

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE  
EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA

CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE LAS LARVAS DE  
"GRASSOSTREA LIGAS" ALIMENTADAS CON LA  
MICROALGA "PSEUDOSCHRYSS PARADOXA" Y SUPLEMENTOS  
DE ALMILDON DE MAIZ Y MIEL DE ABEJA

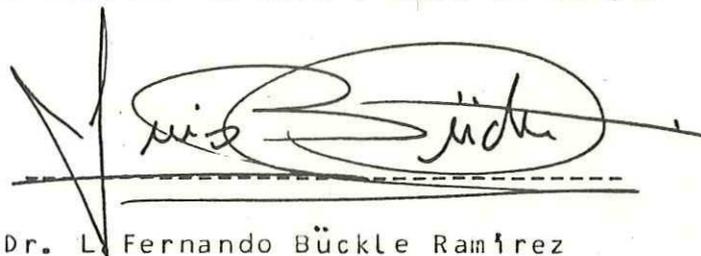
T E S I S  
MAESTRIA EN CIENCIAS

MARTHA PATRICIA FERNANDEZ GARCIA

RESUMEN de la tesis de Martha Patricia Fernández García,  
presentada como requisito parcial para la obtención del grado  
de MAESTRO en CIENCIAS en OCEANOLOGIA con opción en ECOLOGIA  
MARINA. Ensenada, Baja California, México. Octubre de 1984.

Crecimiento y sobrevivencia de las larvas de Crassostrea gigas  
alimentadas con la microalga Pseudoisochrysis paradoxa  
y suplementos de almidón de maíz y miel de abeja.

Resumen aprobado por:



Dr. L. Fernando Bückle Ramírez

Director de tesis

Se llevó a cabo la inducción al desove de progenitores de Crassostrea gigas y la fertilización de sus productos sexuales, siguiendo las técnicas descritas por Breese y Malouf, (1974) para la obtención de larvas en laboratorio.

Con dos experimentos sobre la alimentación de las larvas de C. gigas y una duración de 22 días cada uno, se probaron 10 dietas experimentales. Las dietas consistieron en la microalga Pseudoisochrysis paradoxa sola y en combinación con dos

suplementos alimenticios: almidón de maíz y miel de abeja, los últimos en dos concentraciones diferentes.

Se confirmó que la calidad del agua afecta considerablemente el éxito de los cultivos larvales, observándose que el empleo del cloro favorece indirectamente un mayor crecimiento y sobrevivencia.

La combinación de la microalga P. paradoxa con almidón de maíz en una concentración de 0.9 a 1 ppm resultó en un mayor crecimiento y sobrevivencia de las larvas en las condiciones fisicoquímicas y densidad a los cuales se mantuvieron durante este experimento.

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE  
EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA

DIVISION DE OCEANOLOGIA

CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE LAS LARVAS DE  
Crassostrea gigas ALIMENTADAS CON LA MICROALGA  
Pseudoisochrysis paradoxa Y SUPLEMENTOS DE  
ALMIDON DE MAIZ Y MIEL DE ABEJA.

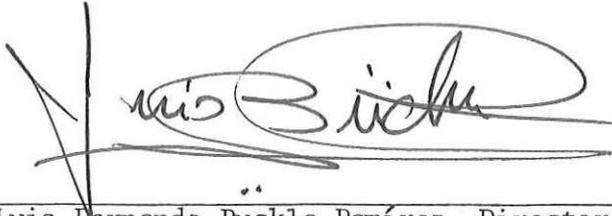
TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios  
para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS presenta

MARTHA PATRICIA FERNANDEZ GARCIA

Ensenada, B. C., Octubre de 1984.

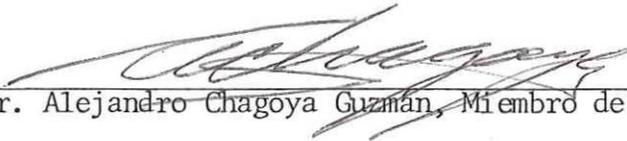
TESIS APROBADA PARA SU DEFENSA POR:



Dr. Luis Fernando Buckle Ramírez, Director del Comité



Dra. Adriana Gorajuria Corbo, Miembro del Comité



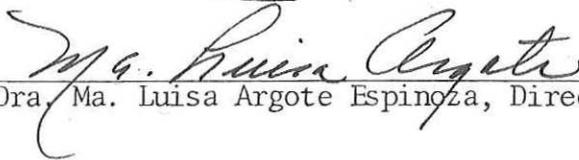
Dr. Alejandro Chagoya Guzmán, Miembro del Comité



M.C. Ana Denise Re Araujo, Miembro del Comité



Dr. José Rubén Lara Lara, Jefe Departamento de Ecología Marina



Dra. Ma. Luisa Argote Espinoza, Directora de la División de Oceanología



M.C. Gilberto Gaxiola Castro, Director Académico Interino

Tesis presentada en Octubre 19 de 1984

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. L. Fernando Buckle R. Te habías encontrado con alguien que te hiciera vacilar tanto como yo? fueron tiempos difíciles pero: ¡lo logramos Fernando!. Gracias por tu paciencia para educarme no solo con tus conocimientos académicos los cuales siempre serán invaluable para mi formación, sino por tu gran calidad humana que hacen de tí más que un maestro, un amigo.

Al Dr. Alejandro Chagoya, a quien tuve el honor de inspirar tantos programas estadísticos que con infinita dedicación e interés realizó para el manejo de mis cuantiosos datos, y sin los cuales su procesamiento hubiera sido imposible. Gracias Alejandro por tu amistad, consejos, apoyo y tu ejemplo de profesionalista realizado.

A la Dra. Adriana Jorajuria y M. en C. Claudia Farfán, por sus atinadas sugerencias en la revisión del escrito y en especial a tí Claudia por tu apoyo y confianza en la culminación de este trabajo.

A la M. en C. Denise Re por haber aceptado ser miembro de mi comité y por esta amistad que despierta en un momento especial en que nuestras almas se encuentran de la mano por el difícil sendero de la vida.

Al M. en C. J. de Jesús Michel Paniagua, por enseñarme la metodología apropiada para el cultivo de las microalgas pero sobre todo, gracias por tu compañía, tus palabras de aliento y ejemplo profesional, sin los cuales éste recorrido hubiera sido realmente difícil.

A Sergio Ramos y José Ma. Domínguez, por la valiosa realización de las figuras y tablas de ésta tesis.

A Manuel Acosta y Teresa Wing, por haberme facilitado los papas de mis larvitas y a tí Tere por tu continuo interés y ayuda a lo largo de éste trabajo.

A Adiel Ruiz Anaya, Carlos Pérez Priego y Lilian Salgado, quienes participaron directamente de una manera tan profesional y entusiasta, que influyeron en mí el ánimo para seguir adelante cuando apenas teníamos tiempo para compartir una torta entre medición y medición.

Al Oc. Victor Gendrop y Oc. René Islas, por compartir conmigo sus amplios conocimientos sobre el cultivo de C. gigas, haciendo posible el lograr la tecnología adecuada para la obtención y cuidado de sus larvas en el laboratorio.

A Francisco Valenzuela, Norberto Flores, Roberto Inclán, L. Manuel Gómez, Gabriel Carrillo, Arturo Siqueiros, Patricio Maya,

Erika del Castillo todos ellos miembros del Laboratorio de Acuicultura del CICESE quienes en todo momento me brindaron su ayuda incondicional.

A todos los miembros del Centro de Calculo del CICESE y en especial a Eloísa Talavera, Ramona Sánchez y Jorge Zúñiga, porque durante el eficiente desarrollo de su trabajo obtuve amabilidad y apoyo constante para resolver los pequeños problemitas que a veces nos dá (ó le damos) a PRIME. Mi reconocimiento a Daniel Loya (Loyasa) por su continua disposición para ofrecer su ayuda justo en el momento en que más se necesita.

A Ma. Elena Corona por todas sus ricas tazas de café y por su interés y apoyo moral compartido en mil maneras.

A mi grillito adorado (Emma García de Fernández) porque aún estando lejos siempre se encuentra junto a mi. A Araceli Fernández y Miguel A. Vargas por haberme ofrecido un lugarcito en su nidito de amor.

Por último pero no por eso menos importante, deseo agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico recibido en la beca otorgada en 1980-1982. y al Centro de Educación Científica y Superior de Ensenada (CICESE) por la beca que me permitió terminar este trabajo.

## C O N T E N I D O

	Página
I. INTRODUCCION	1
I.1 OBJETIVO	6
II. ANTECEDENTES	7
III. METODOS Y MATERIALES	13
III.1 PROGENITORES	13
III.1.1 COLECTA Y TRANSPORTE	13
III.1.2 INDUCCION AL DESOVE	17
III.2 LARVAS	20
III.2.1 FERTILIZACION Y OBTENCION DE LARVAS	20
III.2.2 SISTEMA DE MANTENIMIENTO DE LARVAS	23
III.2.3 DENSIDAD DEL CULTIVO	25
III.2.4 ALIMENTACION	26
III.2.5 CONTROL DE VARIABLES FISICOQUIMICAS	30
III.2.6 REGISTRO DE DENSIDAD LARVAL	31
III.3 TRATAMIENTO ESTADISTICO	34
IV. RESULTADOS	39
IV.1 INTRODUCCION	39
IV.2 EXPERIMENTO I	40
IV.2.1 VARIABLES FISICOQUIMICAS	40
IV.2.2 CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE LAS LARVAS	42
IV.2.3 ANALISIS ESTADISTICO	49
IV.3 EXPERIMENTO II	55
IV.3.1 VARIABLES FISICOQUIMICAS	55
IV.3.2 CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE LAS LARVAS	57
IV.3.3 ANALISIS ESTADISTICO	62
V. DISCUSION	64
VI. CONCLUSIONES	81
VII. RECOMENDACIONES	82
LITERATURA CITADA	83

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Larva_de_Crassostrea_gigas (280 $\mu$ ).	4
2. Localización de la zona de colecta de los Adultos de <u>C. gigas</u> donde: A) Mina Vieja, B) Localización de la balsa.	14
3. <u>Crassostrea gigas</u> talla promedio de los progenitores.	16
4. Módulo para el estímulo al desove de <u>C. gigas</u> .	18
5. Sistema de mantenimiento para las larvas de <u>C. gigas</u> 1)Estanque de fibra de vidrio 2)Salida de agua del estanque 3)Unión universal 4)Filtro de carbón activado 5)calentador 6)Retorno de agua 7)Inyección de aire 8)Sistema de difusión para el baño maría 9)Nivel de agua 10)Sistema de aire 11)Cámara de distribución del aire 12)Mangueras de aire 13)Cubetas de plástico (10 L) 14)Frascos de vidrio (4L).	24
6. Comportamiento del error experimental en función del número de larvas.	35

Lista de Figuras (Cont.)

Figura	Página
7. Relación entre la longitud y el ancho de las larvas de <u>C. gigas</u> . A)Experimento I, B)Experimento II.	36
8. Registro de parámetros fisicoquímicos del Experimento I. A)Concentración de pH B)Concentración de oxígeno disuelto C)Concentración de Amonio. Los números indican cada tratamiento.	41
9. Curva de crecimiento de las larvas del Experimento I. Línea de regresión y cinturón de confianza al 5 %. A)Dieta 1, B)Dieta 2.	45
10. Curva de crecimiento de las larvas del Experimento I. Línea de regresión y cinturón de confianza al 5 %. A)Dieta 5, B)Dieta 6.	46
11. Curvas de sobrevivencia para cada tratamiento. A)Experimento I, B)Experimento II.	48
12. Diagrama de Conectividad entre dietas. Prueba de SNK al 5 %. A)Experimento I, B)Experimento II. Los números indican las dietas. Las líneas indican diferencias no significativas.	54

Lista de Figuras (Cont.)

Figura	Página
13. Registro de parámetros fisicoquímicos del Experimento II. A) Concentración de pH B) Concentración de oxígeno disuelto C) Concentración de amonio. Los números indican cada tratamiento.	56
14. Curva de crecimiento de las larvas del Experimento II. Línea de regresión y cinturón de confianza al 5 %. A) Dieta 1, B) Dieta 2.	59
15. Curva de crecimiento de las larvas del Experimento II. Línea de regresión y cinturón de confianza al 5 %. A) Dieta 5, B) Dieta 6.	60

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Combinación y concentración de los tratamientos durante los dos experimentos.	27
II.	Crecimiento y sobrevivencia de las larvas de <u>C. gigas</u> en cada dieta experimental. (Tamaño inicial de las larvas = 77 $\mu$ ) - =Cero incremento; - =Cero sobrevivencia.	43
III.	Análisis de Covarianza de dos vías.	50
IV.	Análisis de Covarianza. A) Experimento I, B) Experimento II.	51
V.	Prueba de Student-Newman-Keuls al 5 % para el día 22. A) Experimento I, B) Experimento II.	53

CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE LAS LARVAS DE  
Crassostrea gigas ALIMENTADAS CON LA MICROALGA  
Pseudoisochrysis paradoxa Y SUPLEMENTOS DE  
ALMIDON DE MAIZ Y MIEL DE ABEJA.

I. INTRODUCCION.

La industria pesquera, motivada por la creciente demanda alimenticia humana, requiere explotar un mayor número de especies dulceacuícolas y marinas que tengan un alto contenido de proteínas.

Difícilmente, la capacidad de producción natural, logra satisfacer esta demanda y es la razón principal que motiva la utilización de cultivos extensivos en especies locales autóctonas e introducidas, que presenten además de los requisitos necesarios para su cultivo, un crecimiento más rápido. Tal es el caso del ostión japonés Crassostrea gigas (Thunberg), especie altamente comercial en Japón y que a raíz de su introducción en el estado de Washington, E. U. A. en 1902, ha llegado a ser uno de los moluscos bajo cultivo más importantes en el Pacífico Noroccidental (Loosanoff y Davis, 1963).

Considerando los antecedentes que tenían los investigadores japoneses sobre el cultivo de C. gigas y los numerosos estudios realizados en la especie nativa Crassostrea virginica (ostión americano), que tiene el mismo comportamiento de desove, desarrollo de huevos y tipo de larva que C. gigas (Lossanoff y Davis, op.cit.), se pudo avanzar rápidamente en la biotecnología Acuicultural de esta especie, generando centros importantes de producción de semilla.

La introducción de C. gigas en 1973 en la Bahía de San Quintín, B.C., México, requirió de la importación de fijaciones del ostión obtenidas en un laboratorio del estado de Washington, E.U.A. con el fin de adquirir semilla de alta calidad y libre de organismos que pudieran ser nocivos para esta zona (Islas-Olivares, 1975).

En la actualidad aún se depende en gran medida de la importación de semilla de E.U.A., pero se hacen esfuerzos en algunos Estados de México para adaptar la biotecnología. El laboratorio experimental de producción de semilla del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (I.I.O.) de la Universidad Autónoma de Baja California (U.A.B.C.), Ensenada, B.C., fue diseñado para satisfacer los requerimientos de semilla en Bahía San Quintín a un nivel comercial con una capacidad de producción de 15 millones de fijaciones en 6 meses. (Islas-Olivares, op. cit.). Por otra parte en algunas

cooperativas de la región (Erendira y Bahía San Quintín) se realizan intentos para la producción de su propia semilla (Fig.1).

Las técnicas empleadas en estos laboratorios, se controlan ampliamente en Estados Unidos y Japón principalmente, no obstante, en estos países se continúan realizando estudios para mejorar la calidad y sobrevivencia de las larvas obtenidas en laboratorio.

Uno de los puntos que más atraen la atención en estos estudios es el de la alimentación, pues a la fecha y aunque mucho se ha escrito al respecto, no se ha desarrollado ningún alimento en fórmula, que proporcione una dieta balanceada a los ostiones en los primeros estadios de desarrollo, y de hecho no se sabe cuales son los alimentos que pudieran componer una dieta balanceada (Wheaton, 1982).

Producir alimentos a bajo costo es una necesidad en cualquier país en vía de desarrollo. Por esta razón, las investigaciones que se realicen con el objeto de mejorar la producción de un recurso, deben considerar básicamente fuentes naturales de alimentos.

En la investigación realizada por Paniagua-Michel y Granados-Hachuca, (1981), se desarrolló un medio de cultivo para

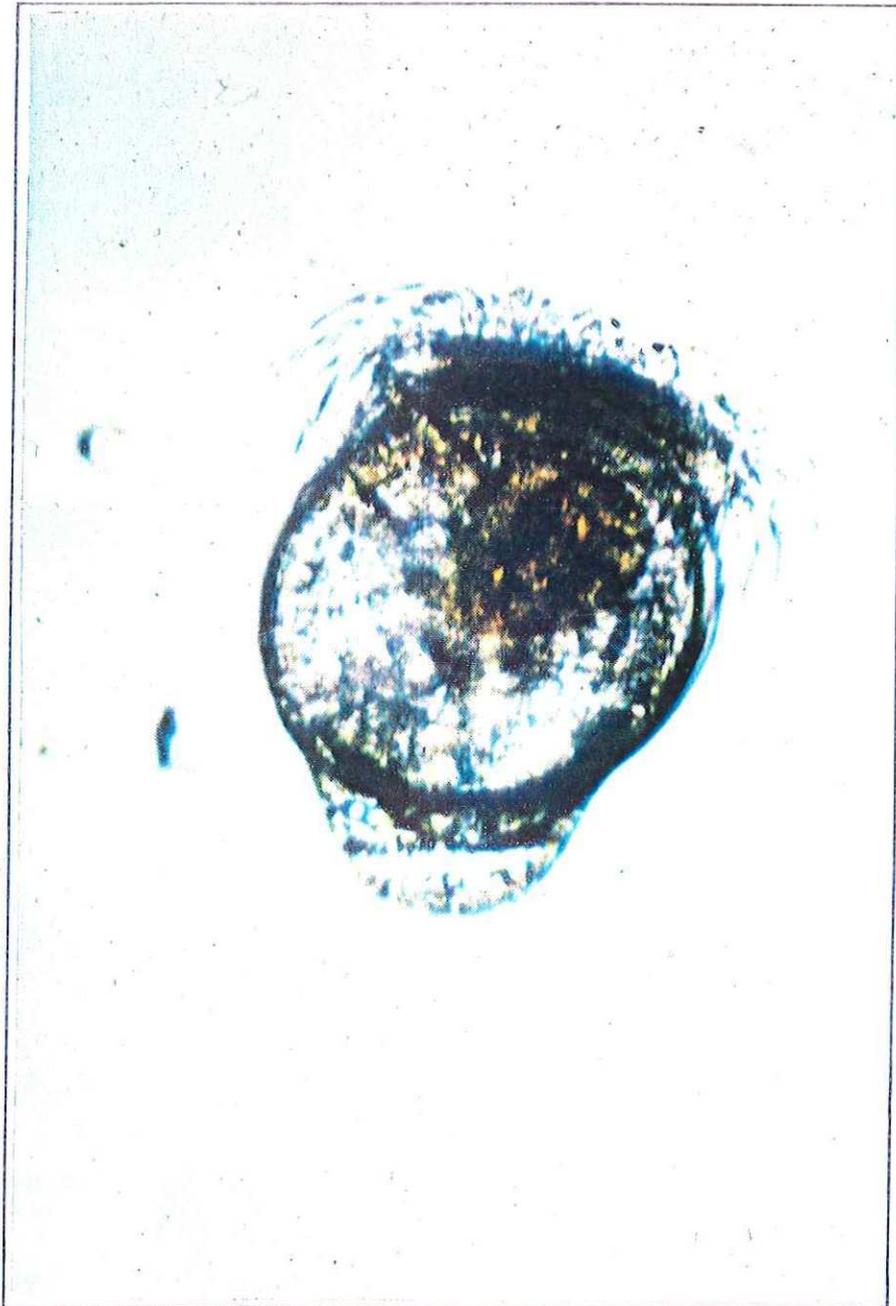


FIG. 1.- Larva de *Crassostrea gigas* ( 280  $\mu$  ).

Las microalgas Skeletonema costatum y Monochrysis lutheri a base de productos biodigeridos (excretas de vaca, de gallina y macroalgas) no encontrando una diferencia significativa en el crecimiento de las microalgas así cultivadas en comparación con las cultivadas en el medio químico de Matthiessen y Toner (1966). Sin embargo, sugieren probar el valor nutritivo de las microalgas cultivadas en el medio orgánico para detectar su efecto en el crecimiento y vigor de las larvas de moluscos. De resultar un alimento satisfactorio, el costo de producción de semilla sería reducido, ya que el medio orgánico es considerablemente menos costoso que el medio químico.

Otra posibilidad la constituyen los suplementos alimenticios agregados al agua del cultivo de las larvas, con el fin de incrementar el valor alimenticio de la dieta. Dentro de la lista de alimentos nutritivos mexicanos se encuentran el almidón de maíz y la miel de abeja, ambos de bajo costo y de un alto contenido en carbohidratos necesarios para la alimentación de las larvas.

El desarrollo de este tipo de investigaciones dentro del campo de la Acuicultura, se estima altamente prioritario, dado que la utilización de alimentos económicos para el cultivo de moluscos ayudarían en la producción de más y mejor alimento.

## I.1 OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo es el de probar la microalga Pseudoisochrysis paradoxa sola o en combinación con suplementos alimenticios constituidos por almidón de maíz y/o miel de abeja, y su efecto sobre el crecimiento y sobrevivencia de las larvas del ostión Crassostrea gigas.

## II. ANTECEDENTES.

El tema de investigación en la alimentación de larvas de moluscos, se remonta desde el empleo de organismos filtrados directamente del mar con el fin de mejorar el cultivo de éstas. (Windsor, 1977).

Posteriormente se investiga la posibilidad de utilizar varias fuentes de detritus y bacterias como alimento para las larvas de ostión (Davis, 1950; 1953), sin encontrar alguna que fuera satisfactoria. A pesar del dudoso valor nutritivo de las bacterias, Hidu y Tubiash (1963) sugieren que ciertas especies pueden servir como alimento.

Davis (1953) observa que las larvas de *C. virginica* se encuentran limitadas al tipo de alimento que pueden utilizar en cuanto al tamaño de la partícula o del microorganismo. Mackie (1969) establece que las larvas de ostión son capaces de seleccionar las microalgas que varían de  $1\mu$  a  $30\mu$ ; aunque el tamaño es importante, los trabajos de Davis y Guillard (1958) demuestran que el grosor de la pared de las microalgas y el grado de toxicidad de sus metabolitos, son factores importantes que determinan su asimilación por las larvas.

La microalga *P. paradoxa* utilizada en esta investigación,

tiene una dimensión promedio de  $6\mu$  con dos flagelos que permiten su movilidad. El tamaño, resistencia y rápido crecimiento en laboratorio, la hacen un alimento muy accesible. Su valor nutritivo es alto cuando se combina con Pyramimonas virginica y Chlorella sp. (Windsor, 1977).

Davis y Guillard, (1958) utilizaron las microalgas Isochrysis galbana y Monochrysis lutheri en combinación con Platymonas sp. y Dunaliella sp. observando un mejor crecimiento en las larvas de ostiones que cuando se administraban en forma individual. Asimismo, mencionan la necesidad de conocer el rango de concentración óptimo del alimento que las larvas pueden tolerar para crecer a una tasa aceptable. Millican y Helm, (1973) citado por Nascimento-Iracema, (1980) prueban el crecimiento de C. gigas con 7 especies diferentes de algas y sus combinaciones. Dupuy, (1975) demuestra que la utilización de Pyramimonas virginica, Pseudoisochrysis paradoxa y Nannochloris oculata combinadas, se traduce en un excelente crecimiento y fijación de las larvas de C. virginica.

A raíz de las investigaciones realizadas para encontrar "el mejor alimento" para las larvas cultivadas, se han desarrollado tantas dietas como autores han trabajado sobre el tema y existe una gran divergencia en cuanto a utilizar determinadas especies de algas ya sea en forma individual o en sus combinaciones. En general, la mayoría de los autores

coinciden en que una dieta consistente en más de una especie de microalgas, promueven un crecimiento más rápido y proporciona más requerimientos nutricionales que las dietas consistentes en una sola especie (Walne, 1979; Windsor, 1977; Gallager y Mann 1981). Además Gerdes (1983) menciona que una alimentación a base de una mezcla de microalgas induce a las larvas a tomar más alimento que en las dietas constituidas por un monocultivo. Sin embargo, en el trabajo de Nascimento-Iracema, op.cit. se indica que al alimentar larvas de C. gigas con Chaetoceros calcitrans, resulta en una tasa de crecimiento más alta que cuando se utiliza una mezcla de C. calcitrans con I. galbana.

El contenido de carbohidratos de las microalgas cultivadas para alimentar a las larvas, puede variar dependiendo de los nutrientes del medio (Parsons et al. 1961). La utilización de suplementos alimenticios del tipo de almidón de maíz y glucosa, ricos en carbohidratos, podrían suplir las posibles deficiencias del alimento natural y aumentar la cantidad de lípidos neutros en las larvas.

Los estudios de Millar y Scott, (1967) y Holland y Spencer (1973) establecen que el crecimiento de la larva de Ostrea edulis, se correlaciona positivamente con la cantidad de lípidos que contiene el animal. Helm, (1973); Holland, (1978) citados por Nascimento-Iracema (op.cit.) y Helm et al., (1973); destacan la importancia de los lípidos como principal

reserva de energía en las larvas de ostión y sugieren que en cualquier intento para asegurar la calidad de las larvas, la presencia de los lípidos es de especial importancia.

Devel (1957) menciona que existen evidencias en los moluscos adultos de la transformación de carbohidratos a grasas, sin embargo, puede suceder un cambio inverso, por lo que ácidos grasos con glicerol pueden producir triacilglicéridos o glicógeno. Los ácidos grasos y glicerol se absorben a través del intestino y de los ductos del diverticulum digestivo y se almacenan en grandes vacuolas del tejido conectivo (George, 1952). Sin embargo, las larvas del ostión son capaces de tomar compuestos orgánicos disueltos en el agua del cultivo (Davis y Chanley, 1956); por lo que se debe considerar con atención la exposición intra y extracelular de las larvas a los nutrientes en que fueron cultivadas las microalgas que reciben como alimento (Windsor, *op.cit.*).

Davis (1950) (citado por Windsor, 1977) menciona que la adición de extracto de glucosa y almidón disuelto a los cultivos larvales no es adecuado en bajas concentraciones y que a mayores concentraciones solo promueve "blooms" densos de bacterias y una alta mortalidad en las larvas. Sin embargo, Haven (1965); Dupuy (1975); Dupuy et al. (1977); Creekman (1977); y Windsor (1977), alimentaron ostiones adultos en el laboratorio con un suplemento de almidón de maíz mejorando

notablemente su condición. El mecanismo principal mediante el cual asimilan el almidón, es por la presencia de la lipasa, enzima secretada por el estilo cristalino y por la secreción de amilasa, enzima capaz de hidrolizar el almidón a carbohidratos (Van Weel, 1961).

La utilización en este trabajo de almidón de maíz y miel de abeja como suplementos alimenticios para la alimentación de las larvas, fue motivada por el conocimiento de la alta concentración de carbohidratos de estos alimentos, con los cuales se consideró repercutir en el aumento del contenido de glicógeno en las larvas.

Entre los componentes del almidón de maíz según la Tabla de Valores Nutritivos de los Alimentos Mexicanos (Hernández et al., 1974), 100 grs de peso neto contienen: calorías: 357; proteínas: 0.6 gr; grasas: 0.2 gr; carbohidratos: 85.6 gr; calcio: 8 mg; hierro: 0.9 mg; riboflavina: 0.02 mg; vitamina A: 1.1 mg.

La miel de abeja que se utilizó fue producida en el Valle de Mexicali, cerca del Río Colorado. Es importante considerar la fuente vegetal de la que proviene, pues de ello depende su composición. Las principales plantas de las que se obtiene la materia prima fueron: Berthelotia sericea ("Cachanilla"); Tamarix aphylla ("Tamarix"); Gossypium sp. ("Algodón") y

Viburnum americanum ("Gobernadora") (Pellet, 1977). Siendo básicamente un carbohidrato, la levulosa y la dextrosa son los azúcares simples que forman la mayor parte de la miel, (95 % de los sólidos), contiene además 18 ácidos orgánicos con grados variables de certidumbre y de 11 a 21 diferentes aminoácidos libres, vitaminas y enzimas.

Se consideró interesante probar varias concentraciones de este suplemento alimenticio por el hecho de que la miel no es un medio conveniente para el desarrollo de las bacterias por dos razones: es bastante ácida y contiene demasiada azúcar, lo cual provoca un efecto osmótico que se refleja en un positivo desecamiento de las bacterias. Otro tipo de propiedad antibacteriana de la miel es causada por la inhibina, sustancia cuyo efecto inhibitor se debe a la acumulación de peróxido de hidrógeno en la miel diluida. (Mc Gregor, 1974). Además de que la utilización de la miel evita el crecimiento de las bacterias de una manera natural en el cultivo, es importante también por su contenido de diastasa (enzima que digiere el almidón) la cual puede contribuir a la reducción del almidón al mezclar los suplementos alimenticios propuestos, de manera tal, que las larvas puedan absorber el alimento fácilmente.

### III. METODOS Y MATERIALES.

#### III.1 PROGENITORES.

##### III.1.1 COLECTA Y TRANSPORTE.

La figura 2 muestra el lugar de ubicación de la balsa de la cual se obtuvieron los progenitores. La zona de Bahía San Quintín, está localizada en la costa Noroccidental de Baja California entre los  $30^{\circ} 24'$  y  $30^{\circ} 30'N$  y entre  $115^{\circ} 57'$  y  $116^{\circ} 01' W$  a 200 km al sur de la Ciudad de Ensenada, B.C.

En este lugar se encuentran ubicadas una serie de estaciones experimentales en las cuales se colocaron balsas de 6x3 metros construidas con tubos plásticos de "ABS" de 4 pulgadas de diámetro que sujetan una red semirígida sumergidas a 1.0 m de la superficie. En estas balsas se colocaron semillas de ostión *C. gigas* (Octubre de 1981), originarias de Peugeon Point Ca. cuyo tamaño inicial era de 3.0-4.0 mm de longitud y que alcanzaron la

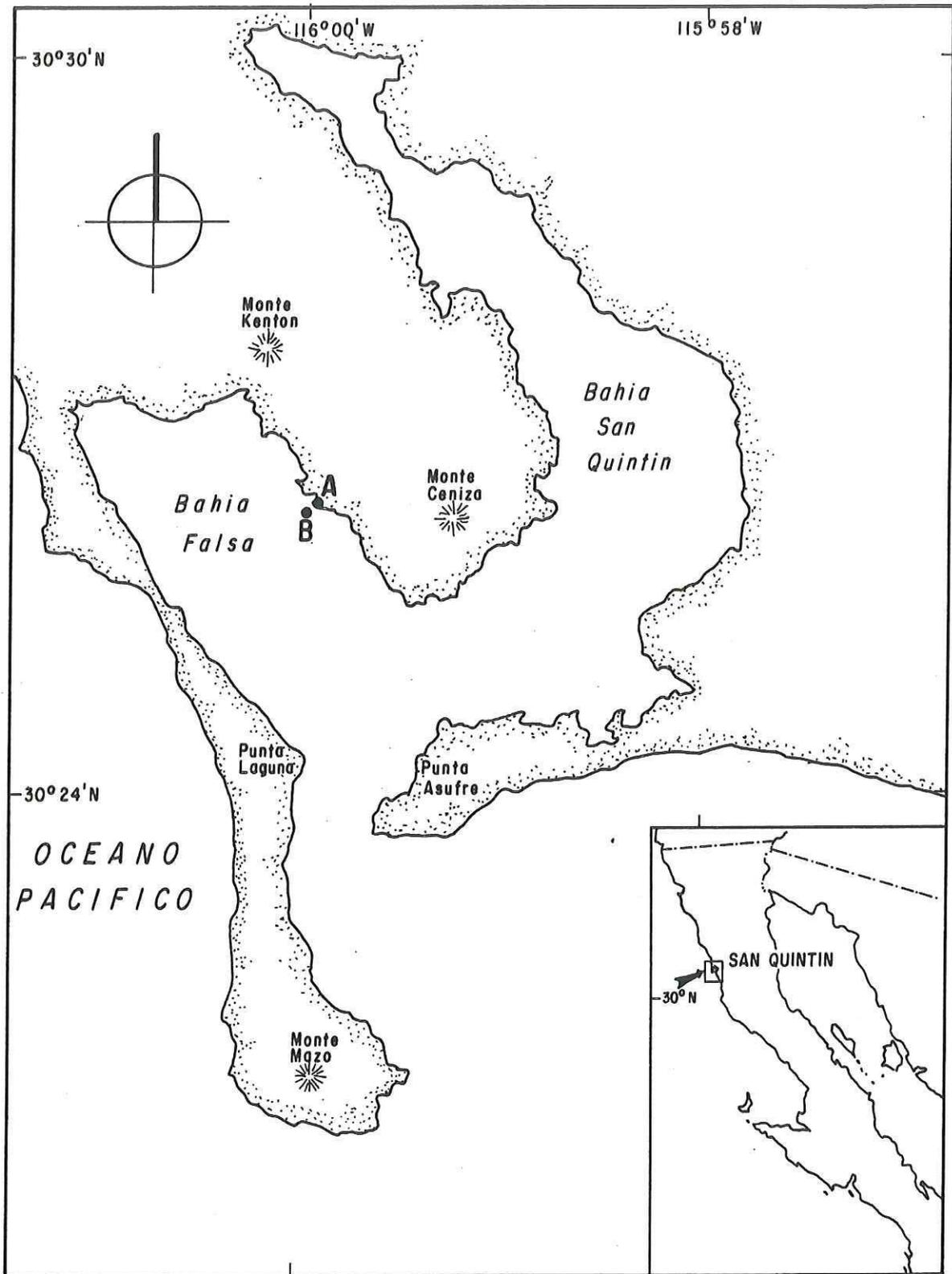


Fig. 2.-Localización de la zona de colecta de los adultos de *C. gigas* donde: A) Mina Vieja, B) Localización de la Balsa.

talla comercial de 8 a 10 cm aproximadamente en 7 meses (Acosta-Ruiz com.pers., C. I. C. E. S. E.).

De aquí se colectaron 50 ostiones cuya talla variaba de 8 a 16 cm en longitud antero-posterior (Fig. 3), que se acomodaron en una hielera poniéndoles una base de pasto marino y macroalgas que se encontraban en la balsa, para evitar "stress" por efecto mecánico y conservarles la humedad durante su transporte al laboratorio de Acuicultura del C. I. C. E. S. E.

Al llegar al laboratorio se lavaron para limpiarlos del todo y de los epibiontes adheridos a sus valvas, compuestos por esponjas, anémonas, poliquetos, huevos de peces, algas y otros para evitar que modifiquen el medio en el cual los progenitores liberan sus productos sexuales.

Antes de inducirlos al desove, los animales se colocaron en acuarios con circulación continua y se mantuvieron sin alimento por un período de 24 horas con el fin de que limpiaran su tracto intestinal (Breese y Malouf, 1974).

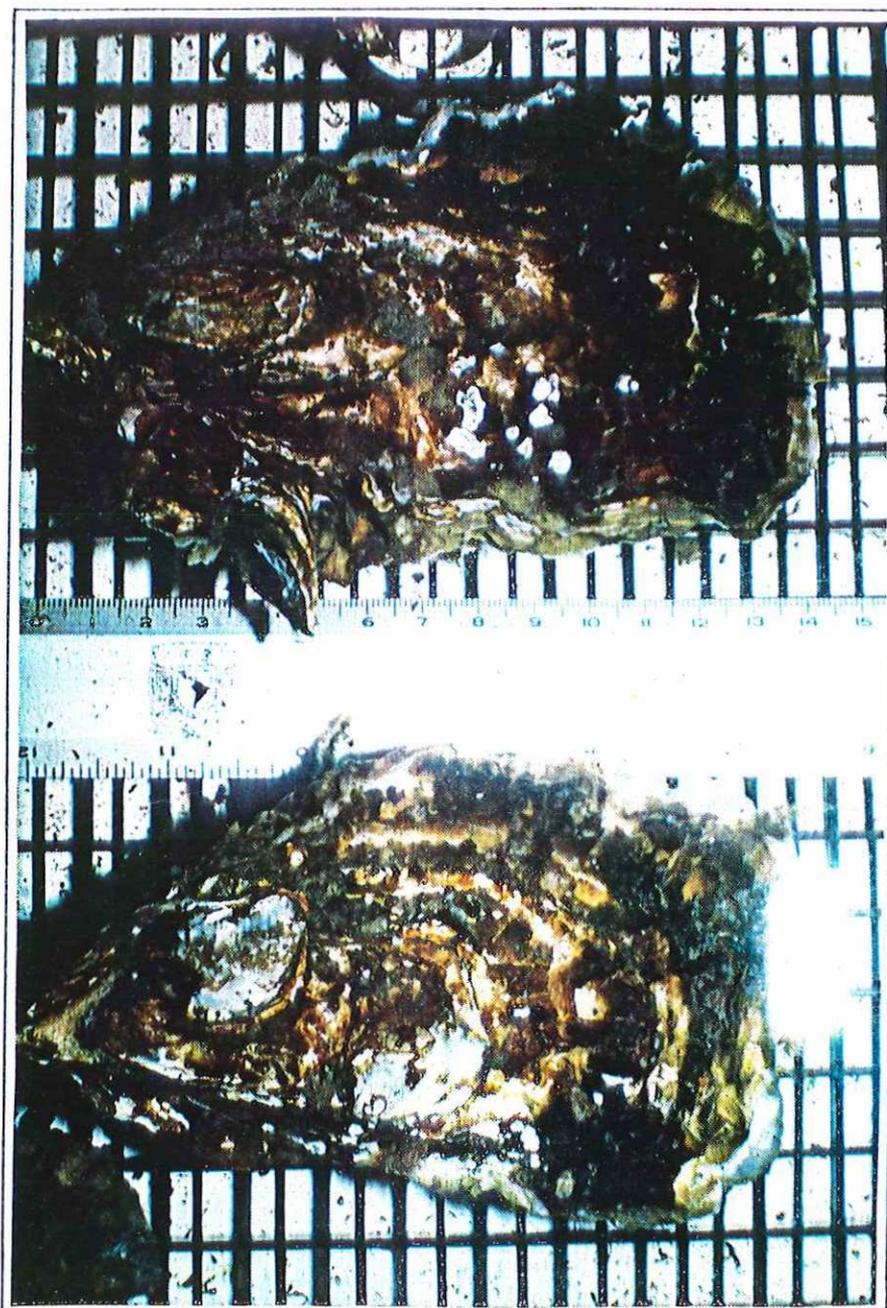


FIG. 3.- *Crassostrea gigas*. Tolla promedio de los progenitores.

### III.1.2 INDUCCION AL DESOVE.

El desove de los progenitores se llevó a cabo utilizando un estanque de fibra de vidrio que posteriormente serviría como base para colocar un baño maría durante el experimento. En él se colocaron los progenitores recirculándoles agua de mar pasada por un sistema Ultravioleta (Fig.4).

Por lo general, un organismo que responde cerrando repentinamente sus valvas al sentirse externamente perturbado, refleja un buen estado de salud. Debido a que en este trabajo no se registraron índices de condición fisiológica, los progenitores se eligieron empíricamente considerando aquellos que respondían más rápidamente a un estímulo externo. Para la inducción al desove, se elevó la temperatura del agua de 25° C a 28° C en un período de 30 minutos con pequeñas fluctuaciones. Esto permitió a los adultos colocados en agua recirculante, bombear y eliminar materia fecal restante antes de iniciar el desove (Breese y Malouf, 1974). Sin embargo, el calentamiento del agua de mar puede provocar una sobresaturación con gases atmosféricos y los ostiones expuestos a estas condiciones llegan a formar burbujas de gas entre los filamentos branquiales y sobre el tejido



FIG. 4.- Módulo para el estímulo al desove de *Crassostrea gigas*.

del manto, pudiendo causar su muerte. Para prevenir la formación de estas burbujas se inyectó aire en el estanque para reducir la concentración de gases atmosféricos disueltos en el agua de mar. (Dupuy y Rivkin, 1972; Malouf et al., 1973).

Cuando los cambios térmicos no fueron suficientes para inducir el desove, se añadió una pequeña cantidad del producto sexual de un progenitor recién sacrificado .

En cuanto se iniciaba el desove los organismos se colocaban individualmente en recipientes refractarios con agua, a la misma temperatura, para que continuaran desovando.

### III.2 LARVAS.

#### III.2.1 FERTILIZACION Y OBTENCION DE LARVAS.

La fertilización de los ovios se llevó a cabo con el producto sexual de tres machos y dos hembras, con el fin de asegurar la variabilidad genética (Loosanoff y Davis, 1963). Los productos sexuales de los desoves se observaron al microscopio para revisar que los huevos estuvieran redondos y con el núcleo difuso y los espermatozoides maduros con un 90 % de movilidad en la muestra.

Los ovios se colocaron en cuatro litros de agua de mar esterilizada en un sistema ultravioleta (U.V.) a una temperatura de 25°C y salinidad de 30 ‰. Breese y Malouf (1974) recomiendan agregar de 2 a 4 ml de suspensión de esperma denso para  $1 \times 10^6$  huevos aproximadamente. Agregado el esperma se tomaba una muestra y se observaba el porcentaje de huevos que presentaban un cuerpo polar, señal de que habían sido fertilizados. El esperma se añadía hasta determinar que un 90 % de los huevos tenían un cuerpo polar.

Comprobado el porcentaje de fertilización, se dejaba de añadir esperma para evitar el problema de la poliesperma, que conduce a un desarrollo embrional anormal (Loosanoff y Davis, op.cit.; Breese y Malouf, op.cit.).

Cada 5 minutos se tomaron muestras para revisar en el microscopio, si en 25 minutos la mayoría de los huevos presentaban de 3 a 4 divisiones, y esto se consideraba una buena fertilización (Gendrop-Funes, V. com.pers., I.I.O.).

Los huevos fertilizados fueron tamizados por una malla de 10 $\mu$  para eliminar el exceso de espermios.

El conteo de los huevos se hizo en un volumen conocido de agua, en este caso de 4 litros. Se uniformizó la muestra con un agitador formado por un mango y un disco de acrílico perforado. Se tomó 1 ml de la muestra y se aforó a 100 ml con agua de mar pasada por U.V. De este volumen se extrajo 1 ml de muestra y se contó al microscopio. Seguidamente los huevos se colocaron en 180 l de agua de mar esterilizada (U.V.) a una temperatura de 25 °C y salinidad de 30 ‰. Se utilizó penicilina como antibiótico para controlar la población bacteriana en una concentración de 0.3 mg/ml (Breerton et

al., 1973; citado por Le Pennec y Prieur, 1977).

A las 24 horas se revisó el cultivo para contar el número de larvas Veliger en el "estadio D" que se habían desarrollado. Si la muestra tenía menos de un 50 % de Veliger, se esperaba doce horas más para que completaran su desarrollo.

Posteriormente las larvas se tamizaron por una malla de  $45\mu$ , para eliminar los huevos que no se hubieran desarrollado. Las larvas se concentraron en 10 l de agua de mar pasada por U.V. La densidad se calculó en la misma forma que con los huevos, solo que se utilizó una cámara de conteo similar a la sedwick-rafter, pegando en los bordes de un portaobjetos, sin subdivisiones en la base, paredes de vidrio de 2 mm de alto aproximadamente, para formar la cámara que contenía la muestra tomada con una pipeta de 1 ml.

Conociendo el número de larvas por mililitro ("Estadio D") se inició el experimento inoculando la densidad adecuada en cada recipiente. Este momento se consideró el día cero del experimento.

### III.2.2 SISTEMA DE MANTENIMIENTO DE LARVAS.

Se realizaron dos experimentos cuyo sistema empleado para ambos, se muestra en la figura 5.

En el experimento I se utilizaron cubetas de plástico de 10 l de capacidad (Fig.5-13) y en el experimento II, frascos de vidrio de 4 l de capacidad (Fig.5-14)

El sistema aplicado durante el cultivo de las larvas fue el mismo para los dos experimentos y estuvo constituido por un estanque de fibra de vidrio (Fig.5-1) que sirvió para mantener un baño maria que controló la temperatura de los recipientes a 25 °C. Esto se logró recirculando agua dulce en el estanque manteniendo el nivel del agua (Fig.5-9). La salida de agua del sistema (Fig.5-2) pasa por un filtro de carbón activado (Fig.5-4) y entra al calentador (Ebo-Jager 100 watts) (Fig.5-5). El retorno del agua (Fig.5-6) se llevó a cabo mediante una inyección de aire (Fig.5-7) la cual desemboca a un tubo de PVC con varias perforaciones que atravieza el estanque transversalmente (Fig.5-8) con el fin de distribuir uniformemente el agua caliente en el sistema.

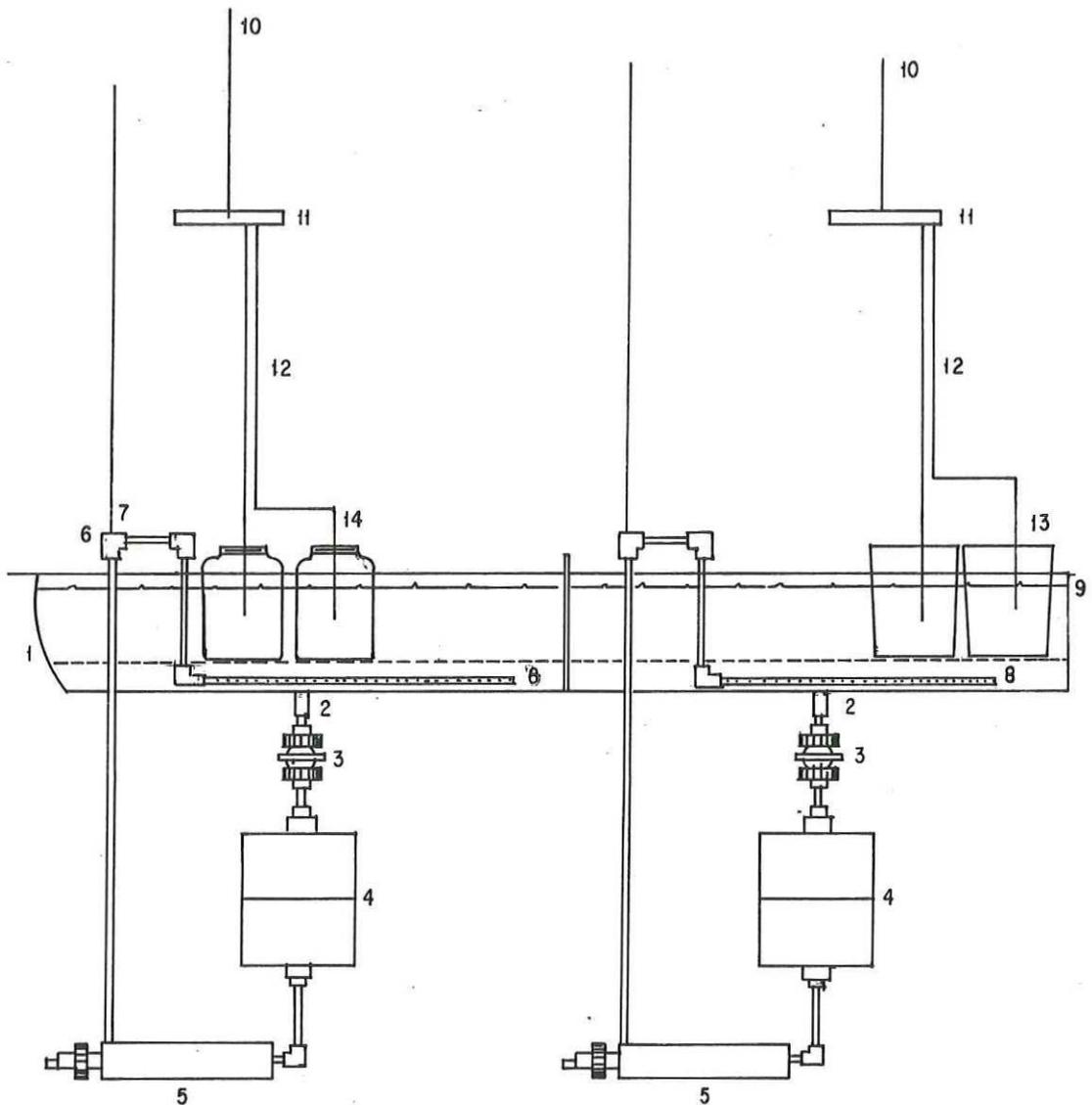


Fig.5 Sistema de mantenimiento para las larvas de *C. gigas*  
 1) Estanque de fibra de vidrio 2) Salida de agua del estanque  
 3) Unión universal 4) Filtro de carbón activado 5) Calentador  
 6) Retorno de agua 7) Inyección de aire 8) Sistema de difusión  
 para el baño maría 9) Nivel del agua 10) Sistema de aire  
 11) Cámara de distribución del aire 12) Mangueras de aire  
 13) Cubetas de plástico (10 Lts) 14) Frascos de vidrio (4 Lts)

Los recipientes donde se mantenían las larvas tenían aireación individual. El sistema de distribución de aire (Fig.5-10) pasaba por dos cámaras intermedias (Fig.5-11) hechas de tubo PVC de 1/2" de diámetro, con 10 perforaciones cada una, para distribuir el aire en cada dieta experimental por medio de mangueras independientes (Fig.5-12). Cada manguera se selló en su parte final por medio de calor y se perforó tres veces con una aguja, con el fin de que salieran hileras finas de burbujas.

### III.2.3 DENSIDAD DEL CULTIVO.

Una vez realizado el conteo de las larvas y conociendo la densidad por mililitro, el contenido se homogenizó perfectamente y se procedió a inocular los recipientes experimentales agregando a cada uno la cantidad de mililitros correspondiente al número de larvas requerido. En ambos experimentos se utilizó la densidad de 10 larvas por ml recomendada por Breese y Malouf (1974).

Las cubetas se marcaron cada litro y el volumen del agua se mantuvo a 5 l; de esta manera la inoculación inicial fue de 50,000 larvas. Los frascos en cambio se

marcaron a un nivel de 3 l por lo que la inoculación inicial fue de 30,000 larvas.

#### III.2.4 ALIMENTACION.

La tabla I muestra el régimen alimenticio llevado a cabo durante los dos experimentos.

Las dietas experimentales tuvieron las mismas combinaciones en ambos experimentos, y están basadas en la mezcla de la microalga Pseudoisochrysis paradoxa con dos suplementos alimenticios. Estos suplementos fueron, almidón de maíz (Maizena) y miel de abeja, en dos concentraciones llamadas "alta" y "baja" y sus combinaciones, dando un total de 8 dietas diferentes más dos grupos control, uno sin alimento y otro alimentado únicamente a base de microalgas. Las concentraciones en las dietas se disminuyeron durante el segundo experimento (Tabla I). Todos los tratamientos tuvieron una réplica.

La concentración de las microalgas para alimentar a las larvas, se basó en las densidades dadas por Breese y Halouf, (1974), como óptimas para el desarrollo de las larvas de C. gigas. En el experimento I se les dio una

TABLA I.- Combinación y concentración de los tratamientos durante los dos experimentos.

DIETAS EXPERIMENTALES

DIETA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ALIMENTO	Ninguno	P	P+A+M	P+σ+m	P+A	P+σ	P+M	P+m	P+A+m	P+M+σ

CONCENTRACION DE LAS DIETAS

EXPERIMENTO	SUPLEMENTOS (peso en gr.)			MICROALGAS (No. células/ml)	VOLUMEN DE AGUA (Lts.)	DENSIDAD LARVAL INICIAL (No. larvas/ml)			
	A	σ	M						
I	0.045	0.0045	0.45	30 x 10 <sup>3</sup> 1ª Semana 50 x 10 <sup>3</sup> 2ª Semana 80 x 10 <sup>3</sup> 3ª Semana	5	10			
							0.045	0.045	0.02
							9	90	6
II	0.0045	0.002	0.045	30 x 10 <sup>3</sup> 1ª Semana 100 x 10 <sup>3</sup> 2ª Semana 160 x 10 <sup>3</sup> 3ª Semana	3	10			
							0.045	0.045	0.02
							1	10	6

P=Microalga *Pseudoisochrysis paradoxa*

A= Almidón de maíz en concentración alta

M= Miel en concentración alta

σ = en concentración baja

m= en concentración baja

concentración de  $30 \times 10^3$  células/ml durante la primera semana,  $50 \times 10^3$  cel./ml en el transcurso de la segunda semana y  $80 \times 10^3$  en la tercer semana. Durante el experimento II, se modificó la concentración en la segunda a  $100 \times 10^3$  cel./ml y  $160 \times 10^3$  cel./ml en la tercer semana.

Al tratar de igualar el contenido de carbohidratos en las dietas experimentales, se comprobó que no se conoce el contenido exacto de este compuesto en las microalgas, y los valores que se encuentran, se refieren al fitoplánton en general. Por otra parte, la cantidad de carbohidratos que existe en los suplementos alimenticios, no es posible compararlos adecuadamente, pues la miel sobrepasa por mucho al almidón de maíz. Viendo estos problemas, se optó por tomar un criterio considerando solo el peso.

El peso de  $1 \times 10^6$  células de Tetraselmis suecica es de 0.2 mg (Helm et al., 1973). En la literatura, no se encuentra el peso para P. paradoxa, pero se obtuvo en el laboratorio, filtrando  $1 \times 10^6$  cel. en filtros de policarbonato (Nucleopore) de 0.4 micras y 47 mm de diámetro, previamente pesados en una balanza Mettler HL52 de capacidad de  $160.1 \text{ gr} \pm 0.1 \text{ mg}$ . Se obtuvo el peso húmedo en 10 réplicas dando un promedio de 0.03 mg.

Considerando este peso, se sacó la relación en cuanto a la cantidad de microalgas que se utilizarían como alimento, obteniendo como resultado un peso total de 0.0045 gr de microalgas. Este peso se eligió para el almidón de maíz como la baja concentración, siendo la alta 10 unidades mayor (0.045 gr) en el experimento I. Las estimaciones de la miel fueron de 0.045 gr la baja y 0.45 gr la alta, por la dificultad que representó el pesar valores mas bajos.

Para el experimento II se redujeron aún más estas cantidades, determinando para el almidón de maíz, 0.002 gr y 0.0045 gr; y en la miel 0.02 gr y 0.045 gr respectivamente (Tabla I). Considerando la disolución que tienen en el volumen de agua (5 litros en el experimento I y 3 litros en el experimento II) al hacer los cálculos en partes por millón, el valor más bajo en el experimento I casi corresponde al del experimento II.

Las concentraciones, fueron para el almidón de maíz, en alta de 9 ppm en el experimento I y 1 ppm en el experimento II y en baja 0.9 ppm para el experimento I y 0.6 ppm para el experimento II. La miel en alta estimación fue de 90 ppm en el experimento I y 10 ppm en el experimento II; y en baja fue de 9 y de 6 ppm para el experimento I y II respectivamente (Tabla I).

## III.2.5 CONTROL DE VARIABLES FISICOQUIMICAS.

En los dos experimentos se cambió el agua cada segundo día, esto dio lugar a una rutina de trabajo en la cual los días sin cambio de agua, se preparaba un reservorio Nalgene de 180 l de capacidad con agua de mar esterilizada por un sistema ultravioleta y filtrada por algodón plástico y una malla de  $10\mu$ . Se introducía en el agua un calentador de inmersión para que la temperatura del agua se estabilizara a  $25^{\circ}\text{C}$ . Se ajustaba la salinidad a 30 ‰ y se le agregaban 1.73 ml de Penprocilina (Lakeside solución inyectable de 400,000 U.I.) para ajustar la cantidad recomendada de 0.3 mg/l para los cultivos de larvas de *C. gigas*. 200,000 U.I. de Penprocilina corresponden a 125 mg de Penicilina (Gendrop-Funés, V. com.pers., I.I.O.) El agua preparada en esta forma, se utilizaba para hacer el cambio de los recipientes al día siguiente.

En los dos días se realizaba el control de la temperatura (con un termómetro Taylor de rango  $-1 + 200^{\circ}\text{C}$  con divisiones de  $1^{\circ}\text{C}$ ); la salinidad con un Refractómetro de gota (Goldberg A0) y el oxígeno disuelto se medía con un oxigenómetro YSI 57 de una precisión  $\pm 0.1\%$ .

Además de lo anterior, cada segundo día se determinaba el pH con un Potenciómetro Digital 1900 de rango pH 0-14 y la concentración de amonio con un microanalizador de iones ORION 901 de rango 0.000 a 999.000 ppm tomando la muestra del agua antes de ser cambiada.

### III.2.6 REGISTRO DE DENSIDAD LARVAL.

Cada segundo día al cambiar el agua, durante el experimento I se colectaban las larvas en un tamiz de abertura de malla de 44  $\mu$  durante la primera semana y 75  $\mu$  en los días siguientes.

En el experimento II al realizar la misma operación se colocaba un tamiz grande (75  $\mu$ ) sobre el tamiz de (44  $\mu$ ) para eliminar los restos orgánicos. El tamiz que retenía las larvas se secaba un poco externamente en su base con papel secante, para que las larvas se cerraran. En seguida se les daba un enjuague con una solución de hipoclorito de Sodio al 5 % diluyendo 0.1 ml en un litro de agua de mar y se volvían a enjuagar con agua esterilizada y mezclada con antibiótico.

Terminado este tratamiento, las larvas, se transvasaban a un vaso de precipitado con 150 ml de agua de mar limpia y se mantenían en baño maría a 25 °C. Después de uniformar el contenido del vaso se tomaba una muestra para realizar el conteo en cada uno de los tratamientos, con el fin de obtener densidad de la muestra de la cual se preservaban por lo menos 50 larvas con un fijador especial preparado de la siguiente manera: 5 ml de formalina a pH 8.0 con glicerofosfato de sodio; 1 ml de propilen phenoxitol; 10 ml de propilen glicol; esta solución se afora a 100 ml con agua destilada (SCOR/UNESCO (Culliney et al., 1975)).

Cada muestra se almacenaba en tubos de vidrio (Monoject de 2.7 ml de capacidad) debidamente etiquetados con la dieta a que pertenecían y la fecha de colecta, para posteriormente medir la longitud y el ancho de las larvas al finalizar el experimento en un microscopio con un ocular micrométrico.

El criterio empleado para dar por terminado cualquier tratamiento de los dos experimentos realizados, se basó en el recuento del número de larvas contenidas en la muestra de 1 ml, tomada para obtener la densidad del cultivo. El determinar 15 larvas o menos implicaba eliminar el tratamiento.

Terminados los conteos en los experimentos y una vez devueltas las larvas a sus recipientes, previamente ajustados a la salinidad de 30 ‰, se les agregaba el alimento respectivo y en las concentraciones correspondientes a cada dieta.

Con las mediciones de densidad se calculó el porcentaje de sobrevivencia en los días 6, 14 y 22 en cada uno de los experimentos considerando los datos de densidad obtenidos como el 100 % de sobrevivencia con respecto a la siguiente densidad, y el porcentaje de sobrevivencia final obtenido del cociente del número inicial entre el número final por 100 .

Con las mediciones de longitud se obtuvo el incremento en el crecimiento a lo largo de los experimentos y el incremento total, al finalizarlo.

### III.3 TRATAMIENTO ESTADISTICO.

Se realizó una prueba estadística con los datos obtenidos de la medición de las larvas del experimento I previo al inicio del experimento II, con el fin de comprobar que el tamaño de muestra de 25 larvas elegido para obtener el registro de crecimiento en cada tratamiento experimental fué el adecuado.

La figura 6 muestra el comportamiento del error experimental en función del número de larvas, obtenida mediante el análisis propuesto por Sokal y Rohlf (1979) para la distribución óptima de recursos. Se observa que existe una gran diferencia en cuanto a la varianza de la muestra si se miden de 1 a 20 larvas; sin embargo esta varianza disminuye muy lentamente a partir de la medición de 20 a 100 larvas.

El número de 25 larvas corresponde a una varianza de 0.0017. El medir un mayor número de larvas implica mayor esfuerzo y una reducción insignificante en la varianza obtenida.

Las larvas se midieron en su longitud y ancho; la figura 7 muestra la correlación entre los dos parámetros.

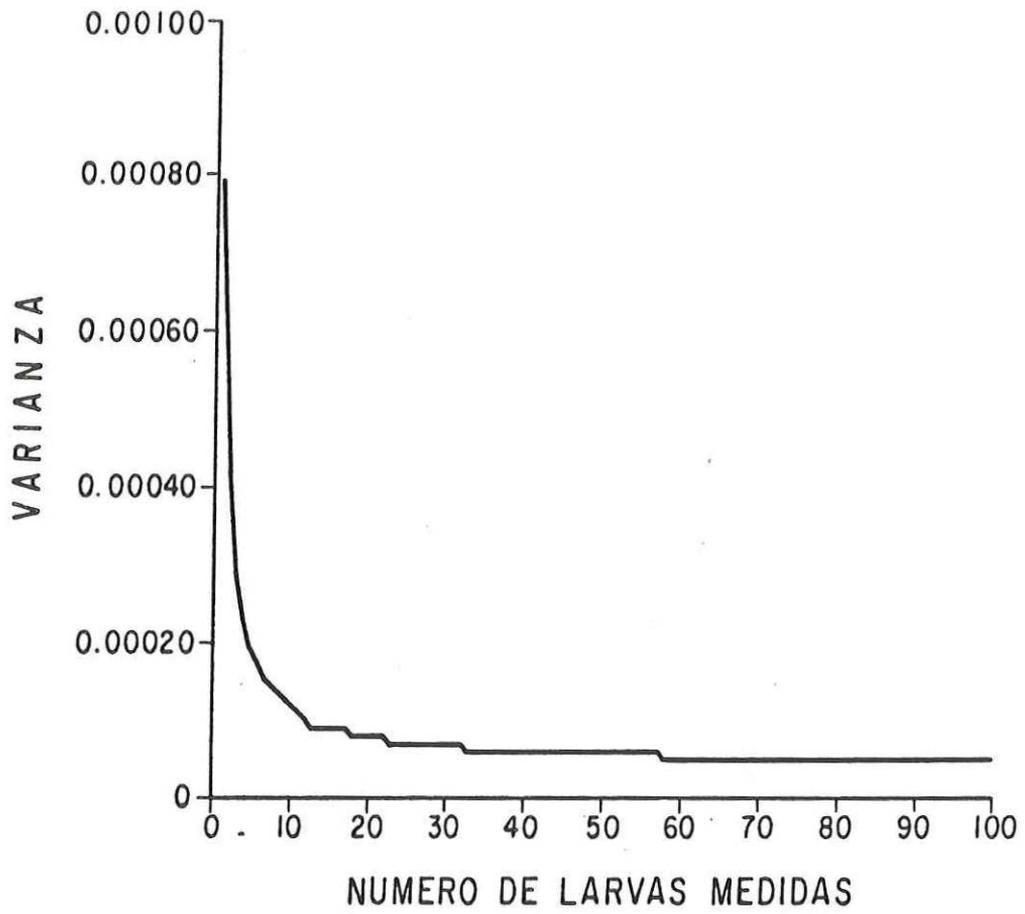


FIG. 6 - Comportamiento del error experimental en función del número de larvas.

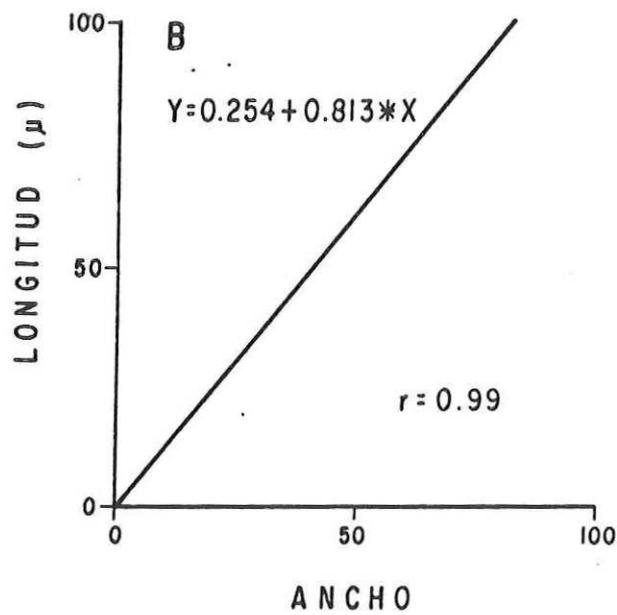
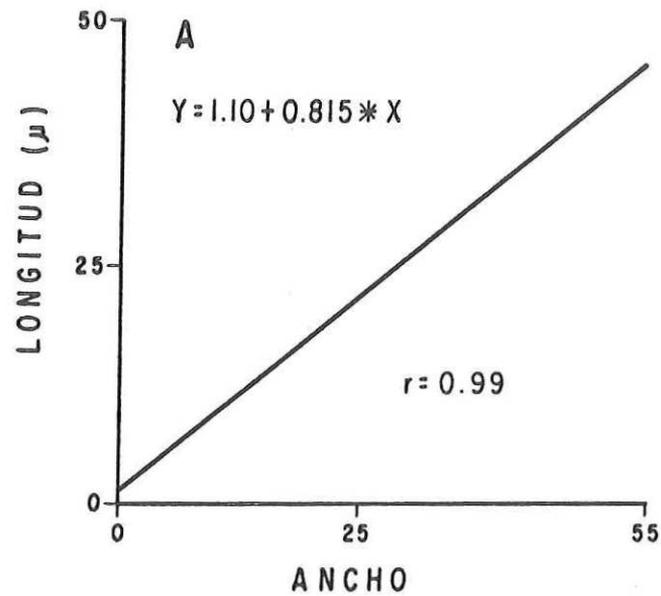


FIG. 7 = Relación entre la longitud y el ancho de las larvas de *C. gigas*.  
A) Experimento I  
B) Experimento II

Todas las pruebas estadísticas realizadas posteriormente, fueron únicamente sobre los datos de la longitud, debido a la alta correlación existente entre ambas mediciones.

En general se pudo observar que cuando las larvas medían de 77 a 80 micras, la longitud excedía de 1 a 5 micras al ancho. Las larvas de 90 a 120 micras, presentaban la longitud y el ancho aproximadamente iguales. Cuando la larva alcanzaba más de 120 micras, el ancho excedía de 1 a 5 micras la longitud, y esta diferencia se observó constante hasta la aparición de la mancha ocular.

Respecto a la longitud de las larvas se empleo un Analisis de Covarianza de dos vías. Con el objeto de determinar diferencias entre experimentos y entre tratamientos. La prueba de comparaciones multiples de Student-Newman-Keuls (SNK) se aplicó a las longitudes medidas el último día de cada tratamiento, con el fin de obtener una jerarquización para las dietas empleadas en cada experimento.

Todas las pruebas estadísticas se llevaron a cabo únicamente sobre las dietas que presentaron mayor sobrevivencia.

Los cálculos se realizaron en la computadora PRIME 400

con la biblioteca de programas ESIMSL (Chagoya  
C. I. C. E. S. E.).

#### IV. RESULTADOS.

##### IV.1 INTRODUCCION.

Las diferencias básicas que existieron entre el experimento I y el experimento II fueron, el tipo de recipientes, el volumen utilizado, el tamizado de las larvas, la utilización de cloro y el aumento en la concentración de microalgas durante el experimento II.

En ambos experimentos la mancha ocular apareció en algunas de las larvas el día 20 de su desarrollo. El experimento contempló la alimentación de las larvas solo en el período previo a la metamorfosis; en este lapso (22 días), se pudo observar hasta el 50 % de las larvas con mancha ocular en algunos de los tratamientos. En este momento el experimento se dio por terminado, pero se agregaron fragmentos de concha de ostión de 2 a 5 mm aproximadamente con el fin de observar la fijación de las larvas en este sustrato.

## IV.2 EXPERIMENTO I.

### IV.2.1 VARIABLES FISICOQUIMICAS.

La figura 8 muestra el registro de los parámetros fisicoquímicos para cada dieta a lo largo del experimento I. Las líneas se encuentran cortadas hasta el momento en que se descartó el experimento debido a una alta mortalidad.

El pH varió de 7.3 a 8.0 unidades excepto por una medición en la dieta 1 con un valor de 6.7 (Fig.8-A).

La concentración de oxígeno (mg/l) muestra una separación en las dietas en cuanto a la concentración de alimento y la presencia de miel (Tabla I). Así las dietas 3, 7 y 10, variaron de 7.36 a 5.20 mg/l y las dietas restantes se mantuvieron en un rango de 7.9 a 6.2 mg/l (Fig.8-B).

Las concentraciones más altas de amonio, se detectaron en las dietas 3, 7 y 10 que tuvieron valores de 0.2 a 0.7 mg/l. Las dietas 4, 8 y 9 variaron de 0.05

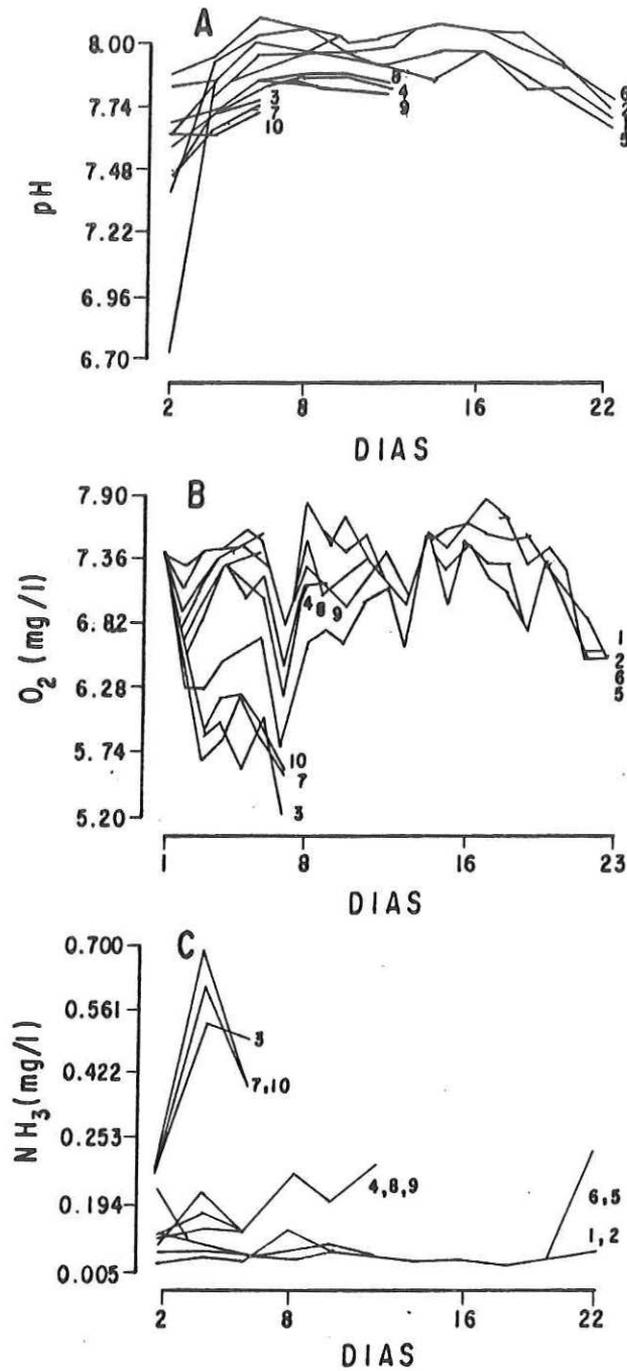


FIG. 8.- Registro de parametros Fisicoquímicos del Experimento I  
 A).- Concentración de pH.; B).- Concentración de oxígeno disuelto, C).- Concentración de Amonio.  
 Los números indican cada tratamiento

a 0.19 mg/l y las dietas 1,2,5 y 6 las concentraciones más bajas observadas, entre 0.001 y 0.03 mg/l (Fig.8-C).

#### IV.2.2 CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE LAS LARVAS.

La tabla II-A, muestra los valores para el incremento promedio en el crecimiento al día 6,14 y 22 para cada una de las dietas experimentales, sobre el tamaño inicial de las larvas con un promedio de 77 micras.

Las larvas dentro de los tratamientos 3,7 y 10 con una concentración de miel de abeja de 90 ppm en diferentes combinaciones, no crecieron durante el tiempo de duración del experimento. Las larvas en las dietas 4,8 y 9 las cuales en diferentes combinaciones contenían miel de abeja en 9 ppm, presentaron al día 6 un incremento promedio de 3,10 y 3 micras respectivamente. Las larvas de las dietas control 1 y 2 tuvieron el mismo incremento promedio final de 33 micras al día 22. Las larvas en los tratamientos 5 y 6 sin miel y con diferentes concentraciones de almidón de maíz con microalgas marcaron el crecimiento más alto al día 6,14 y 22 con 43 y 53 micras respectivamente.

TABLA II.- Crecimiento y sobrevivencia de las larvas de *C. gigas* en cada dieta experimental. (tamaño inicial de las larvas = 77  $\mu$ )  
 — = cero incremento; — = cero sobrevivencia

DIETAS	EXPERIMENTO I									
	INCREMENTO PROMEDIO EN EL CRECIMIENTO ( $\mu$ )					PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA				
	Al día 6	Al día 14	Al día 22	Al día 2	Al día 6	Al día 14	Al día 22	Al día 2	Al día 6	Al día 14
1	3	23	33	80	90	50	30	80	90	50
2	13	33	43	90	50	90	30	90	50	90
3	—	—	—	10	4	—	—	10	4	—
4	3	—	—	80	20	4	—	80	20	4
5	3	23	33	60	75	50	30	60	75	50
6	23	30	53	60	80	95	40	60	80	95
7	—	—	—	10	4	—	—	10	4	—
8	10	—	—	60	10	30	—	60	10	30
9	3	—	—	50	40	10	—	50	40	10
10	—	—	—	10	4	—	—	10	4	—
EXPERIMENTO II										
1	2	13	38	50	80	60	40	50	80	60
2	3	33	73	50	80	80	50	50	80	80
3	—	—	—	5	5	—	—	5	5	—
4	2	—	—	50	30	—	—	50	30	—
5	3	43	93	50	80	90	70	50	80	90
6	13	33	83	40	65	45	50	40	65	45
7	—	—	—	10	10	—	—	10	10	—
8	—	—	—	35	15	15	—	35	15	15
9	2	—	—	20	15	—	—	20	15	—
10	—	—	—	10	20	—	—	10	20	—

### Curvas de crecimiento.

Se graficaron únicamente las dietas control y las dos dietas que presentaron mayor crecimiento y sobrevivencia.

La figura 9 muestra las líneas de regresión y el cinturón de confianza al 5 % para las mediciones de longitud en las larvas de las dietas 1 (Fig.9-A) y 2 (Fig.9-B); y la figura 10 para las dietas 5 (Fig.10-A) y 6 (Fig.10-B). Cada punto representa la longitud promedio sobre 25 larvas. La linealidad del modelo de regresión fue rechazado en todas las dietas excepto en la dieta control 1.

El valor de la pendiente marca una tasa de crecimiento más alta para las dietas 5 y 6 que para las dietas control 1 y 2, aunque tal diferencia no resulta ser significativa.

Los datos se encuentran dispersos a lo largo del cinturón de confianza de manera que en todas las gráficas se observan fluctuaciones ascendentes y descendentes, aunque las líneas de regresión marcan una tendencia de incremento en el crecimiento. El rango de valores para el crecimiento de las larvas en las dietas control fueron

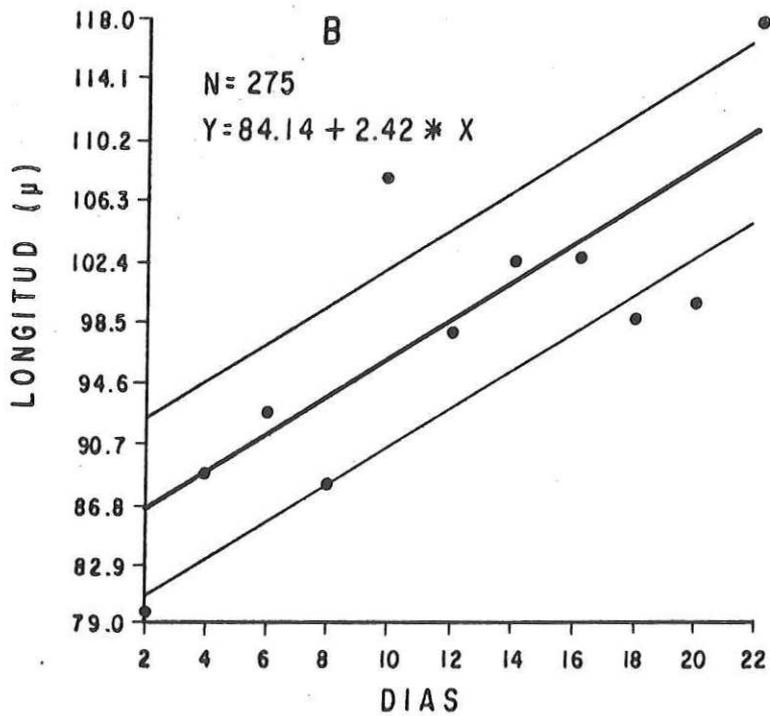
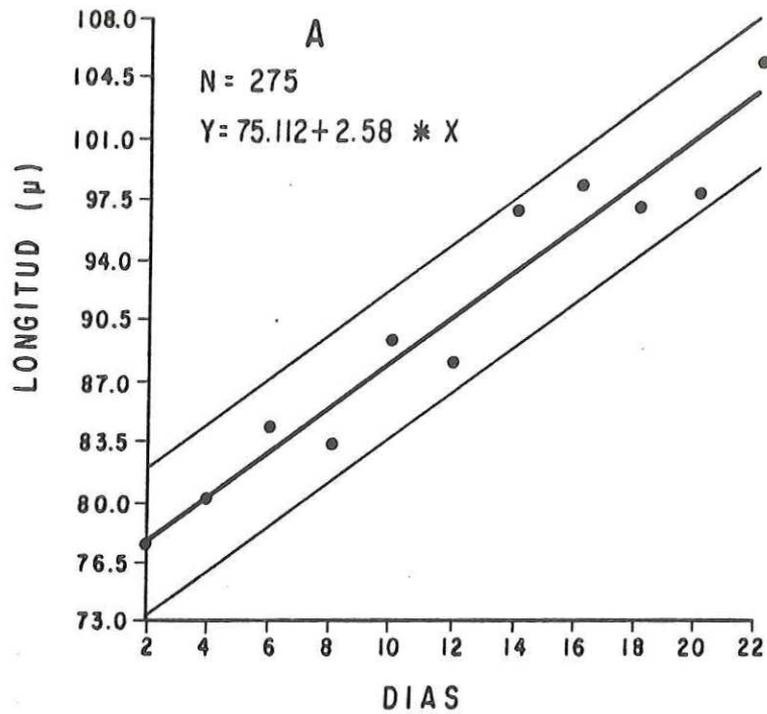


FIG. 9.- Curva de crecimiento de las larvas del Experimento I  
 Línea de regresión y cinturón de confianza al 5%  
 A).- Dieta 1 , B).- Dieta 2.

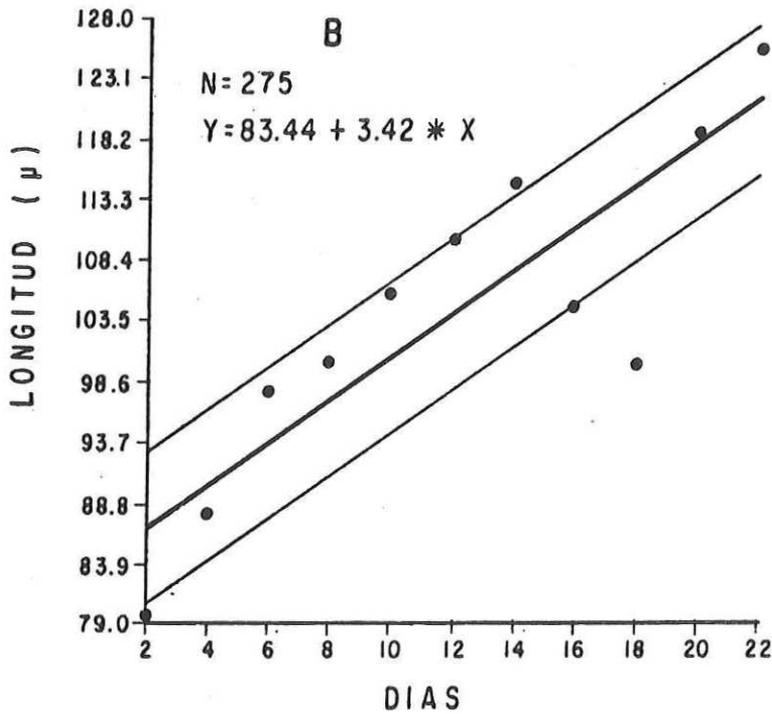
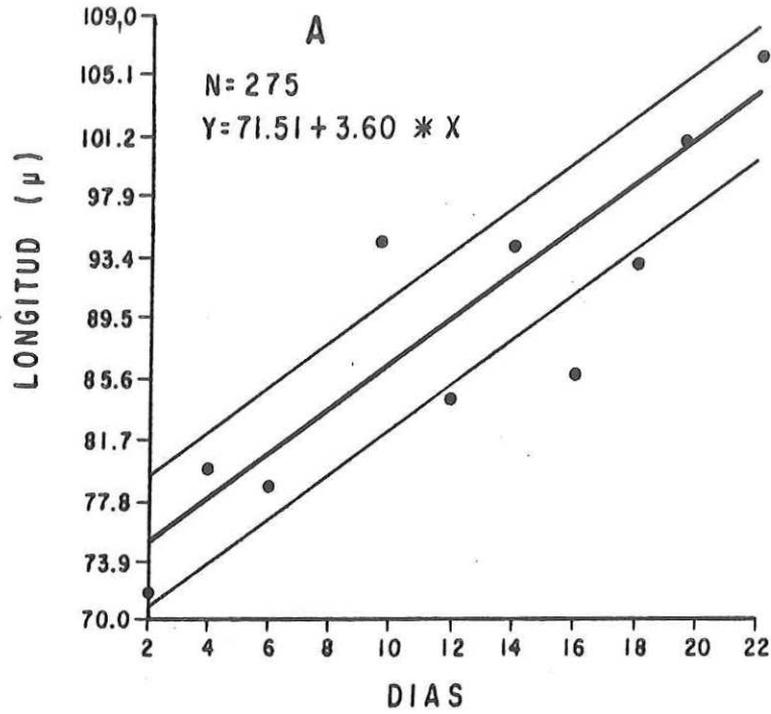


FIG.10.- Curva de crecimiento de las larvas del Experimento I.  
 Línea de regresión y cinturón de confianza al 5%  
 A).- Dieta 5, B).- Dieta 6.

entre 75 y 110 micras para la dieta 1, de 80 a 115 micras para la dieta 2, entre 70 y 110 micras para la dieta 5 y de 80 a 120 micras en la dieta 6.

#### Curvas de sobrevivencia.

La figura 11-A, muestra las curvas de sobrevivencia para cada tratamiento. El porcentaje de sobrevivencia final fué de 1 % considerando como el 100 % el valor inicial del inóculo para el experimento.

Se observa una clara división entre la sobrevivencia presentada por las dietas que contenían miel en diferentes combinaciones y concentraciones (dietas 3,7,10, 4,8 y 9) de los tratamientos que no la contuvieron (dietas 1,2,5 y 6) presentando éstas últimas una pendiente menor.

El porcentaje de sobrevivencia en los días 2,6,14 y 22 se reportan en la tabla II-A (pag.43). Al día 6 la dieta 3,7 y 10 presentan solo el 4 % de sobrevivencia mientras que la dieta control 1 presenta el valor más alto de 90 %. Al día 14 disminuye la sobrevivencia en las dietas 4,8 y 9 y las dietas 2 y 6 presentan los porcentajes más altos. Al día 22 sobrevive un 30 % de las larvas en las dietas 1,2 y 5 y un 40 % en la dieta 6.

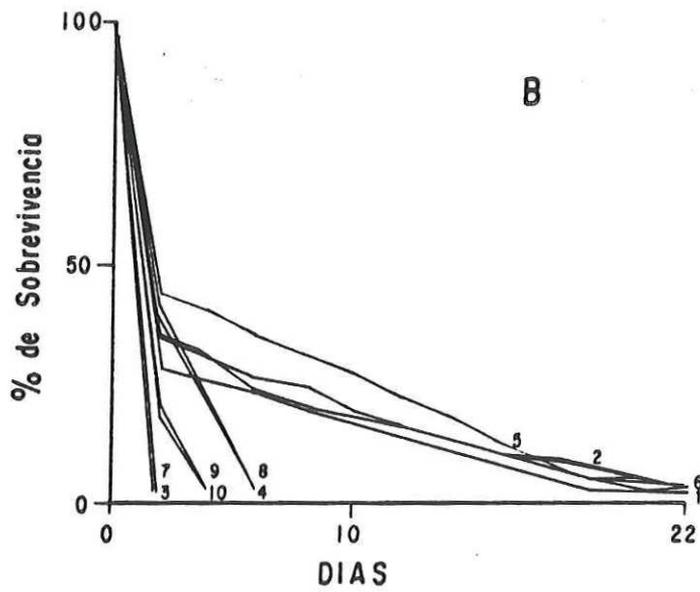
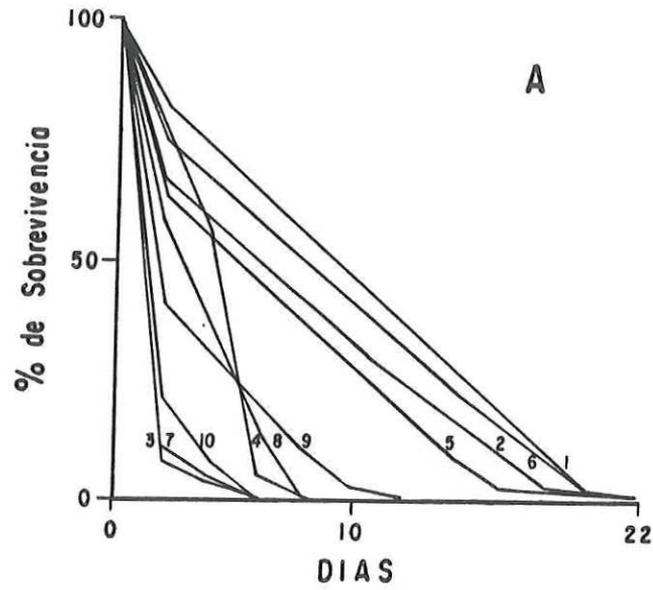


FIG. II.- Curvas de sobrevivencia para cada tratamiento  
A. Experimento I , B. Experimento II

#### IV.2.3 ANALISIS ESTADISTICO.

La prueba de análisis de covarianza de 2 vías (Tabla III) revela que existe una diferencia significativa entre los tratamientos que presentaron mayor sobrevivencia (1,2,5 y 6) así como entre los dos experimentos realizados. Más aún, el valor de F es altamente significativo para marcar las diferencias entre experimentos y es significativo para las diferencias entre tratamientos. La interacción experimento-tratamiento resultó muy significativa, indicando que las diferencias entre la utilización de las dietas depende de las características del experimento que se realice. En la tabla IV-A se presenta el análisis de covarianza para los tratamientos 1,2,5 y 6; en esta prueba, la homogeneidad en la varianza de los datos fue rechazada. Sin embargo, la homogeneidad de pendientes no es rechazada y la relación F para los tratamientos es altamente significativa, lo que indica que a pesar de que las tasas de crecimiento fueron similares, existe una diferencia significativa entre las dietas empleadas.

Antes de aplicar la prueba Student-Newman-Keuls (SNK) para el día 22 del experimento, la normalidad de los residuos respecto al modelo de análisis de varianza

TABLA III.- Analisis de covarianza de dos vias

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F	SIGNIFICANCIA DE F
Covariable DIA	1	40369.586	40369.214	231.480	0.000 ***
Experimentos	1	5240.214	5240.214	30.017	0.000 ***
Tratamientos	7	2589.737	369.962	2.119	0.044 *
Interacción Experimento- Tratamiento	7	3590.563	512.938	2.938	0.006 **
Residual	159	27757.008	512.938		
Total	175	79547.109			

TABLA IV.- Analisis de covarianza  
A) Experimento I B) Experimento II

	FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	RELACION DE F
<b>A</b>	Tratamientos ajustados	7	2454.41	350.630	7.0709 ***
	Regresión	1	5296.22	5296.223	
	Error	79	3917.41	49.587	
	Homogeneidad	7	337.58	48.226	0.9699 N.S.
	Error Homogeneidad	72	3579.82	49.719	
	Total	87	11668.04		
<b>B</b>	Tratamientos ajustados	7	3726.10	532.301	2.9542 **
	Regresión	1	44678.02	44678.025	
	Error	79	14234.57	180.184	
	Homogeneidad	7	3237.39	462.485	3.0279 **
	Error Homogeneidad	72	10997.18	152.738	
	Total	87	62638.71		

de una vía fue satisfactoriamente verificada por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov al 5 % de significancia.

De la jerarquización de las medias dada por SNK se puede concluir cuales fueron las "mejores dietas".

En la tabla V-A se observa que el valor más alto corresponde a la dieta 6 (con una combinación de microalgas y harina de maíz en 0.9 ppm), y el valor más bajo para la dieta control 1 (sin alimento).

La separación de las dietas en 2 grupos se formó con base en las diferencias significativas encontradas entre tratamientos y se representa graficamente en la figura 12-A. La conectividad entre las dietas forma el grupo uno incluyendo las dietas 1, 2 y 5, las cuales aunque en la tabla V-A difieren en el valor de las medias, estas diferencias no son significativas. Se observa en el diagrama de conectividad que la prueba SNK clasifica ambiguamente la dieta 2.

TABLA V .- Prueba de Student-Newman-Keuls al 5% para el día 22  
 A).- Experimento I , B).- Experimento II

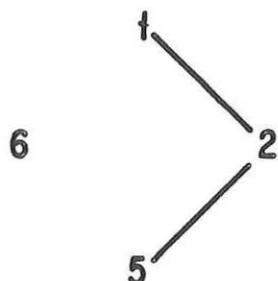
A.

GRUPO	DIETA	NUMERO TOTAL	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR
1	1	25	96.36	12.51	2.50
	2	25	102.08	19.45	3.89
	5	25	106.26	17.00	3.40
2	6	25	125.18	29.41	5.88

B.

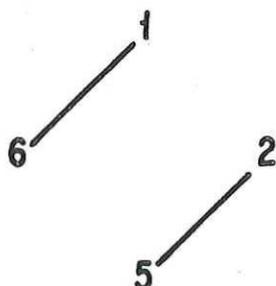
GRUPO	DIETA	NUMERO TOTAL	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR
1	1	25	127.82	13.49	2.69
	6	25	147.62	28.52	5.70
2	5	25	163.68	29.45	5.89
	2	25	162.58	32.88	6.57

A).-



Grupo	Dieta
1	1, 2, 5
2	6

B).-



Grupo	Dieta
1	1, 6
2	2, 5

FIG.12.- Diagrama de conectividad entre dietas  
 Prueba de SNK al 5%.  
 A) Experimento I , B) Experimento II  
 Los números indican las dietas  
 Las líneas indican diferencias no significativas.

### IV.3 EXPERIMENTO II.

#### IV.3.1 VARIABLES FISICOQUIMICAS.

Al igual que en el experimento I las líneas para cada tratamiento mostradas en la figura 13 para las variables fisicoquímicas se encuentran cortadas hasta el momento de su duración en el experimento.

Se presentan valores relativamente más altos para las concentraciones de amonio y bajos en pH y oxígeno para las dietas que contenían miel en alguna combinación (dietas 3,7,10,4,8,9).

El pH (Fig.13-A) estuvo en un rango básico de 7.4 a 8.1. La concentración de oxígeno (mg/l) (Fig.13-B) se presentó entre 4.8 y 6.0 para las dietas 3,7 y 10; entre 6.2 y 7.0 mg/l para las dietas 4,8 y 9 y de 6.5 a 7.9 en las dietas que no contenían miel (1,2,5 y 6).

Las concentraciones de amonio (Fig.13-C) fueron más altas para las dietas 3,7 y 10 de 0.17 a 0.09 mg/l; las dietas 4,9 y 8 tuvieron valores hasta de 0.12, mientras

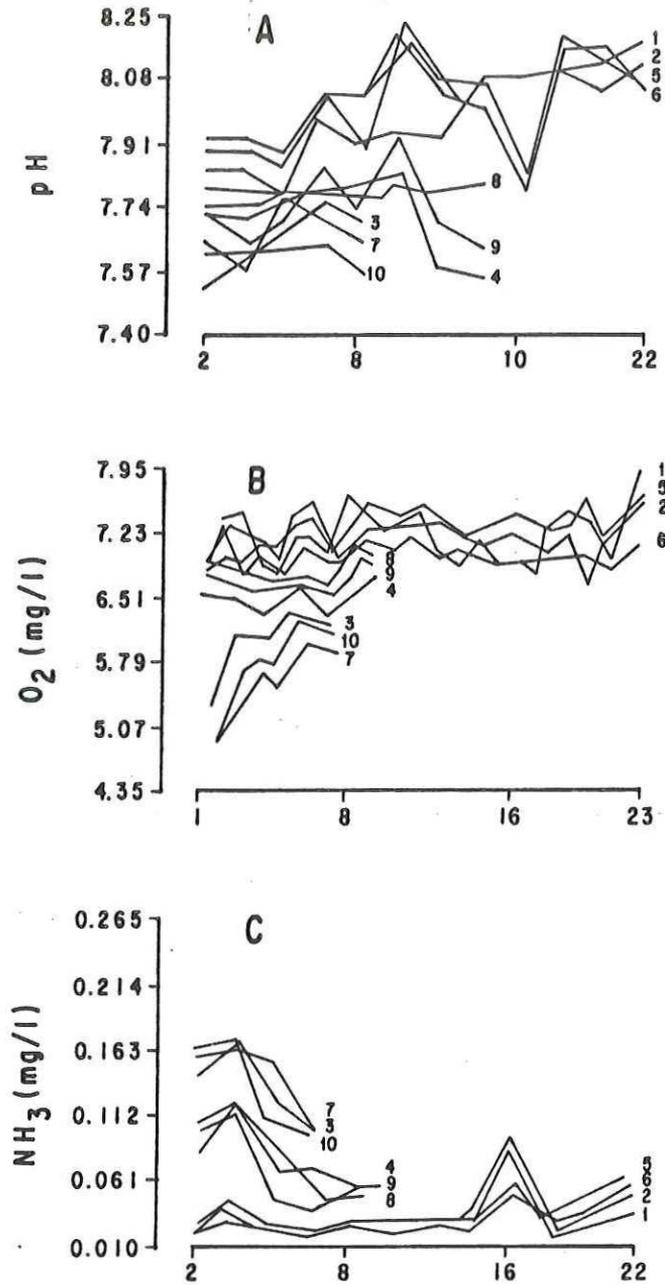


FIG.13.-Registro de parámetros fisicoquímicos del Experimento II  
 A. concentración de pH ; B. concentración de oxígeno di-  
 suelto ; C. concentración de amonio.  
 Los numeros indican cada tratamiento.

que las dietas 1,2,5 y 6 presentaron un rango entre 0.07 a 0.01 mg/L.

#### IV.3.2 CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE LAS LARVAS.

La tabla II-B (pag.43) presenta los valores para el incremento promedio en la longitud de las larvas para los días 6,14 y 22 en cada dieta experimental.

En las dietas 3,7,8 y 10 no se detectó crecimiento y las dietas 4 y 9 únicamente aumentaron 2  $\mu$  en promedio al día 6. La dieta 1 control presentó 13  $\mu$  al día 14 y 38  $\mu$  al día 22.

La dieta 5 acusa el mayor incremento al día 14 y 22, aunque las dietas 2 y 6 tienen el mismo incremento promedio de 33 micras al día 14. La dieta 6 aumenta 10  $\mu$  más que la dieta 2 al día 22.

#### Curvas de crecimiento.

Se graficaron las mediciones de las larvas cuyos tratamientos presentaron sobrevivencia hasta el final del experimento.

La figura 14 muestra las líneas de regresión y el cinturón de confianza al 5 % en los datos de medición de longitud en las larvas de la dieta 1 (Fig. 14-A) y dieta 2 (Fig. 14-B) y la figura 15-A para la dieta 5 y figura 15-B para la dieta 6. El valor de  $N=275$  considera cada punto de la gráfica como el promedio de medición de 25 larvas.

Los valores de la pendiente son significativamente mayores para la dieta 2 y dieta 5, lo que sugiere una tasa de crecimiento más alta que para la dieta 1 y 6.

Las fluctuaciones ascendentes y descendentes de los puntos a lo largo de la línea de regresión, se acentúan aún más a partir del día 14 del experimento en los cuatro tratamientos.

A pesar de que la linealidad del modelo de regresión es rechazada en cada una de las dietas, su tendencia de crecimiento ascendente es notable y significativa para cada gráfica.

El rango de valores para el crecimiento de las larvas se presentó entre 75 y 148 micras para la dieta 1; entre 75 y 143 micras para la dieta 2; de 77 a 155 micras en la dieta 5 y de 75 a 150 micras en la dieta 6.

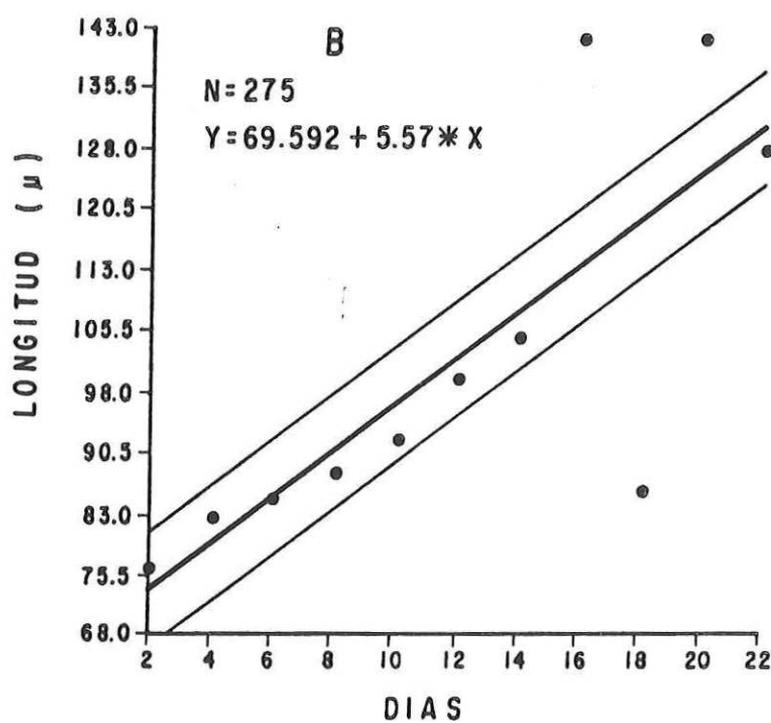
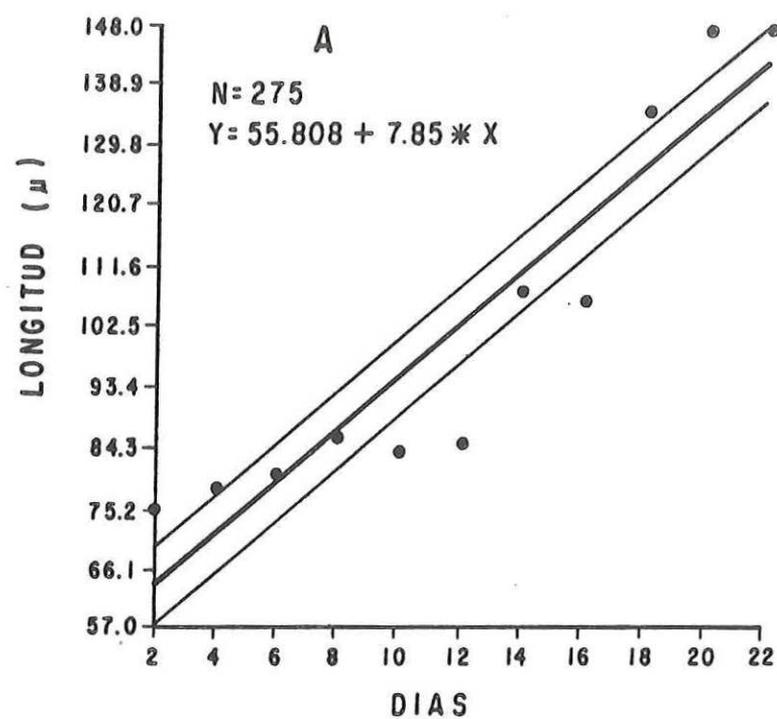


FIG. 14.—Curvas de crecimiento de las larvas del Experimento II  
 Línea de regresión y cinturón de confianza al 5%  
 A) Dieta 1 B) Dieta 2

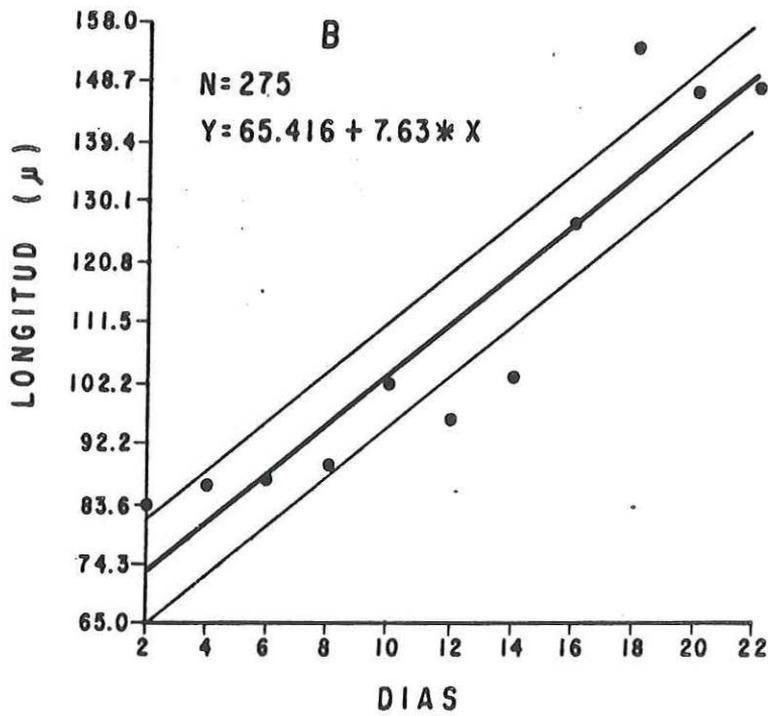
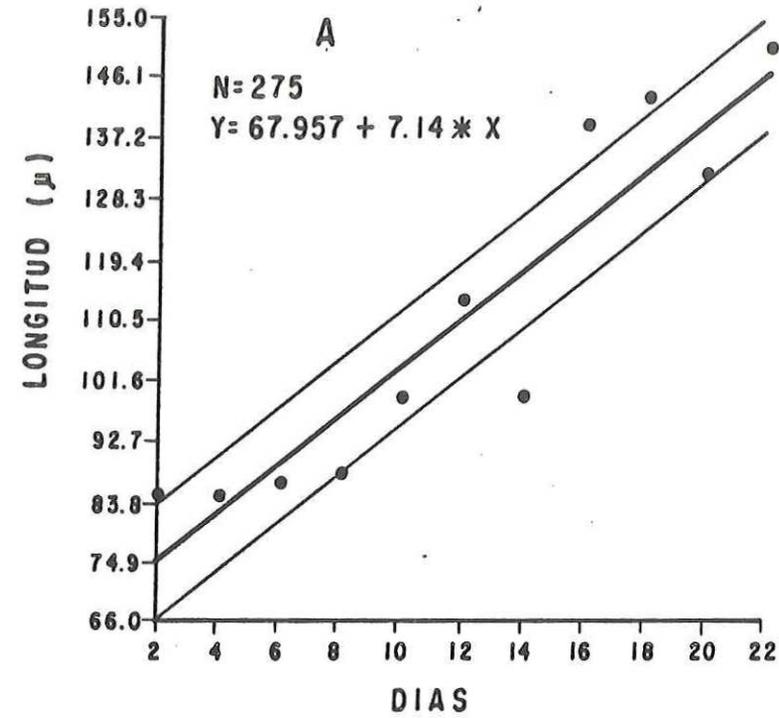


FIG.15.- Curvas de crecimiento de las larvas del Experimento II  
 Línea de regresión y cinturón de confianza al 5%  
 A) Dieta 5 , B) Dieta 6

### Curvas de Supervivencia.

La figura 11-B (pag.48) presenta las curvas de supervivencia para cada tratamiento tomando la densidad inicial larval como el 100 %. La supervivencia final fue de un 3 %. Al igual que en el primer experimento, los tratamientos se separan en 2 bloques, uno de los cuales contiene las dietas que en alguna combinaci3n contenían miel (3,7,9,10,8,4) con menor supervivencia en el tiempo, de las dietas sin miel (1,2,5 y 6) las cuales tuvieron una supervivencia más alta y con una pendiente muy pronunciada en los primeros días del experimento pero tendiendo a suavizar la curva hacia el final del mismo.

En la tabla II-B (pag.43) los porcentajes de supervivencia en las larvas para el día 2 se observan muy bajos para las dietas 3,7,9 y 10 continuando en esas condiciones hasta el día 6.

Al día 14 las larvas presentes en la dieta 5 sobrevivieron en un 90 %, y aunque este porcentaje disminuye un poco (a un 70 %), es la supervivencia más alta al día 22, seguida por un 50 % en las dietas 2 y 6. La dieta control 1 fue la más baja (40 %).

### IV.3.3 ANALISIS ESTADISTICO.

La tabla IV-B (pag.51) presenta el análisis de covarianza a un nivel de significación 5 %, en el cual se observa una diferencia significativa entre los tratamientos.

La homogeneidad de varianzas no es rechazada, sin embargo, el valor de la relación F significativo para las pendientes, implica el que éstas no sean paralelas, es decir que las tasas de crecimiento fueron diferentes para cada tratamiento y la diferencia entre éstos no es independiente del tiempo.

Previo a la prueba SNK (Tabla V-B, pag.53) al día 22 del experimento se verificó la normalidad de los residuos respecto al modelo de análisis de varianza de una vía mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov al 5 % de significancia.

La tabla V-B determina 2 grupos formados, uno por las dietas 1 y 6 y el otro por las dietas 5 y 2.

El valor más alto de la media lo presentó la dieta 5, seguido por el valor del tratamiento 2, e indicando el

valor más bajo para la dieta control 1.

En la figura 12-B la dieta 5 se encuentra conectada con la dieta 2 por lo que esta diferencia estadísticamente no es significativa, sin embargo, su separación de las dietas 1 y 2 es significativa.

## V. DISCUSION.

El acondicionamiento de los adultos repercute en la producción de larvas y juveniles en cantidad y calidad (Helm et al., 1973; Breese y Malouf, 1974; Dupuy et al., 1977; Lannan et al., 1980). Un tiempo inadecuado de acondicionamiento, puede provocar un buen desove, pero conducir a una baja sobrevivencia larval y una reducción en su asentamiento (Breese y Malouf, op. cit.).

Lannan et al. (op. cit.) mencionan que "existe un período de acondicionamiento óptimo durante el cual la proporción de gametos viables se encuentra al máximo". Cuando se realizan apareamientos antes de esa "ventana de acondicionamiento óptimo" puede haber una gran cantidad de gametos que no están en el óptimo de su desarrollo, y si se realizan después de ese período, puede resultar en una reducción de la viabilidad de los gametos. La ventana óptima ocurre mientras el índice gonadal de la población a desovar se encuentra en ascenso pero no ha llegado al máximo. Para determinar este período recomiendan estudiar el ciclo anual de las gónadas de acuerdo a las condiciones fisicoquímicas del área donde se encuentran los progenitores.

Para C. gigas no existen reportes de su desarrollo gonadal

para cada época del año y en el área de San Quintín, por lo que es difícil señalar con precisión un tiempo de acondicionamiento adecuado previo a la inducción al desove en condiciones de laboratorio.

Sin embargo, en algunos organismos que se sacrificaron se observó un tamaño gonadal mayor del 50 % del tamaño corporal y un color blanquecino; indicando una buena condición de madurez (Dupuy et al., 1977).

Por otra parte en Bahía San Quintín se presenta el máximo de producción primaria ( $0.9 \text{ gC/m}^3/\text{día}$ ) y temperaturas de  $18.7^\circ\text{C}$  a finales de verano y principios de otoño (Lara-Lara y Alvarez-Borrego, 1975) época que coincide con los desoves naturales de los ostiones provocados por el aumento de la temperatura (Acosta-Ruiz, com.pers. CICESE.)

Los progenitores en esta investigación no tuvieron un período de acondicionamiento en el laboratorio; sin embargo, la observación gonadal y las condiciones fisicoquímicas que prevalecen en los meses de Julio y Agosto; permiten considerar que los desoves fueron satisfactorios y por lo tanto los experimentos se pudieron llevar a cabo 24 horas después de la fertilización. La población inicial para todas las dietas fue de 10 larvas/ml densidad recomendada por Davis y Guillard (1958) ; Loosanoff y Davis (1963) y Dupuy (1975).

Con base en la estadística realizada sobre los datos de crecimiento de las larvas en los diferentes tratamientos, se encontraron diferencias significativas entre ellos y entre los dos experimentos (Tabla III). Esto puede atribuirse al tipo y volumen del recipiente utilizado en cada experimento, ó a las condiciones de aireación de los cultivos así como también al alimento suministrado.

Dupuy (1975) reporta que se puede influenciar la tasa de crecimiento de las larvas dependiendo del volumen que se utilice, mencionando diferencias entre recipientes de 4 l y de 250 l aún manteniendo la misma densidad larval. Esto se constató durante el desarrollo del experimento II, pues las larvas que se encontraban en un reservorio de 180 l y que no se incluyeron dentro del experimento, tuvieron un incremento promedio en su longitud de 20 micras más que las larvas que recibieron la misma dieta dentro del experimento y que estaban contenidas en 3 l de agua y a la misma densidad. Pese a la validez de esta información; en este trabajo no se considera relevante la diferencia volumétrica entre los recipientes de ambos experimentos (5 y 3 l), puesto que, ésta influyó a los cultivos uniformemente.

Loosanoff y Davis (1963), mencionan que la aireación es muy difícil de igualar en todos los experimentos razón por la cual Davis (1953) la excluye de sus experimentos.

Nascimento-Iracema (1980) encuentra que el crecimiento de las larvas de C. gigas se reduce en cultivos que reciben aireación y que se encuentran alimentados con Chaetoceros calcitrans y Pyramimonas virginica pero que no tiene un efecto significativo cuando se alimentan con Isochrysis galbana y con Pseudoisochrysis paradoxa. Helm y Spencer (1972), señalan que la aireación es nociva para el crecimiento de las pequeñas larvas en el estadio "D" durante sus primeros días de existencia en nado libre. Sin embargo, Breese y Malouf (1974), dicen que el cultivo de las larvas debe tener bastante aireación para mantener la circulación del agua y asegurar una mezcla del alimento y ser transportada a la larva. Walne (1966) citado por Windsor (1977), menciona que la aireación del cultivo es un requerimiento para el buen crecimiento de las larvas y que el beneficio es mas bien debido a la turbulencia causada por las burbujas más que por el efecto directo de mantener el oxígeno en el agua. Helm y Spencer (1972), agregan que la acción primaria de la aireación puede ser la de ayudar a las larvas a conservar la energía para la elaboración de reservas y tejidos del cuerpo, que de otra manera gastarían en nadar.

Esta investigación apoya la utilización de aireación en los cultivos larvales, ya que se observó que cuando por alguna razón se detenía la aireación en alguno de los tratamientos experimentales, la concentración de oxígeno declinaba

considerablemente con respecto a su réplica. Tanto la inyección de aire como oxígeno puro en un sistema, pueden contribuir favorablemente a eliminar la acumulación de desechos nitrogenados tóxicos (Breese y Malouf, op.cit.), además de evitar la reducción de nivel de oxígeno por efectos del consumo causado por la demanda biológica de oxígeno (DBO) de la materia orgánica en descomposición (heces y alimento no ingerido) y también pueden evitarse efectos letales causados por pequeñas cantidades de amonio presentes en el agua a pH elevados. Estos efectos se rebajan elevando la concentración de oxígeno (Kathleen (1955) citado por Wheaton, 1982).

Las condiciones fisicoquímicas de oxígeno entre 7.5 y 8.0 mg/L, temperatura (25 °C) y salinidad (30 ‰) se mantuvieron constantes en ambos experimentos, consideradas como los valores óptimas para el desarrollo de larvas de *C. gigas* por Breese y Malouf (op.cit.) y Lannan et al. (1980).

La forma no ionizada del amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) es tóxica para la mayoría de los organismos acuáticos a concentraciones inferiores de 1ppm. El amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), penetra la membrana celular con facilidad. En una solución acuosa a pH 7 solo el 1 % del amoníaco total se presenta como amonio, mientras que a un pH 8 el 10 % se encuentra en esta forma permeable ( $\text{NH}_3$ ) (Warren, 1962; Epifanio y Srna, 1975).

Las mediciones de pH 7.4 a 8.1 en promedio en los dos experimentos son normales en un sistema de agua salada (Wheaton, 1982). Sin embargo, de una manera general se observa que las dietas con altas concentraciones de alimento, tuvieron también las concentraciones más altas de amonio y los valores más bajos de oxígeno y pH.

Los compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos coadyuvan al desarrollo de bacterias que a su vez aumentan el contenido de amoniaco en el agua. Además las bacterias sirven de alimento a los ciliados y promueven su desarrollo. En el experimento I en el cual no se utilizó cloro para lavar las larvas y los recipientes, se observaron grandes cantidades de protozoarios en los cultivos, no obstante la utilización de un sistema ultravioleta, de filtros de algodón plástico y de un tamiz de 10 $\mu$ . Los ciliados liberan cantidades considerables de amoniaco al agua. Por ejemplo, la excreción de amoniaco en Euplotes vannus cultivados con algas y bacterias fue de  $0.22 \times 10^5$  y  $0.41 \times 10^5$   $\mu\text{mol N/ciliado/hora}$  (Gast y Horstmann, 1983). En el experimento I se observaron grandes cantidades de Euplotes sp., sobre todo en las dietas con altas concentraciones de alimento. Es posible pensar que la excreción de amonio por los ciliados pudo haber tenido un efecto en el registro de las variables fisicoquímicas, puesto que los valores se redujeron considerablemente de 0.700 mg/l registrado como máximo en el experimento I a 0.265 mg/l como máximo en el experimento II y

en el cual se utilizó cloro para eliminar a los protozoarios.

Tanto las algas como los suplementos alimenticios proporcionados a los cultivos de larvas pueden modificar sus condiciones fisicoquímicas.

En los cultivos de microalgas la tasa de crecimiento óptima, es decir el incremento del número de células por unidad de tiempo es función del tamaño del inóculo en condiciones óptimas de luz, salinidad y nutrientes (Hemerick, 1973). En esta investigación los cultivos de microalgas se mantuvieron a una temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , salinidad de 32 ‰ y pH 8.0, y demoraron dos semanas para alcanzar la fase de crecimiento exponencial, la cual es una tasa de crecimiento bastante aceptable (Dupuy et al., 1977). Aunque se trataba de cosechar las algas en su fase logarítmica, la diferencia en la calidad de los cultivos entre los experimentos, pudieron afectar el crecimiento de las larvas (Malouf y Breese, 1977). Además la composición y el valor alimenticio de las algas varían de acuerdo a la intensidad de la luz y el medio de cultivo empleado.

La miel y el almidón de maíz provocaron turbidez en los recipientes. Davis y Hidu (1969) sugieren que las larvas de bivalvos comparativamente, crecen más rápido en bajas concentraciones de sustancias que producen turbidez, que en el

agua de mar clara. Esto se debe probablemente a que las partículas suspendidas quelan o absorben toxinas presentes en los cultivos. Según esto la leve turbidez provocada por los suplementos alimenticios en los recipientes, fue benéfica para el crecimiento de las larvas.

Aunque en el principio de esta investigación se pensó que la miel pudiera ser un buen suplemento alimenticio por sus cualidades antibacterianas naturales y su contenido en diastasa, las dietas que provocaron un crecimiento y sobrevivencia bajas, fueron precisamente las que contenían miel en alguna combinación. (dietas 3,7,4,8,9 y 10; Tabla II). La actividad antibacteriana de la miel diluida se basa en la acción de la oxidasa sobre la dextrosa, pero esta reacción forma ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Por otra parte la presencia de proteínas en la miel hace que tenga una tensión superficial más baja, lo que produjo en los tratamientos que la contenían una marcada tendencia a formar espuma y nata en la superficie del agua. Esto estimula la formación y retención de pequeñas burbujas de aire (Mc Gregor, 1974), que pueden causar problemas al disminuir el espacio requerido para el desplazamiento de las larvas nadadoras más grandes, impidiéndoles así, la búsqueda de su alimento y consecuentemente afectando su tasa de crecimiento.

En la literatura no se encuentran otros trabajos que

utilicen suplementos alimenticios para los cultivos larvales a excepción del trabajo de Davis (1950) citado por Windsor (1977), en el cual menciona que la adición de almidón de maíz a los cultivos larvales no es adecuada ni aún en bajas concentraciones. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la utilización de almidón de maíz es apropiada para la alimentación de las larvas de C. gigas. Como se indica en la tabla II y figura 11, las dietas 6 en el Experimento I y 5 en el Experimento II, con una concentración de almidón de maíz en 1 ppm y 0.9 ppm respectivamente en combinación con microalgas tuvieron los valores más altos en la sobrevivencia y en el incremento del crecimiento. En los resultados de la prueba de SNK (Tabla V-A), el valor más elevado de la media indica la "mejor dieta" y como se puede observar, éstos corresponden a la dieta 6 con una media de 125.18 para el Experimento I y para el Experimento II la dieta 5 con una media de 163.68 (Tabla V-B).

Al comparar los rangos de crecimiento y sobrevivencia larval reportados por Breese y Malouf (1974) en C. gigas para condiciones óptimas de cultivo, con los resultados de estos experimentos, se puede notar en la Tabla II-A para el Experimento I y Tabla II-B para el Experimento II, que los valores reportados para el incremento promedio en el crecimiento al día 14 se encuentran entre 23  $\mu$  y 33  $\mu$ . Breese y Malouf (op.cit.) reportan un incremento promedio de 85 a 95

micras al mismo día, valores superiores a los encontrados en esta investigación. En cuanto a sobrevivencia, estos autores reportan para el día 14 un 45%, mientras que en este trabajo se detectó entre un 90 y 95 % para las dietas más satisfactorias.

Davis y Chanley (1956), señalan que se puede afectar profundamente la tasa de crecimiento y sobrevivencia de las larvas de Lamelibranquios por la presencia de concentraciones muy bajas de sustancias tales como vitaminas y antibióticos, que aunque sean benéficas en pequeñas cantidades, con un ligero aumento en su concentración pueden llegar a ser letales. El primer efecto reconocible es la reducción de la tasa de crecimiento y conforme aumenta la concentración se alcanza un punto en el cual se llega al 100 % de mortalidad.

En ambos experimentos se utilizó antibiótico para ayudar a reducir la población bacteriana (Brereton et al., 1973) citado por Le Pennec y Prieur (1977) pero solo en el experimento II se empleó cloro. Thatcher (1977) reporta que la composición del CLOROX (NaOCl) es de un 90 % de agua, 5.25 % de NaOCl, 4 % NaCl y 0.75 % de "buffers" (NaOH y NaCO<sub>3</sub>) . Además menciona que, debido a la clorinización del agua, se observaron retardos en el desarrollo de los huevos y efectos subletales en los adultos del camarón (Pandalus danae). Neff et al. (1976) citado por Thatcher (1977), reporta un retardo en el desarrollo de juveniles del cangrejo como efecto del uso constante del cloro

en el medio. Pese a tales observaciones en este trabajo se verificó un crecimiento promedio más alto en las larvas del experimento II al cual se le adicionó cloro, respecto al experimento I donde no fue administrado.

La dieta 6 del experimento I, constituida por una mezcla de la microalga P. paradoxa con un suplemento de almidón de maíz (.0045 g/5 l) tuvo un incremento al día 14 de 30  $\mu$  y la dieta 5 del experimento II (mezcla de P. paradoxa con almidón de maíz 0.0045 g/3 l) con un incremento promedio de 43  $\mu$  en catorce días. Davis (1953) reporta el crecimiento promedio de las larvas de C. virginica alimentadas con bacterias sulfurosas y con Chlorella sp. en 20  $\mu$  y 65  $\mu$  respectivamente.

Las diferencias en los valores de crecimiento registradas en los dos experimentos se atribuyen principalmente al mejoramiento en la calidad del agua durante el experimento II. Es probable que la tasa de crecimiento en el experimento I pudo haber sido inhibida por colisiones frecuentes de las larvas con los ciliados observados durante los controles.

La alimentación discontinua en las larvas es un tema de discusión. Los trabajos de Langton y McKay (1974), reportan que una alimentación discontinua proporciona un mejor crecimiento, posiblemente como el resultado de una adaptación metabólica al régimen alimenticio. Por otra parte Lucas y Rangel-Dávalos

(1983) señalan que la primera alimentación de las larvas de C. gigas detectada a través de un microscopio de epifluorescencia, ocurre 24 horas después de la fertilización a una temperatura de 24 °C, y mencionan que las larvas de bivalvos se alimentan después continuamente a diferencia del ritmo digestivo encontrado en los adultos por Morton en 1973. Cuando se alimentan las larvas con Pavlova lutheri e Isochrysis galbana estiman que es necesario un promedio de 800 células/larva/día a 24 °C para mantenerles los estómagos llenos. Si en esta investigación se hubiera proporcionado el alimento a las larvas en esa concentración, se hubiera requerido un promedio de 8000 células/ml/día; cantidad menor a la que se ofreció a las larvas durante los dos experimentos (Tabla I, pag.27). Gerdes (1983) reporta que las larvas de 77µ a 120µ filtran menos activamente que las larvas mayores, y menciona que la tasa de filtración para las larvas de C. gigas mantenidas en 25 °C y 25 % difiere según su tamaño. Así las larvas que miden entre 75µ y 120µ filtran de 0.5 a 2.7 ml/hora/larva y las que miden de 120 a 310 µ filtran de 7.5 a 99.7 ml/hora/larva. Además Gerdes, (op.cit.) reporta que la larva remueve 50 % más alimento a concentraciones menores de  $25 \times 10^6$  células/litro que a mayores concentraciones de  $100 \times 10^6$  células/litro. Loosanoff y Davis (1963) y Malouf y Breese (1977) apoyan la teoría de que una sobrealimentación en el cultivo retrasa la tasa de crecimiento de las larvas. Las concentraciones utilizadas en este trabajo, son las reportadas como óptimas para el cultivo de larvas por

estos autores, pero al añadir los suplementos alimenticios, se eleva la concentración de la dieta en las cantidades correspondientes a cada tratamiento (Tabla I). En las concentraciones más altas de las dietas se observó una excesiva formación de pseudoheces, como también lo reportan Loosanoff y Davis (1963) de sus experimentos. El problema que generan las largas tiras de moco que arrastran las larvas, es el que atrapan y enredan a otras larvas nadadoras, impidiéndoles probablemente mantener el ritmo alimenticio adecuado al no poderse desplazar libremente en la búsqueda del alimento.

Las desventajas de alimentar a las larvas discontinuamente una o dos veces al día (Malouf y Breese, 1977) es que al principio éstas pueden filtrar activamente, pero después de ingerir una determinada cantidad de alimento, se producen pseudoheces, o sea que la larva se encuentra parte del tiempo sobrealimentada y prácticamente en inanición en el tiempo restante a la siguiente alimentación. Durante esta investigación, se pudo observar que en las dietas 3, 7, 8, 9 y 10, las cuales contenían altas concentraciones de suplementos alimenticios en diferentes combinaciones, las larvas excretaron pseudoheces.

La jerarquización de las dietas de acuerdo al valor de sus medias expresado según la prueba SNK (Tabla V-A) denota para el experimento I la secuencia en las dietas 6, 5, 2 y 1 es decir,

que las dietas con suplemento alimenticio de almidón de maíz en alta y baja concentración respectivamente, resultaron en mejor crecimiento que las dietas control (con microalgas y sin alimento). La diferencia en el valor de la media con respecto a la dieta 2 y 5 no es significativa, sin embargo, estos valores difieren significativamente de la dieta 6, razón por la cual se presenta en un grupo independiente.

En el experimento II, la secuencia presentada son las dietas 5,2,6 y 1 lo que indica que a diferencia de lo encontrado durante el primer experimento, la dieta 2 a base de microalgas se sitúa entre las dietas 5 y 6 las cuales tuvieron concentraciones de almidón de maíz de 0.9 y 0.6 ppm respectivamente. Sin embargo, los valores encontrados para la dieta 2 y 5 forman un solo grupo que no difiere significativamente pero que presenta diferencia con respecto al segundo grupo formado por las dietas 1 y 6. Esto implica que un aumento en la concentración de las microalgas es favorable para el crecimiento de las larvas, pero sigue siendo más satisfactorio el agregar una concentración de almidón de maíz en 0.9 ppm.

En la tabla V los valores de las medias son más grandes para el experimento II (Tabla V-B) que para el experimento I (Tabla V-A) incluso para la dieta 1 control en inanición, lo que sugiere el éxito del mejoramiento de la calidad del agua

por el empleo del cloro.

En cuanto a la sobrevivencia, para ambos experimentos, en la figura 11-A y figura 11-B se observa una clara separación en dos grupos respecto a las dietas que no contuvieron miel (1,2,5 y 6) de las dietas con miel en diferente combinación (3,4,7,8,9 y 10). Durante el experimento I (Fig.11-A) las dietas 1,2,5 y 6 tienen una pendiente menos marcada durante los primeros días del experimento que la pendiente presentada por las mismas dietas durante el experimento II (Fig.11-B), sin embargo, al transcurrir del día 10 en adelante estas curvas tienden a suavizarse terminando con una sobrevivencia más alta (3 %) que durante el primer experimento (1 %) (Fig.11-A).

Al parecer el aumento en la concentración de microalgas aunado a la concentración de miel durante el segundo experimento disminuyó más drásticamente la sobrevivencia larval, puesto que estas mismas curvas en las dietas 3,7,10,4,8 y 9 durante el experimento I aparecen con una pendiente menos marcada y un tiempo de sobrevivencia mayor que en el segundo experimento.

Cabe la posibilidad, según la tendencia de las curvas mostradas en la figura 11-B, de establecer el hecho de que la utilización del cloro o el empleo de un doble tamiz durante el experimento II haya disminuido la sobrevivencia de las larvas

en sus primeros días. Sin embargo, este "stress" producido por sustancias añadidas al medio y por efectos de manipuleo durante los cambios de agua, puede que sea más tolerado por larvas más grandes y repercuta en una mayor sobrevivencia.

Es interesante hacer notar que en la dieta 6 con una concentración de almidón de maíz de 1ppm determinada como la cantidad más baja del experimento I y en la dieta 5 del experimento II, con una concentración de almidón de maíz de 0.9 ppm; correspondiendo a la más alta densidad en este experimento, haya resultado el mejor crecimiento y sobrevivencia de las larvas de *C. gigas* con una diferencia de solo 0.1 ppm entre los dos tratamientos (Tabla II y Fig.11), a pesar de que se tuvo una concentración aún más baja de almidón de maíz de 0.6 ppm para la dieta 6 durante el experimento II. Estos resultados no solo sugieren que el almidón de maíz resulta un buen suplemento alimenticio para las larvas, sino que su concentración óptima parece encontrarse entre 0.9 y 1 ppm.

El crecimiento y la sobrevivencia de las larvas que no recibieron alimento (Tabla II) se encuentra dentro de las 4 "mejores dietas". Una explicación que se puede dar a este resultado, se centra en el hecho de que el experimento se llevó a cabo en un sistema cerrado para el cual se presenta la formación de "Gelbstoff", una forma de gel que se acumula en los acuarios cuando prevalecen condiciones eutróficas. El

"Gelbstoff" que está formado principalmente por excreciones de algas (fenoles y carbohidratos) y productos de excreciones animales (nitrogenados principalmente) (Spotte, 1979), pueden servir como fuente de alimento para las larvas. Por otra parte los bajos niveles de excreción de amonio medidos en los cultivos controles en inanición, parecen indicar que las larvas utilizan su reserva de lípidos como fuente de energía (Mayzaud, 1973).

Los ajustes por regresión lineal que se realizaron en las curvas de crecimiento, fueron rechazados para todas las dietas tanto en el experimento I (Figs. 9 y 10) como en el experimento II (Figs. 13 y 14) excepto para la dieta control 1, sin alimento en el experimento I (Fig. 9-A). Es posible que en este caso no se haya rechazado dicho modelo al reflejar únicamente el crecimiento de las larvas, sin la adición de otros factores como el tipo de alimento agregado. El rechazo del modelo de regresión lineal en la dieta control durante el experimento II probablemente refleje la interferencia producida por la utilización del cloro.

## VI. CONCLUSIONES.

La microalga Pseudoisochrysis paradoxa en combinación con un suplemento de almidón de maíz en concentraciones entre 0.9 y 1 ppm es adecuada para el crecimiento y sobrevivencia de las larvas de C. gigas.

La miel no fue un suplemento favorable al crecimiento y sobrevivencia, al menos en las concentraciones probadas, debido a su acidez y al contenido de proteínas que provocan la formación de espuma en el agua de los cultivos.

La adición de los suplementos de almidón de maíz y miel de abeja en combinación, no fue adecuada en las altas y bajas concentraciones probadas durante los experimentos para el desarrollo de las larvas. Sin embargo, el almidón de maíz resulta ser el mejor suplemento alimenticio independientemente de la adición de una mayor cantidad de microalgas, puesto que repercute en un mejor crecimiento.

La utilización de antibióticos y cloro contribuyen al mejoramiento de la calidad del agua, condición indispensable para el buen desarrollo y sobrevivencia de las larvas como pudo verificarse durante el experimento II.

## VII. RECOMENDACIONES.

Los resultados de este trabajo se basan únicamente en los datos obtenidos del crecimiento y sobrevivencia de las larvas. Windsor (1977) sugiere que aunque el crecimiento en esta etapa del desarrollo es un factor importante, no siempre es un indicador adecuado de un asentamiento exitoso. Por lo general una alta tasa de sobrevivencia conduce a una alta fijación, pero es además importante considerar otros factores como el contenido de lípidos en las larvas y porcentajes finales de fijación obtenidos.

Sería interesante probar la concentración adecuada de almidón de maíz reportada en este trabajo, pero en rangos aún más finos y en combinación con otro tipo de microalga como por ejemplo Isochrysis galbana, la cual tiene propiedades antibacterianas. La mezcla de dos o más especies de microalgas con el suplemento alimenticio, podría mejorar la calidad de la dieta.

## LITERATURA CITADA.

Breese, W. y R.E. Malouf. 1974. Hatchery Manual for the Pacific oyster. Oregon State University Sea Grant College Program. 21 pp.

Creekman, L. L. 1977. The effects of conditioning the American Oyster (Crassostrea virginica) with Tetraselmis suecica and cornstarch on the growth, vigor and survival of its larvae. M.S. Thesis. Virginia Institute of Marine Science. Gloucester Point, Virginia. 57 pp.

Culliney, J.L., P.J. Boyle y R.D. Turner. 1975. New approaches and techniques for studying bivalve larvae. En: Culture of Marine Invertebrate Animals. (Smith, W.L. y M.H. Chanley, ed.). Plenum press. New York. 338 pp.

Davis, H.C. 1950. On food requirements of larvae of Ostrea virginica. Anat. Rec. 108: 132-133.

Davis, H.C. 1953. On food and feeding of larvae of the

American Oyster: Crassostrea virginica. Biol. Bull. 104: 334-350.

Davis, H.C. y P.E. Chanley. 1956. Effects of some dissolved substances on bivalve larvae. Proc. Natl. Shellfish Ass. 46: 59-68.

Davis, H.C. y R.R. Guillard. 1958. Relative value of ten genera of micro-organisms as foods for oyster and clam larvae. U.S. and Wildlife Service, Fish. Bull. 58: 293-304.

Davis, H.C. y H. Hidu. 1969. Effects of turbidity - producing substances in sea water on eggs and larvae of three genera of bivalve Mollusks. Veliger: 11(4): 316-323.

Devel, H.J. 1957. The Lipids -their chemistry and biochemistry. Biochemistry Interscience Publishers Inc. New York. Vol.III. 1065 pp.

Dupuy, J.L. 1975. Some physical and nutritional factors wich affect the growth and setting of the larvae of the oyster, Crassostrea virginica in the laboratory. En: Physiological Ecology of Estuarine Organims (F. John Vernberg, ed.). Univ. South Carolina Press. 319-331 pp.

- Dupuy, J.L. y Rivkin, S. 1972. The development of laboratory techniques for the production of cultch-free spat of the oyster, Crassostrea virginica. Chesapeake Science 13(1):45-52.
- Dupuy, J.L., N.T. Windsor y Ch.E. Sutton. 1977. Manual for design and operation of an oyster seed hatchery for the american oyster Crassostrea virginica. Special report No.142 in Applied Science and Oceans Engineering of the Virginia Institute of Marine Science. Gloucester Point, Virginia. 104 pp.
- Epifanio, C.E. y R.F. Srna. 1975. Toxicity of amonia, nitrite ion, nitrate ion, and orthophosphate to Mercenaria mercenaria and Crassostrea virginica. Marine Biology 33:241-246.
- Gallager, S.M. y R. Mann. 1981. Use of lipid -specific staining techniques for assaying condition in cultured bivalve larvae. Journal of Shellfish Research 1(1):69-73.
- Gast, V. y V. Horstman. 1983. N-reminalization of phyto- and bacterioplankton by the marine ciliate Euplotes vannus. Marine Ecology-Progress Series 13:55-60.
- George, W.C. 1952. The digestion and absorption of fat in

Lamellibranch. Biol.Bull. 102:118-127.

Gerdes, D. 1983. The pacific oyster Crassostrea gigas part. I. Feeding behavior of larvae and adults. Aquaculture 31:195-219.

Haven, D.S. 1965. Supplemental feeding of oysters with starch. Chesapeake Science 6(1):43-51.

Helm, M.M. y B.E. Spencer. 1972. The importance of the rate of aeration in hatchery cultures of the larvae of Ostrea edulis L.. J. Const. Int. Explor. Mer. 34(2):244-255.

Helm, M.M., D.L. Holland y R.R. Stephenson. 1973. The effect of supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of Ostrea edulis L. on larval vigour. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 53:673-684.

Hemerick, G. 1973. Mass culture, p. 255-273. En: Handbook of phycological methods. (J.R. Stein, ed.). Cambridge University Press., New York. 448pp.

Hernández, M., A. Chávez y H. Bourges. 1974. Valor Nutritivo de Los Alimentos Mexicanos. Publicaciones de la división de nutrición -L- 12, 6ta ed. Instituto de la Nutrición, México. 15 pp.

- Hidu, H. y H.S. Tubiash. 1963. A bacterial basis for the growth of antibiotic-treated bivalve larvae. Proc. Natl. Shellfish. Ass. 54:25-39.
- Holland, D.L. y B.E. Spencer. 1973. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 53:287-298.
- Islas-Olivares, R. 1975. El ostión japonés (*Crassostrea gigas*) en Baja California. Ciencias Marinas 2(1):58-59.
- Langton, R.W. y G.U. McKay. 1974. The effect of continuous versus discontinuous feeding on the growth of hatchery reared spat of *Crassostrea gigas* (Thunberg). J. Const. Int. Explor. Mer. 35(3):361-363.
- Lannan, J.E., A. Robinson y W.P. Breese. 1980. Broodstock management of *Crassostrea gigas* II. Broodstock conditioning to maximize larval survival. Aquaculture 21:337-345.
- Lara-Lara, J.R., S. Alvarez-Borrego. 1975. Distribución superficial de algunos parámetros hidrológicos físicos y químicos en el estero de Punta Banda, B.C.. Ciencias Marinas 2(1):77-99.

- Le Penneec, H. y D. Prieur. 1977. Antibiotics in larval rearing of marine bivalves. *Aquaculture* 12:16-30.
- Loosanoff, V.L. y H.C. Davis. 1963. Rearing of bivalve molluscs. *Advances in Marine Biology* 1:136 pp.
- Lucas, A. y C. Rangel-Dávalos. 1983. Detection of the first larval feeding in Crassostrea gigas using the epifluorescence microscope. *Aquaculture* 30:369-374.
- Mackie, G. 1969. Quantitative studies of feeding in the oyster Crassostrea virginica. *Proc. Natl. Shellfish. Ass.* 59:6-7.
- Malouf, R., R. Keck, D. Maurer, y C. Epifanio. 1973. Occurrence of gas-bubble disease in three species of bivalve molluscs. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 29(5):588-589.
- Malouf, R.E. y W.P. Breese. 1977. Food consumption and growth of larvae of the pacific oyster, Crassostrea gigas (Thunberg) in a constant flow rearing system. *Proc. Nat. Shellfish Ass.* 67:7-16.
- Matthiessen, G.C. y R.C. Toner. 1966. Possible methods of improving the shellfish industry of Martha's Vineyard. Duke's Country, Massachussts. *Mar. Res. Fund.* 138pp.

- Mayzaud, P. 1973. Respiration and nitrogen excretion of zooplankton II. Studies of the metabolic characteristics of starved animals. *Marine Biology* 21:19-28.
- Mc Gregor, S.E. 1974. *La Apicultura en los Estados Unidos*. 2da edición, ed. Limusa, México. 65 pp.
- Millar, R.H. y J.M. Scott. 1967. Bacteria-free culture of oyster larvae. *Nature* 216:1139-1140.
- Morton, B. 1973. A new theory of feeding and digestion in the filter-feeding Lamellibranchia. *Malacologia* 14:63-79.
- Nascimento-Iracema, A. 1980. Growth of the larvae of *Crassostrea gigas* (Thunberg), feed with different algal species at high cell concentrations. *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 39(2):134-139.
- Paniagua-Michel, J. y C. Granados-Machuca. 1981. Obtención de dos medios económicos para el cultivo de fitoplánton bajo condiciones controladas. Tesis profesional. Escuela Superior de Ciencias Marinas (UABC). 81 pp.
- Parsons, T.R., K. Stephens y J.D.H. Strickland. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 18(6):1001-1016.

- Pellet, F.C. 1977. American Honey Plants. 5th edition, Dadant and Sons ed., U.S.A. 466 pp.
- Sokal, R. y F.J. Rohlf. 1979. Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume ediciones, Madrid. 832 pp.
- Spotte, S. 1979. Seawater Aquariums. The captive environment. John Wiley and Sons, Inc., New York. 413 pp.
- Thatcher, T.D. 1977. An effect of chlorination on the hatching of coon stripe shrimp eggs:so what?. Proc. Nat. Shellfish Ass. 67:71-74.
- Van Weel, P.B. 1961. The comparative physiology of digestion in molluscs. Am. Zoologist 1:245-252.
- Walne, P.R. 1979. Culture of Bivalve Molluscs. Farnham-Suney, England. 188 pp.
- Warren, K.S. 1962. Ammonia toxicity and pH. Nature 195:47-49.
- Wheaton, F.W. 1982. Acuicultura. Diseño y construcción de sistemas. A.G.T. editor, S.A., México. 704 pp.

Windsor, N.T. 1977. Effect of various algal diets and larval density in the larviculture of the american oyster Crassostrea virginica (Gmelin). M.S. Thesis. Virginia Institute of Marine Science. Gloucester Point, Virginia. 80 pp.