;  
aceptado en febrero de 2009.*