

**CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE  
EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA**

**FLUJO DE AMINOACIDOS DISUELTOS Y SU EFECTO  
SOBRE EL CRECIMIENTO DE HUEVOS Y LARVAS  
DE LA ANCHOVETA NORTEÑA  
*Engraulis mordax Girard***

**TESIS**

**MAESTRIA EN CIENCIAS**

**REYNA ALEJANDRA GIL HERNANDEZ**

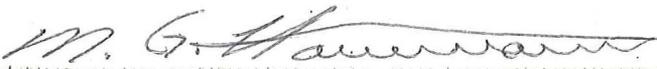
Ensenada Baja California

Noviembre de 1986

RESUMEN de la tesis de Reyna Alejandra Gil Hernández,  
presentada como requisito parcial para la obtención del grado  
de MAESTRO EN CIENCIAS en OCEANOLOGIA con opción en ECOLOGIA  
MARINA. Ensenada, B.C., México. Noviembre de 1986.

Flujo de aminoácidos disueltos y su efecto sobre el  
crecimiento y supervivencia de huevos y larvas de la  
anchoveta nortea Engraulis mordax Girard.

Resumen aprobado por :

  
-----

M.C. Gregory Hammann

Director de tesis

En el presente trabajo se estudió el flujo de aminoácidos  
en huevos y larvas vitelinas de la anchoveta nortea Engraulis  
mordax Girard, por medio de los análisis bioquímicos de  
incorporación de carbono 14 y cromatografía líquida de alta  
precisión (HPLC). El efecto sobre el crecimiento y  
supervivencia aunado a concentraciones subóptimas de alimento

para la especie, se investigó durante 12 días de experimentación en el laboratorio cultivando las larvas desde su eclosión.

En los experimentos bioquímicos se encontró que hay un intercambio insignificante de aminoácidos marcados en huevos de 24 horas después del desove; menos del 1% del material radiactivo del medio se encontró en los huevos después de tres horas de incubación. A la vez se observó la salida de 17 aminoácidos con una tasa de 365.29 pM/huevo/hora. En larvas vitelinas de 24 a 30 horas después de la eclosión, se encontró que hubo incorporación a una tasa de entrada de 2.58 pM/larva/h de alanina marcada del medio en un 56.0% de los cuales 49.3% se encontraron en proteínas y 6.7% en aminoácidos libres. Pero a la vez se observó también la salida de 17 aminoácidos con una tasa de 108.46 pM/larva/hora (7.5 pM/larva/h tasa de salida de alanina).

Se encontró una diferencia significativa entre el crecimiento de las larvas contenidas en los tanques de cultivo bajo condiciones mínimas de alimentación (1 org/ml más aminoácidos (16 y 40 ug/l) (0.245 y 0.270 mm/día) y las larvas que sólo tenían alimento particulado (0.174 mm/día). Con respecto al porcentaje de supervivencia, se encontró que, en los tanques con alimento y aminoácidos estuvo entre 26.9 y 38.4% y en los que no hubo aminoácidos entre 11.0% y 22.8%.

Por lo anterior se concluye que basandose en los experimentos bioquímicos, tanto huevos como larvas vitelinas no obtienen ningún beneficio energético directo de los aminoácidos. Considerando los resultados de crecimiento y supervivencia el beneficio obtenido por las larvas es posiblemente secundario, suponiéndose que el fitoplancton y/o el zooplancton reciben algún beneficio por los aminoácidos disueltos o que posiblemente haya algún efecto ventajoso sobre la calidad del agua.

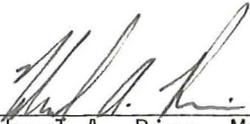
TESIS APROBADA PARA SU DEFENSA POR:



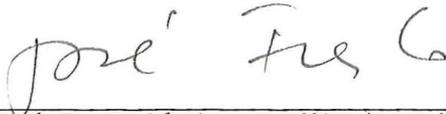
M.C. Gregory Hammann, Director del Comité



M.C. Anamaría Escofet Giansone, Miembro del Comité



Dr. Michael A. Rice, Miembro del Comité



Dr. José Frez Cárdenas, Miembro del Comité



M.C. Gregory Hammann, Jefe del Departamento de Ecología Marina



Dr. José Rubén Lara Lara, Director Interino de la División de Oceanología



M.C. Cauhtémoc Nava Button, Director Académico Interino

Tesis presentada en Noviembre 14, 1986.

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE  
EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA

DIVISION DE OCEANOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA MARINA

Flujo de Aminoácidos Disueltos y su Efecto Sobre  
el Crecimiento y Supervivencia de Huevos y Larvas  
de la anchoveta norteña Engraulis mordax Girard.

Tesis

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

Reyna Alejandra Gil Hernández

Ensenada, B.C., noviembre de 1986

Con respeto y amor a la memoria de mi padre Baltazar,  
que siempre me motivó a seguir adelante.

Con amor y respeto a mi madre Georgina por ser una persona  
tan especial, y que sigue enseñándome con su ejemplo.

A mis hermanos Maribel, Georgina, Baltazar, Gabriel,  
Mayra y Claudia por su cariño y entusiasmo.

A Guillermo por su apoyo, cariño y comprensión.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Grover Stephens por sus comentarios valiosos, por su gran entusiasmo y apoyo económico durante la realización de los experimentos bioquímicos.

Al Dr. Michael A. Rice por su gran apoyo y ayuda en los experimentos bioquímicos, por la revisión y enseñanza paso a paso del procesamiento de datos y corrección de ellos.

Al DR. Jim Davis por su ayuda en el diseño de los experimentos bioquímicos, en la realización de los experimentos de carbono 14 y por el entrenamiento técnico.

A los miembros de mi comité de tesis: M.C. Gregory Hammann por la orientación recibida en el presente trabajo, por sus sugerencias para una mejor redacción y por la traducción de la sección bioquímica al inglés. Al Dr. Enrique Carrillo Barrios-Gómez por las sugerencias y aportaciones recibidas en el presente trabajo, y por el apoyo moral brindado en tiempos difíciles. A la M.C. Anamaria Escofet y M.C. Francisco Suarez, por sus sugerencias y comentarios durante la revisión del presente trabajo.

Al Biol. Guillermo Vueltiflor Burgos por su apoyo y ayuda durante toda la realización de este trabajo.

A la P.O. Angélica Ramírez González, a la P.B. Rebeca Vásquez y a la P.O. Sonia Soto por su valiosa ayuda en los experimentos de crecimiento y supervivencia. A la M.C. Elena Solana y Daniel Loya por sus valiosas sugerencias en la sección estadística. A Jorge Rosales por su cooperación en el transporte al laboratorio de los desoves de anchoveta. A mis amigos Mario Nieves, Hector Echevarria, Guillermo Rodríguez, Sergio Ramos, Ernesto Arias, Miriam Pomian, Maria Elena Corona, Gabino Pintado y Tito Córdoba por brindarme su ayuda o un consejo cuando lo necesite. Y a los Bioquímicos Graciela Guerra y Cesar Migoni por su orientación valiosa.

Al National Marine Fisheries Service La Jolla, por haber proporcionado el material biológico para la realización de los experimentos, en especial a Roderick Leong por la realización de los desoves de anchoveta.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al pueblo de México por el apoyo económico recibido durante mi estancia en el CICESE.

## CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCION	1
I.1 Antecedentes	7
I.2 Objetivos	14
II. MATERIALES Y METODOS	15
II.1 Obtención de Huevos y Método de Separación	15
II.2 Experimentos con Aminoácidos Marcados con Carbono 14	15
II.2.1 Cambios en la Concentración de Alanina Marcada ( $^{14}\text{C}$ ) del Medio.	16
II.2.2 Cálculo del Flujo de Alanina Marcada $^{14}\text{C}$ en Huevos y Larvas.	17
II.3 Experimentos con Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC).	18
II.4 Asimilación de Alanina Marcada ( $^{14}\text{C}$ ) y Análisis de la Composición de Aminoácidos Libres en Huevos y Larvas.	21
II.5 Experimentos de Crecimiento y Supervivencia.	22
II.5.1 Crecimiento	26
II.5.2 Supervivencia	27
III. RESULTADOS	30
III.1 Huevos Marcados con $^{14}\text{C}$	30
III.1.1 Huevos Fertilizados Marcados con $^{14}\text{C}$ .	30
III.1.2 Cromatografía Líquida de Alta Precisión en Huevos	32
III.2 Larvas Vitelinas	32
III.2.1 Cambio en la Concentración en el Medio de Alanina Marcada.	32
III.2.2 Flujo de Alanina Marcada $^{14}\text{C}$ a Larvas Vitelinas.	38
III.3 Cromatografía Líquida de Alta Precisión	39

Cont. CONTENIDO

Página

en Larvas Vitelinas.

III.4 Incorporación de Alanina Marcada ( $^{14}\text{C}$ )  
(Asimilación) por Larvas Vitelinas. 48

III.4.1 Concentración de Aminoácidos Libres  
en Huevos y Larvas Vitelinas. 48

III.5 Crecimiento y Supervivencia 51

III.5.1 Crecimiento. 54

III.5.2 Supervivencia Larval y Mortalidad. 64

IV. DISCUSION 72

V. CONCLUSIONES 82

VI. RECOMENDACIONES 83

LITERATURA CITADA 84

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página	
1.	Desintegraciones de alanina marcada ( $^{14}\text{C}$ ) por minuto de muestras del medio durante tres horas de experimentación con huevos de <i>Engraulis mordax</i> , para las cinco repeticiones.	31
2.	Cromatogramas de HPLC de una mezcla de 12 aminoácidos a una concentración de 0.25 $\mu\text{M}$ cada uno, con huevos de <i>E. mordax</i> . A: A tiempo cero, B: Después de incubarlos por una hora.	33
2.	Cromatogramas de HPLC de la concentración de aminoácidos en el medio con huevos de <i>E. mordax</i> . C: Después de dos horas de incubación D: Después de tres horas, con un total de 17 aminoácidos en el medio.	34
3.	Concentración de 17 aminoácidos en el medio, durante tres horas de incubación de huevos de <i>E. mordax</i> .	36
4.	Porcentaje de radioactividad que permaneció en el medio, de larvas vitelinas de <i>E. mordax</i> , durante tres horas de experimentación.	37
5.	Cromatogramas de HPLC de una mezcla de 12 aminoácidos a una concentración de 0.25 $\mu\text{M}$ cada uno, con larvas vitelinas de <i>E. mordax</i> . A: A tiempo cero. B: Después de una hora de incubación.	40
5.	Cromatogramas de HPLC de la concentración de aminoácidos del medio de larvas vitelinas de <i>E. mordax</i> . C: Después de dos horas de incubación, D: Después de tres horas.	41
6.	Flujo de 17 aminoácidos de larvas de <i>E. mordax</i> durante tres horas de incubación.	42
7.	A : Cambios en la concentración de alanina del medio determinada por la desaparición de alanina marcada del medio (1) y por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) (2), por larvas vitelinas de <i>E. mordax</i> durante tres horas de	44

Cont. LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
incubación. B: Curvas de los valores no corregidos (1) y corregidos (3) de la entrada de alanina marcada expresada en logaritmos.	
8. Porcentaje de radioactividad corregida que permaneció en el medio de larvas vitelinas de <i>E. mordax</i> , durante tres horas de experimentación.	46
9. Tasa de salida total, entrada y salida neta de alanina de larvas vitelinas de <i>E. mordax</i> después de tres horas de incubación.	47
10. Cromatogramas de HPLC de la concentración interna de aminoácidos libres de <i>E. mordax</i> . A: En huevos, B: En larvas vitelinas después de tres horas de incubación.	50
11. Crecimiento de larvas de <i>E. mordax</i> durante 12 días de experimentación en el laboratorio. 1A: Agua sintética. 1B: Agua de mar (1B). 2B, 3B y 4B: Tres concentraciones de aminoácidos disueltos (1, 16 y 40 ug/l; respectivamente).	59
11. Crecimiento de larvas de <i>E. mordax</i> durante 12 días de experimentación en el laboratorio. 5B, 6B y 7B: Tres concentraciones de aminoácidos libres 1, 16 y 40 ug/l más alimento particulado. 8B: Sólo con alimento particulado.	60
12. Dendograma de la diferencia significativa de las tasas de crecimiento de larvas de <i>E. mordax</i> en cuatro diferentes tratamientos con alimento particulado.	63
13. Curvas no corregidas de supervivencia de larvas de <i>E. mordax</i> cultivadas durante 12 días en el laboratorio. 1A: Agua sintética. 1B: Agua de mar. 2B, 3B y 4B: Tres concentraciones de aminoácidos 1, 16 y 40 ug/l respectivamente.	68
13. Curvas no corregidas de supervivencia de larvas de <i>E. mordax</i> cultivadas durante 12 días en el laboratorio. 5B, 6B y 7B: Tres concentraciones de aminoácidos 1, 16 y 40 ug/l más alimento particulado respectivamente. 8B: Sólo con alimento particulado.	69

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página	
I.	Diseño experimental : Utilización de aminoácidos y alimento particulado por larvas de <i>E. mordax</i> .	24
II.	Desintegraciones por minuto (DPM) de alanina marcadas de muestras del medio durante tres horas de experimentación con huevos de <i>E. mordax</i> .	30
III.	Concentración y flujo total de cada aminoácido durante tres horas de experimentación con huevos de <i>E. mordax</i> .	35
IV.	DPM de alanina marcada $^{14}\text{C}$ detectadas en muestras del medio durante tres horas de experimentación con larvas vitelinas de <i>E. mordax</i> .	35
V.	Entrada de alanina marcada a larvas vitelinas midiendo la radioactividad en el tejido.	38
VI.	Entrada de alanina marcada a larvas vitelinas de <i>E. mordax</i> , considerando la disminución de radioactividad en el medio.	39
VII.	Concentración de cada aminoácido y su tasa de flujo durante tres horas de incubación de larvas vitelinas de <i>E. mordax</i> .	43
VIII.	Valores en nM de la salida total y entrada y salida neta (corregidos) de alanina de larvas vitelinas de <i>E. mordax</i> .	45
IX.	Distribución de $^{14}\text{C}$ en larvas vitelinas de <i>E. mordax</i> después de tres horas de incubación.	48
X.	Concentraciones de aminoácidos libres en huevos y larvas vitelinas de la anchoveta norteña después de tres horas de incubación.	49
XI.	Parámetros físicos temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), salinidad (ppm), oxígeno (ml/l) y pH promedio,	52

Cont. LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
de los experimentos llevados a cabo en el laboratorio con estadios larvales de <i>E. mordax</i> .	
XII. Resumen de datos del diseño experimental para los estadios larvales de <i>E. mordax</i> .	53
XIII. Datos de crecimiento de larvas de <i>E. mordax</i> en nueve diferentes tratamientos, durante 12 días de experimentación.	56
XIV. Análisis de regresión lineal y prueba F de los datos de crecimiento de larvas de <i>E. mordax</i> .	57
XV. Análisis de covarianza para probar la homogeneidad de pendientes (tasas de crecimiento) entre original y repeticiones de los cuatro tratamientos con alimento particulado.	62
XVI. Análisis de covarianza para probar la diferencia en las tasas de crecimiento entre los cuatro tratamientos con alimento particulado.	62
XVII. Número de larvas muertas diariamente a lo largo del experimento (M), número de supervivientes (S) y totales (T) en un experimento de 12 días en el laboratorio.	66
XVIII. Datos de supervivencia no corregida de los estadios larvales de <i>E. mordax</i> , mantenidas en diferentes concentraciones de aminoácidos y alimento particulado en el laboratorio.	67
XIX. Datos corregidos de supervivencia considerando la mortalidad por pesca: número de supervivientes actuales, número de supervivientes esperado, porcentaje de supervivencia esperada y coeficiente instantáneo de mortalidad (Z) de larvas de <i>E. mordax</i> cultivadas en el laboratorio.	71

Flujo de Aminoácidos Disueltos y su Efecto sobre el Crecimiento y Supervivencia de Huevos y Larvas de la anchoveta norteña *Engraulis mordax* Girard.

## I. INTRODUCCION

La anchoveta norteña, *Engraulis mordax*, es una de las especies de peces pelágicos más abundante de la Corriente de California, y la de mayor importancia ecológica (Mais, 1974). Este organismo es la base de una pesquería que es compartida tanto por México como por Estados Unidos, se le aprovecha en la reducción de harina y aceite de pescado y como carnada viva para la pesca deportiva (Chavez et al., 1979).

Los estudios de la anchoveta norteña se iniciaron en los años 1950, como estudios incidentales a los de la sardina del Pacífico (Anon., 1983). Cuando las poblaciones de sardina desaparecieron, el objetivo de la investigación de peces pelágicos se centró sobre la anchoveta norteña. En los comienzos de los años 1960 el "National Marine Fisheries Service (NMFS)" inició un programa de investigación fisiológica, centrándose principalmente en estudios de ecología larval (Anon., 1983), con el propósito de explicar las grandes

fluctuaciones en el reclutamiento de los recursos importantes de peces marinos (Smith, 1981).

Las fluctuaciones en la fuerza de una clase anual de peces marinos con estadios larvales planctónicos, están fuertemente relacionados con la disponibilidad de alimento adecuado para las larvas, al término de la absorción del saco vitelino e inicio de la alimentación exógena (Hjort, 1914, 1926). Hjort (1914) introdujo la hipótesis del período crítico para este tiempo y lo caracterizó con una elevada mortalidad por inanición, bajo la cual se fija el éxito o fracaso de una clase anual de peces marinos. May (1974) discutió la validez de este concepto, considerando que son múltiples las variables que pueden afectar la supervivencia larval, como son los factores ecológicos y factores específicos para la especie.

Otro factor ecológico que se considera importante en la supervivencia larval es la depredación (Hunter, 1984), ya sea por invertebrados (Alvaríño, 1977, 1980) o por peces juveniles o adultos (Hunter y Kimbrell, 1980). En estudios de laboratorio y de campo se ha encontrado que el efecto de la disponibilidad de alimento se mezcla con el de la depredación. En condiciones de inanición, el éxito de los depredadores aumenta por la debilidad de su presa larval (Hunter, 1981; Cisneros Mata, 1985; Hewitt et al., 1986).

Estudios de campo han comprobado que la "deriva" larval también es un factor importante en la supervivencia y reclutamiento de huevos y larvas. Ellos son conducidos hacia zonas desfavorables del océano (fuera de la costa) principalmente por el elevado transporte de Eckman, fuertes surgencias, altos niveles de turbulencia y termoclinas profundas (Parrish et al., 1981; Lasker, 1981; Bakun, 1982; Husby y Nelson, 1982).

Es casi imposible que un sólo mecanismo explique la supervivencia larval en todos los casos. No se ha determinado en el campo la presencia o ausencia de un periodo crítico en el desarrollo ontogenético de peces marinos (May, 1974). Sin embargo, algunas evidencias sugieren que el periodo de desarrollo larval representa una etapa crítica caracterizada por baja supervivencia (Arthur, 1956) y que la disponibilidad de alimento es un factor importante para esa supervivencia (Houde, 1978).

Riley (1966) demostró que la falta de alimento afecta en gran medida a larvas de primera alimentación, y que la disponibilidad de alimento en el rango de tamaño, densidad y tipo adecuado es crítico para evitar la mortalidad (Lasker, 1975, 1978; Hunter, 1977, 1981).

El considerar que las larvas están en concentraciones

bajas de alimentación en el océano ha sido probado en experimentos de laboratorio, donde se estimó que las concentraciones mínimas para que la larva pueda sobrevivir son superiores en uno o dos órdenes de magnitud a las encontradas en el océano (O'Connell y Raymond, 1970; Lasker et al., 1970; Beers y Stewart, 1967, 1971; Hunter, 1972, 1976; Hunter y Thomas, 1974; Arthur, 1976, 1977). Sin embargo, lo anterior no se ha comprobado que suceda en el campo, ya que las curvas de supervivencia de larvas de peces colectadas en el mar han sido difíciles de interpretar y no justifican firmemente el aceptar o rechazar la existencia de un período crítico. Además, en experimentos de laboratorio, unas especies reaccionan de diferente manera ante la falta de alimento, y los parámetros de las condiciones alimenticias para una especie dada varían espacial y temporalmente (May, 1974).

Lasker (1975) demostró que la estabilidad de la columna de agua es otro factor importante en la supervivencia larval, ya que la estabilidad propicia la concentración de plancton en parches y esta concentración excede la densidad de alimento crítico para la larva encontrada en el laboratorio. Una evidencia de la importancia de estos parches, es que cuando existe poca estabilidad de éstos, por ejemplo en una tormenta, la mancha se dispersa y el alimento se diluye demasiado como para sostener la supervivencia larval (Lasker, 1975, 1981). Sin embargo, un punto que le resta importancia a los parches,

es, que las larvas de peces pelágicos de la zona costera utilizan menos del 1% de su habitat (poca movilidad) reduciendo su potencial de localización y utilización de manchas (Smith, 1981; Rodríguez Murillo, 1983).

Por lo anterior, se han considerado fuentes alternas de alimento que puedan cubrir los requerimientos energéticos de la larva, como pudieran ser los microflagelados en concentraciones altas y el microzooplancton en concentraciones bajas (Lasker et al., 1970; Theilacker y McMaster, 1971; Howell, 1973; Scura y Jerde, 1977; Carrillo Barrios-Gómez y Solís Guevara, manuscrito; Rodríguez Murillo, 1983). Otra posible fuente alternativa de alimento es la Materia Orgánica Disuelta (MOD) disponible en el océano, idea planteada originalmente por Putter en 1909 (Jorgensen, 1976; Stephens, 1982), el argumentó que la MOD juega un importante papel en la nutrición de la mayoría de los organismos acuáticos, ya que la MOD se encuentra en grandes cantidades en el mar (Jorgensen, 1976), de la que los aminoácidos solo representan el 1 o 2%.

Sin embargo, dentro de la ecología alimenticia de larvas de peces, sólo se ha considerado a la materia particulada como única fuente energética (Lasker, 1975, 1978; Hunter, 1977; Scura y Jerde, 1977) por este motivo, uno de los propósitos de este trabajo es el de probar si la materia orgánica disuelta constituye otra posible fuente energética adicional para los

estadios tempranos de la anchoveta norteña , ya que no existen estudios precedentes sobre el flujo y efecto de los aminoácidos en el crecimiento y supervivencia de larvas de peces.

## I.1 Antecedentes

La Materia orgánica disuelta (MOD) constituye la parte predominante del total de materia orgánica, viva y muerta, encontrada en el océano. El total de la MOD en el océano es de aproximadamente  $1.5 \times 10$  gramos y esta cantidad puede ser igualada a la producción de fitoplancton de 30 años (Jorgensen, 1976). Krogh (1934a) estimó que la cantidad total de la MOD en el océano era al menos 300 veces más grande que la cantidad presente en todas las clases de organismos marinos. Josefsson (1973) en un estudio de diez años estimó que del total de materia orgánica en el océano, las sustancias orgánicas disueltas representan el 89% , el detritus particulado el 9% , el fitoplancton el 2% , el zooplancton el 0.2% y los peces el 0.002%. La MOD en el océano varía con respecto a su concentración total, su composición, las proporciones relativas de sus componentes individuales, localización geográfica, profundidad del agua, estación del año y la presencia y estado fisiológico de microbios, plantas y animales (Siebers, 1982). La MOD es generalmente expresada como carbono orgánico disuelto; en capas superficiales del mar, el rango de sus valores puede ir de 0.5 a 5 mg/l (Josefsson, 1973; Williams, 1975). Los aminoácidos sólo representan el 1 o 2 % del total de MOD , constituyendo el resto las sustancias siguientes: nitrógeno orgánico disuelto de 0.04 a 0.54 mg/l (Duursma,

1961), los carbohidratos, como glucosa y manosa, de 5 a 18 ug/l, y los ácidos grasos entre 10 y 40 ug/l ( Jorgensen, 1976).

Se han hecho varios estudios en diferentes áreas del océano para calcular la concentración de aminoácidos, encontrando , por ejemplo, valores de 33 a 77 ug/l en la Buzzards Bay, Mass., E.U.A. ( Siegel y Degens, 1966). En aguas costeras y estuarinas. North (1975) y Lee y Bada (1977) encontraron valores de 0.2 a 2.0  $\mu\text{M}$  . Henrichs y Farrington (1979) encontraron en aguas intersticiales de sedimento costero valores de 14 a 17  $\mu\text{M}$  . Dengens et al.(1964) encontraron en aguas oceánicas de las costas de California valores de aminoácidos totales de 16 a 125 ug/l según la profundidad. Clark et al.(1972) encontraron en la Jolla, California valores de 115 a 170 ug/l. Siebers (1982) encontró valores de 0.5 a 2 ug/l , argumentando que este nivel puede variar grandemente en cortos periodos, aunque el promedio general fue constante.

Indudablemente la MOD en los ecosistemas marinos debe representar una gran fuente de potencial energético para los organismos adaptados a la toma de estos compuestos de soluciones diluidas. El suplemento de energía proporcionado por la MOD para larvas de bivalvos puede ser más importante que para adultos, ya que la larva está provista con minimas reservas de alimento por los padres, las cuales pueden pasar

grandes periodos sin alimento particulado (Manahan y Crisp, 1982).

La importancia atribuida a la materia orgánica disuelta como posible fuente de alimento para organismos acuáticos ha tenido numerosos cambios desde 1900. Entre las primeras investigaciones hechas sobre MOD se encuentra la de Putter (Jorgensen, 1976; Stephens, 1982). Su objetivo era demostrar la parte que jugaban las sustancias orgánicas disueltas en los procesos fisiológicos de animales marinos, observando que la concentración de plancton era muy pequeña en comparación con la MOD. Esto lo motivó a realizar algunos análisis con respecto a la cantidad energética producida por el plancton y la obtenida de la MOD. Considerando que el metabolismo de los organismos está basado sobre la oxidación del alimento, Putter concluyó que los organismos tendrían que filtrar una cantidad exagerada de agua para poder obtener del plancton sus requerimientos energéticos y que, sin embargo, filtrando un volumen menor de agua conteniendo MOD se podría equilibrar este gasto energético. Como conclusión, planteó la hipótesis de que las sustancias orgánicas disueltas podrían constituir el principal nutrimento para organismos del plancton (Duursma, 1961; Jorgensen, 1976; Stephens, 1982).

Las ideas planteadas por Putter fueron atacadas por Krogh (1934a y b), quien, estudiando la MOD, encontró que la

propuesta de Putter era incorrecta pues las técnicas desarrolladas hasta ese momento para la detección de la MOD no eran muy sensibles de acuerdo con él; la MOD había sido sobreestimada y los arrastres de plancton habían sido subestimados al no utilizar una red adecuada.

En trabajos posteriores y con técnicas más sensibles para la detección de pequeñas cantidades de MOD se dispone de una extensa literatura relacionada con la absorción de sustancias orgánicas disueltas y su posible papel nutritivo (Jorgensen, 1976). Todos estos trabajos fueron realizados exclusivamente sobre invertebrados marinos tanto larvas como adultos, como las esponjas, celenterados, bivalvos, braquiopodos, poliquetos, crustáceos y equinodermos (Jorgensen, 1976). Stephens y Schinske (1958, 1961), en estudios de 35 especies incluyendo la Phyla Porifera, Cnidaria, Ectoprocta, Anélida, Sipunculida, Mollusca, Equinodermata, Hemicordata, Tunicata y Artrópoda, observaron que todos, excepto los artrópodos, llevan a cabo procesos de absorción de glicina y otros aminoácidos del medio en concentraciones de hasta 2  $\mu\text{M}$ .

Davis y Stephens (1983), estudiando al protozoario ~~Tetrahymena~~ *Tetrahymena pyriformis*, detectaron entrada de material radioactivo a la célula pero, a la vez, en un análisis de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), notaron que el aminoácido leucina fue liberado al medio, posiblemente debido a

un gran gradiente de concentraci3n. En un estudio de la absorci3n e incorporaci3n de glicina marcada por larvas de bivalvos, ( veligers, pediveligers y larvas de ostras y mejillones), Manahan y Crisp (1983) encontraron que este material es absorbido de soluciones de 1 uM, detect3ndolo primeramente en el velum de los organismos y luego en otros 3rganos. En un estudio con larvas de *Dendraster excentricus* (galleta de mar), Davis y Stephens (1984a), encontraron que las larvas absorvieron con mayor rapidez amino3cidos neutrales y en un menor grado amino3cidos b3sicos y 3cidos analizados con HPLC. En el mismo trabajo, ellos estudiaron la incorporaci3n de leucina marcada a larvas de la misma especie, encontrando que 3sta se incorpor3 al organismo en un 88 a 90%, en prote3nas el 48% y en amino3cidos libres el 25%. En larvas del erizo de mar, *Stroglyocentrotus purpuratus*, Davis y Stephens (1984b), encontraron que 3stas removieron 14 amino3cidos de una soluci3n muy diluida , produciendo un incremento en la concentraci3n interna de amino3cidos libres cuando las larvas fueron incubadas en agua sint3tica. En cambio, cuando fueron incubadas en serina, la tasa de entrada de material marcado decreci3 comparada con los controles no incubados. Siebers y Rosenthal (1977) encontraron absorci3n de amino3cidos por huevos del arenque *Clupea harengus*, observando que 3sta aument3 con el desarrollo ontog3netico del huevo , con valores de  $0.6 \pm 0.1$  pM/huevo/hora en embriones de cinco horas despu3s de la fertilizaci3n, hasta un valor m3ximo de  $18.8 \pm 2.7$

pM/huevo/hora en huevos de 250 horas.

Los huevos de teleosteos presentan una cubierta semirígida llamada corión, el cual es permeable al agua y solutos de bajo peso molecular (Lasker y Thailacker, 1962; Potts y Rudy, 1969) y contiene un líquido o fluido perivitelino que le sirve de reserva, conteniendo variadas cantidades de aminoácidos libres. Holleland y Fyhn (1986) encontraron que de la concentración inicial de aminoácidos libres de 95 nM/huevo encontrada los primeros días del desarrollo, ésta disminuyó a 68 nM/huevo para los días siete a diez después de la fertilización en huevos de *Clupea harengus*. Ellos consideraron que esta pérdida de osmolitos ocurre de forma natural dentro del desarrollo de este pez. Lasker y Theilacker (1962) encontraron que al transferir huevos de *Sardinops caerulea* de agua de mar al agua destilada, casi todas las sustancias disueltas se difundieron al medio en tres y media horas. En consecuencia, se puede considerar que el tejido embrionario por lo general está en contacto directo con el fluido perivitelino muy similarmente al medio en el cual los huevos son incubados (Holliday, 1969). Shanklin (1959) encontró que el fluido perivitelino de huevos de *Fundulus* sp. establece un rápido equilibrio con la solución del medio que los rodea. Holleland y Fyhn (1986) encontraron que este fluido se equilibra con el medio en diez minutos en huevos de *Clupea harengus*. La piel de las larvas de peces teleosteos está formada de un epitelio de dos capas en la superficie exterior,

la cual es incrementada por una serie de salientes ( Lasker y Threadgold, 1968), es por esta extensa superficie que tienen lugar los movimientos iónicos y osmóticos (Shelbourne, 1957).

Gomme (1982) en una revisión bibliográfica sobre un análisis comparativo de la absorción de nutrientes en invertebrados concluyó que la significancia biológica de la MOD se puede encontrar en tres niveles. El primero, en el sistema de transporte apical, donde la MOD puede servir para mantener la concentración diferencial de nutrientes entre el organismo y el medio y por lo tanto impide una pérdida difusional del organismo. El segundo, en el que el transporte sólo provea beneficios a la epidermis sin tener ningún beneficio para tejidos profundos y por lo tanto la regulación del volumen de las células epiteliales. El último, en el que el organismo completo obtiene un beneficio nutricional de la MOD.

El papel importante que juegan las sustancias orgánicas disueltas dentro de la biología animal ha sido revisada por Lucas (1949, 1961 a y b). El sugirió que la adaptación de los organismos a los metabolitos excretados es un factor crítico en la ecología y la evolución. Se sostiene que la liberación de metabolitos es importante como mediador entre las interrelaciones en la comunidad (Lucas, 1961 b) y por lo tanto, la MOD puede actuar directa o indirectamente sobre organismos vivientes y afectar la dinámica de integración dentro de un

ecosistema. Las células pueden liberar ciertos metabolitos que influyen a otras células. Estos metabolitos son evidentes en forma de hormonas, estimulantes de crecimiento, toxinas, antibióticos, organizadores embriológicos, agentes de quimiosíntesis y otros (Saunders, 1957).

## I.2. Objetivos

a) Determinar si hay asimilación de aminoácidos por huevos y larvas vitelinas de la anchoveta norteña.

b) Determinar si los aminoácidos tienen algún efecto en la supervivencia y crecimiento de huevos y larvas de la anchoveta norteña aunado a concentraciones subóptimas de alimento para la especie.

## II. MATERIALES Y METODOS

### II.1 Obtención de Huevos y Método de Separación

Los huevos de *E. mordax* fueron proporcionados por personal del National Marine Fisheries Service de la Jolla California, E.U. El desove de la anchoveta fue realizado siguiendo las técnicas descritas por Leong (1971).

Los huevos fertilizados fueron transportados en un contenedor térmico el mismo día de su desove de la Jolla, Ca. al laboratorio de Ecología Pesquera del CICESE en Ensenada, B.C., México, para los experimentos de crecimiento y supervivencia, y al laboratorio de Biología Celular y Desarrollo de la Universidad de California, Irvine, para los experimentos que correspondieron a los análisis bioquímicos. Para evaluar su condición, los huevos aparentemente viables (transparentes) fueron separados con goteros de boca ancha bajo un microscopio estereoscópico.

### II.2 Experimentos con Aminoácidos Marcados con Carbono 14

Las técnicas empleadas en la sección de análisis bioquímicos siguieron los métodos descritos por Davis y Stephens (1984a). Los huevos usados en esta sección fueron de 24 horas después del desove y las larvas de 24 - 30 horas después de la eclosión.

## II.2.1 Cambios en la Concentración de Alanina

### Marcada ( $^{14}\text{C}$ ) del Medio

Se separaron y colectaron 2000 huevos o larvas viables en un tamiz de luz de malla de 75 micras. Para eliminar bacterias presentes en la superficie del corión o cuerpo se lavaron tres veces con agua de mar estéril (Cavanaugh, 1956). Cada experimento fue realizado con cinco repeticiones, cada una conteniendo 400 huevos o larvas vitelinas/20 ml de una solución de agua de mar artificial (Cavanaugh, 1956) agregando 0.5  $\mu\text{M}$  de alanina  $^{12}\text{C}$  (sigma Ca.) y 0.5  $\mu\text{Ci}$  de alanina  $^{14}\text{C}$  (Ul, New England Nuclear) en 100 ml. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ( $21 \pm 1$   $^{\circ}\text{C}$ ) y a una salinidad de 35 ppm.

El cambio en la concentración de alanina marcada del medio fue determinada cada 30 minutos por mediciones de la radioactividad que permanecía en el medio durante un período de tres horas. Muestras del medio de 250 microlitros fueron removidas y puestas en viales de centelleo a los cuales se les agregó 4.5 ml de Acuasol (New England Nuclear). El Acuasol fue acidificado con una gota de HCl al 0.1 N para producir la volatilización de cualquier  $\text{CO}_2$  marcado en la solución que pudiera contribuir en los conteos de centelleo. La radioactividad fue detectada con una contadora de centelleos en

líquido Beckman LS 3801.

## II.2.2 Cálculo del Flujo de Alanina Marcada ( $^{14}\text{C}$ ) en Huevos y Larvas

Después de la determinación de la radioactividad que permanecía en el medio, huevos o larvas vitelinas fueron colectadas por filtración sobre un filtro Whatman GF/C mediante una bomba de vacío. Los filtros fueron colocados dentro de viales de centelleo y se les agregó 4.5 ml de Acuasol. La radioactividad en el tejido de huevos o larvas fue determinada con la contadora de centelleo. La entrada de alanina marcada (pM/mg/hora) fue calculada tanto con los centelleos detectados en el medio (cada 30 min), como con los centelleos detectados en el tejido (después de tres horas de incubación) mediante las ecuaciones siguientes:

Para el tejido :

$$\frac{\text{DPMf}^*/\text{T}}{\text{DPMi}/[\text{ala}] \quad (\# \text{ de organismos})} \quad (1)$$

Donde

DPMf\* = Desintegraciones por minuto detectadas en el tejido después de tres horas de incubación .

DPMi = Desintegraciones iniciales por minuto en el medio.

[ala]= Concentración de alanina de la solución

T = Tiempo en minutos

Para el medio:

$$\frac{(DPM_i - DPM_f) / T}{DPM_i (\# \text{ de organismos})} * [ala] (Vt) \quad (2)$$

Donde:

DPM<sub>i</sub> = Desintegraciones iniciales por minuto en el medio.

DPM<sub>f</sub> = Desintegraciones finales por minuto en el medio.

T = Tiempo en minutos.

V<sub>t</sub> = Volumen total de la solución

[ala] = Concentración de alanina de la solución.

### II.3 Experimentos con Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC High Performance Liquid Chromatography).

El flujo neto de aminoácidos entre huevos o larvas y el medio fue determinado usando la HPLC. Se utilizaron 1000 huevos o larvas vitelinas en 100 ml de agua de mar estéril (10/ml), conteniendo una mezcla de 12 aminoácidos: (ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser), glicina (Gly), triptófano (Try), arginina (Arg), taurina (Tau), alanina (Ala), valina (Val), fenilalanina (Phe), leucina (Leu), e isoleucina (Iso)), cada uno a una concentración inicial de 0.25 μM que sirvió como punto de referencia para conocer si la concentración de éstos variaba con respecto al tiempo. Esta posible variación puede indicar el flujo entre los aminoácidos del medio y el tejido. Los análisis de HPLC son descritos en Davis y Stephens (1984a). Se emplearon las mismas técnicas

descritas anteriormente para la separación y limpieza de los organismos. Cada experimento se llevó a cabo por un periodo de tres horas, tomando una muestra de un mililitro cada 60 minutos. En el caso de los huevos, fue necesario colocarlos en un agitador mecánico para evitar que se pegaran unos con otros y disminuir el área de contacto con la solución.

La concentración de cada aminoácido estuvo representada como un pico en el cromatograma, y fue analizada de la siguiente forma:

$$[A.A. x]_t = \frac{\text{Area } x, t}{\text{Area Estandar}} * [A.A. x]_i \quad (3)$$

Donde:

- [A.A. x]<sub>t</sub> = Concentración del aminoácido x, al tiempo t.  
 Area x, t = Área del cromatograma ocupada por el aminoácido x al tiempo t.  
 Area Estandar = Área del cromatograma ocupada por el estándar del aminoácido x.  
 [A.A. x]<sub>i</sub> = Concentración inicial del aminoácido x.

El flujo de los aminoácidos se calculó a partir de la pendiente de curva, la que dará positivo si los aminoácidos salieran del organismo y negativa si entraran.

Fue necesario hacer una corrección a los datos obtenidos de la concentración de alanina marcada que permanecía en el medio durante las tres horas de experimentación, debido a que

la actividad específica de la alanina marcada ( $^{14}\text{C}$ ) disminuyó por la salida de alanina sin marcar de las larvas vitelinas, este último dato fue obtenido de los análisis de HPLC. Las correcciones se hicieron de la manera siguiente:

$$\text{STA } [^{12}\text{C}] = \frac{(\text{TSA } [^{12}\text{C}]) * 400 \text{ larvas}}{20 \text{ ml}} \quad (4)$$

$$\text{SNC} = [\text{EA } [^{14}\text{C}] \text{ NC}] \text{ tx} + \text{STA } [^{12}\text{C}] \quad (5)$$

$$\begin{aligned} \text{EA } [^{14}\text{C}] \text{ C} &= 20000 \text{ DPM } [\text{SNC}] \text{ tx} * 250 \text{ ul} \quad (6) \\ &= [\text{DPM/nM}] \text{ t} = 100\% \text{ de radioactividad en el medio.} \end{aligned}$$

Donde:

STA [ $^{12}\text{C}$ ] = Salida total de alanina sin marcar.

TSA [ $^{12}\text{C}$ ] = Tasa de salida de alanina sin marcar.

SNC = Salida neta corregida.

EA [ $^{14}\text{C}$ ] NC = Entrada de alanina marcada no corregida.

EA [ $^{14}\text{C}$ ] C = Entrada de alanina marcada corregida

tx = Tiempo x... x = 0 a 180 minutos.

Con los datos de la salida total y entrada y salida neta corregidos para larvas, se hicieron los cálculos necesarios para conocer las pendientes respectivas y con estos datos determinar la tasa de salida total, entrada y salida neta. Los cálculos fueron hechos de la siguiente manera:

$$\text{Tasa} = \frac{b T V}{\# \text{ de larvas}} \quad (7)$$

Donde

b = pendiente de la regresión entre concentración y tiempo.  
 T = tiempo (60 minutos)  
 V = volumen de muestra (20 ml).

#### II.4 Asimilación de Alanina Marcada ( $^{14}\text{C}$ ) y Análisis de la Composición de Aminoácidos Libres de Huevos y Larvas Vitelinas.

Se colocaron 200 huevos o 400 larvas (dos repeticiones) en un matraz que contenía 20ml de agua de mar artificial estéril y una mezcla de 0.5  $\mu\text{M}$  de alanina  $^{12}\text{C}$  y 0.1  $\mu\text{Ci}$  de alanina  $^{14}\text{C}$ . Después de tres horas de incubación los huevos o larvas fueron filtrados como se describió previamente. Para precipitar proteínas a los huevos y larvas se les agregó 2 ml de tricloroacético (TCA) frío al 5% por una hora, después de la cual fue separado el sobrenadante. Después de haber separado el sobrenadante, el material precipitado (proteínas), fue lavado

con agua de mar estéril y se le agregó 4.5 ml de Acuasol. La radioactividad fue detectada con una contadora de centelleo. Los cálculos para conocer la cantidad de  $^{14}\text{C}$  incorporado o asimilado a huevos o larvas se hicieron mediante la ecuación siguiente:

$$\frac{\text{DPMi}}{\text{Vm}} * \text{Vt} \quad (\text{R}) \quad (8)$$

Donde:

- DPMi = Promedio de desintegraciones iniciales por minuto.  
 Vm = Volumen de la alícuota para el conteo.  
 Vt = Volumen total del experimento.  
 (R) = Porcentaje de  $^{14}\text{C}$  total removido del medio por los organismos después de tres horas.

Para conocer la composición de los aminoácidos libres en huevos y larvas se usó una alícuota de 800 ul de la muestra del sobrenadante del TCA más 200 ul de O-phthaldialdehído (OPA), y se realizó un análisis de HPLC, siguiendo los métodos de Davis y Stephens (1984a).

## II.5 Experimentos de Crecimiento y Supervivencia

### a) Sistema de Cultivo

En todos los experimentos se utilizaron tanques cilíndricos de plástico color negro de 34 centímetros de diámetro y 14 cm de altura (Lasker et al. 1970). Estos

tanques se llenaron con diez litros de agua de mar filtrada hasta 0.2 micras. Se introdujeron 200 huevos a cada uno de ellos, manteniendo un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 oscuridad. La temperatura se mantuvo en  $17 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$  y se midió con un termómetro  $0-100^{\circ}\text{C}$ . La salinidad se mantuvo cerca de  $33.5 \pm 1$  ppm, medida con un refractómetro. El oxígeno y el pH se midieron con un aparato Orion Research Microprocessor Ionalyzer/901. Todos los parámetros fueron medidos una vez al día.

Se utilizó una mezcla de diez aminoácidos (Ala, Tyr, Phe, Lys, Iso, Glu, Asp, Ser, Gly, Met) marca Sigma en concentraciones de 1, 16 y 40  $\mu\text{g/l}$  para los diferentes tratamientos. La concentración final realmente fue mayor a la designada si se consideran las sustancias disueltas que ya venían en el agua de mar filtrada. No obstante, esto fue constante para todos los experimentos. La concentración de los aminoácidos en los tanques no se monitoreó a lo largo del experimento.

#### b) Diseño Experimental

El diseño experimental se resume en la Tabla I. Los tratamientos 1A y 1B pueden considerarse como "CONDICIONES DE INANICION"; los tratamientos 2B, 3B y 4B pueden considerarse como "CONDICIONES TEORICAS DE INANICION" y los tratamientos 5B, 6B, 7B y 8B pueden considerarse como "CONDICIONES MINIMAS DE ALIMENTACION". Cada experimento se llevó a cabo por



triplicado.

c) Alimento Particulado

El alimento particulado, nauplios de copepodo principalmente, fueron colectados por medio de arrastres en la Bahía de Todos Santos, Ensenada, B.C., México, utilizando una red de plancton de 30 cm de diámetro y luz de malla de 239 micras y utilizando métodos convencionales de muestreo de zooplancton.

Las muestras obtenidas fueron tamizadas a bordo con una luz de malla Nytex de 120 micras para remover los organismos que pudieran depredar a la fracción de muestra necesitada. A su llegada al laboratorio la muestra se tamizó nuevamente con la misma malla de 120 micras y se colocó en agua de mar filtrada y tratada con luz ultravioleta, agregándoseles una concentración de 5000 cél/ml de *Tetraselmis* sp. Se les mantuvo en un recipiente de 50 litros con aereación y se les agregó una solución de penicilina G, dando una concentración final de 6 (Neunes y Pongolini, 1965).25 mg/l, para evitar crecimiento bacteriano. Para la alimentación en la segunda semana se cultivaron rotíferos siguiendo los métodos de cultivo de Hunter (1983).

La concentración de microzooplancton en los tanques se midió una vez al día tomando una alícuota de 5 ml de tres

niveles del tanque: superficial, medio y profundo. Se analizaron los 15 ml con un microscopio estereoscópico y una cámara de conteo (Rodríguez Murillo, 1983 ).

El nanoflagelado *Tetraselmis* sp fue cultivado y mantenido en el laboratorio según métodos tradicionales de cultivo de fitoplancton (Ukeles, 1965). Para el análisis de la concentración de fitoplancton se siguió el mismo método que para microzooplancton, sólo que en este caso se revisó una alícuota de 1 ml (Rodríguez Murillo, 1983) con un hematócrito Fuchs-Rosenthal, técnica descrita por Corkett y Urry (1968). Se trató de mantener una concentración de 5000 cél/ml.

#### II.5.1 Crecimiento

Tres a cinco larvas fueron colectadas con una pipeta y sus longitudes fueron medidas con un microscopio estereoscópico equipado con un micrómetro ocular, el cual fue calibrado con un micrometro de etapa marca 'Zeiss' de  $1 \pm 0.01$  mm, midiéndolas desde la extremidad de la maxila hasta el final del notocordio (longitud estandar). Se tomaron al azar de cada tanque los días 0,3,5,7,9,11 y 12 después de la eclosión.

La tasa de crecimiento fue obtenida por medio de una regresión lineal de la longitud de las larvas contra los días

después de la eclosión. La linealidad y pendiente se probaron con la prueba F del análisis de varianza (Sokal y Rohlf, 1979). Los datos fueron transformados a Logaritmo natural y luego a logaritmo base diez y sometidos a un análisis de covarianza para encontrar posibles diferencias en las tasas de crecimiento entre las repeticiones, entre los tratamientos y entre el tratamiento de agua sintética y agua de mar. Los valores medios fueron comparados usando la prueba de comparación múltiple de Newman y Keuls con un alfa de 0.05 (Sokal y Rohlf, 1979).

Para realizar los análisis estadísticos se utilizaron los programas contenidos en las librerías Esims1 y Minitab, disponibles en la computadora Prime 400 del Centro de Cómputo del CICESE.

#### II.5.2 Supervivencia

Las larvas muertas fueron removidas de los tanques y contadas diariamente entre las 18 00 y 20 00 horas con una pipeta y ayuda de una lámpara. Las larvas se consideraron muertas al presentar una coloración blanco opaco y no responder a estímulos táctiles. Los experimentos concluyeron hasta el doceavo día.

La supervivencia fue determinada siguiendo el

planteamiento de O'Connell y Raymond (1970) resumido en la siguiente expresi6n:

$$S_n = \left( P - \sum_{i=1}^n M_i / P \right) * 100 \quad (9)$$

Donde:

$S_n$  = % de la poblaci6n que sobrevive hasta el d'ia n.

P = Poblaci6n inicial.\*

M = Mortalidad el d'ia i , i= 1,2,3,...n.

\* Se consider6 como poblaci6n inicial la suma de las larvas que murieron cada d'ia a lo largo del experimento m'as las sobrevivientes en cada tanque, tomando en cuenta el porcentaje de eclosi6n para cada uno de los desoves.

Para compensar las larvas removidas para el crecimiento, se sigui6 el planteamiento de Warner y Blaxter (1980) calculando una supervivencia esperada, la cual incluye las larvas vivas al final del experimento y las larvas que pudieron sobrevivir si ellas no hubieran sido sacadas para

determinaciones de crecimiento, siguiendo la expresi6n:

$$a = m + n - mn \quad (10)$$

$$n = \frac{a - m}{1 - m} \quad (11)$$

Donde:

- a = Tasa del % de mortalidad total
- m = Tasa del % de mortalidad atribuida por determinaciones de crecimiento.
- n = Tasa del % de mortalidad esperada si el muestreo no hubiera ocurrido.
- 1-n = % de supervivientes esperados.

El coeficiente instant6neo de mortalidad (Z) fue calculado siguiendo la relaci6n descrita en Warner y Blaxter (1980):

$$\frac{Z = \ln N_0 - \ln N_f}{t} \quad (12)$$

Donde:

- N<sub>0</sub> = N6mero de larvas totales
- N<sub>f</sub> = N6mero esperado de supervivientes
- t = Tiempo (12 d6as).

## III. RESULTADOS

## III.1.1 Huevos Marcados con Carbono 14

No se encontró una evidencia clara de la entrada de alanina marcada durante las tres horas de incubación, aunque se observó un decremento de radioactividad en el medio de 3.3% +/- 3.4% (Tabla II, Fig.1).

No hubo una evidencia clara de entrada de material marcado en base al nivel de radioactividad en los huevos. Después de tres horas de incubación, menos del 1% del total de radioactividad del medio fue detectada en los huevos.

Tabla II. Desintegraciones por minuto (DPM) de alanina marcada de muestras del medio durante tres horas de experimentación con huevos de *E. mordax*.

Tiempo (min)	Repeticiones				
	1	2	3	4	5
0'	11575.55	9854.29	10685.32	10209.00	9543.81
30'	9807.62	10227.00	9944.76	10159.00	10040.00
60'	10375.00	10136.00	9917.14	9985.71	9708.57
90'	10335.00	9911.43	10324.00	10352.00	9949.52
120'	10241.00	10044.00	10124.00	10193.00	9923.81
150'	10062.00	10015.00	10009.00	10039.00	9843.81
180'	9848.57	10035.00	9991.43	10133.00	9903.81
% de cambio 0-3 horas	14.9%	-1.8%	6.5%	0.7%	-3.8%
Promedio total	X = 3.3. +/- 3.4 %				

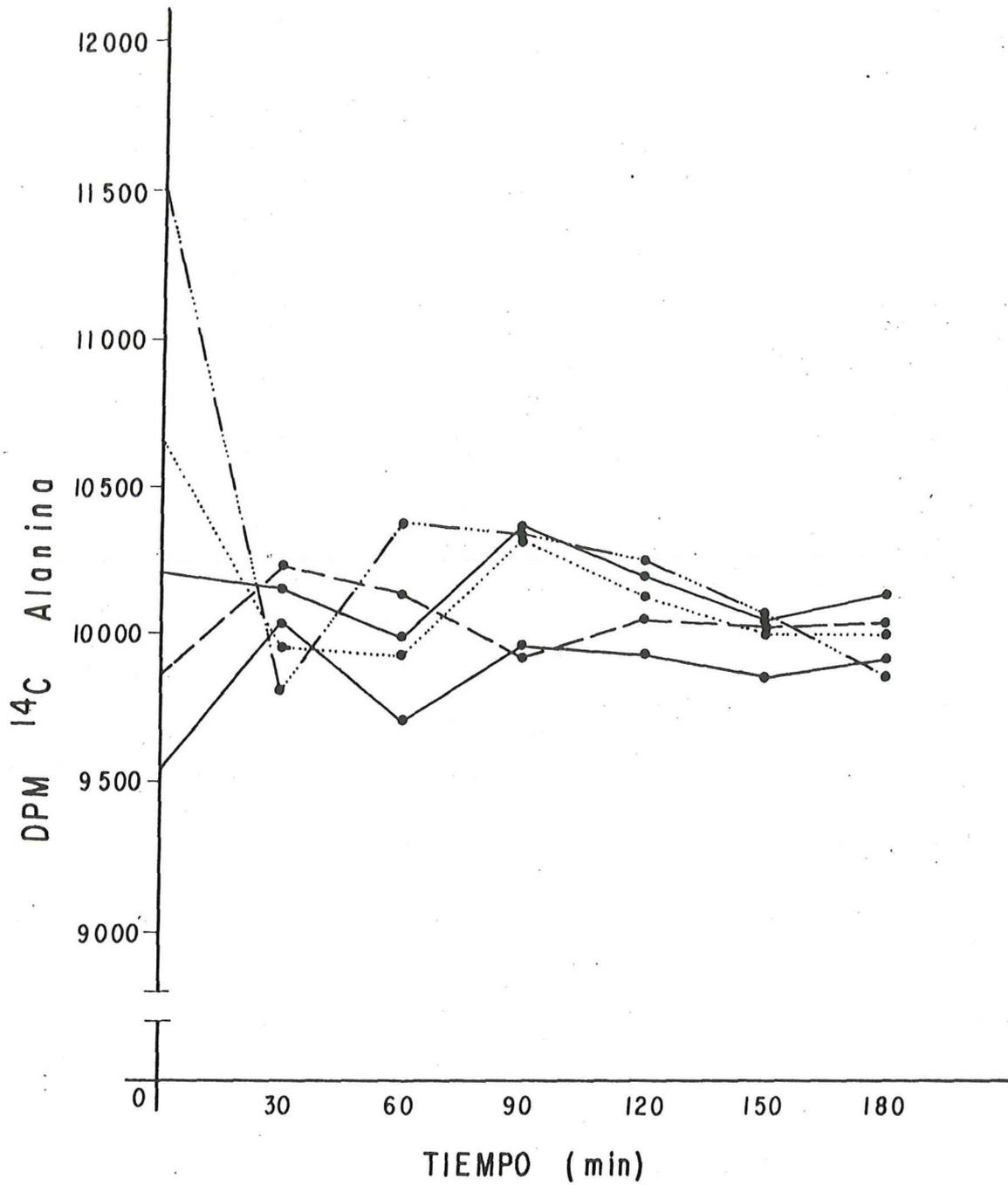


Fig. 1.- Desintegraciones de alanina marcada ( $^{14}\text{C}$ ) por minuto de muestras del medio durante tres horas de experimentación con huevos de Engraulis mordax para las cinco repeticiones.

### III.1.2 Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC) en Huevos

En las figuras 2 A,B,C y D se presentan los cromatogramas del HPLC. Comparando las concentraciones del mismo aminoácido con el tiempo, la salida de aminoácidos de los huevos durante el periodo de incubación puede ser vista claramente en la Tabla III. El número total de aminoácidos del medio se incrementó de 12 a 17, con la aparición del ácido aspártico (Asp), glutamina (Gln), tirosina (Tyr), metionina (Met), y lisina (Lys). El flujo para los 17 aminoácidos presentes estuvo en un mínimo de 3.87 pM/huevo/hora para el ácido glutámico y una salida máxima de 56.84 pM/huevo/hora para la isoleucina; la concentración de este aminoácido en el medio aumentó de 250 a 1977 nM al final de las tres horas de incubación (Tabla III). Sumando el total de aminoácidos el flujo total fue de 365.29 pM/huevo/hora (Tabla III, Fig. 3).

### III.2 Larvas vitelinas

#### III.2.1 Cambio en la Concentración en el Medio de Alanina Marcada

Hubo entrada de material marcado a la larva, en un 33.4% del que se encontró presente en el medio al inicio del experimento (Tabla IV, Fig. 4). La figura cuatro presenta el porcentaje de material marcado removido del agua por la larva con una pendiente de  $-0.22$  ( $r = 0.95$ ).

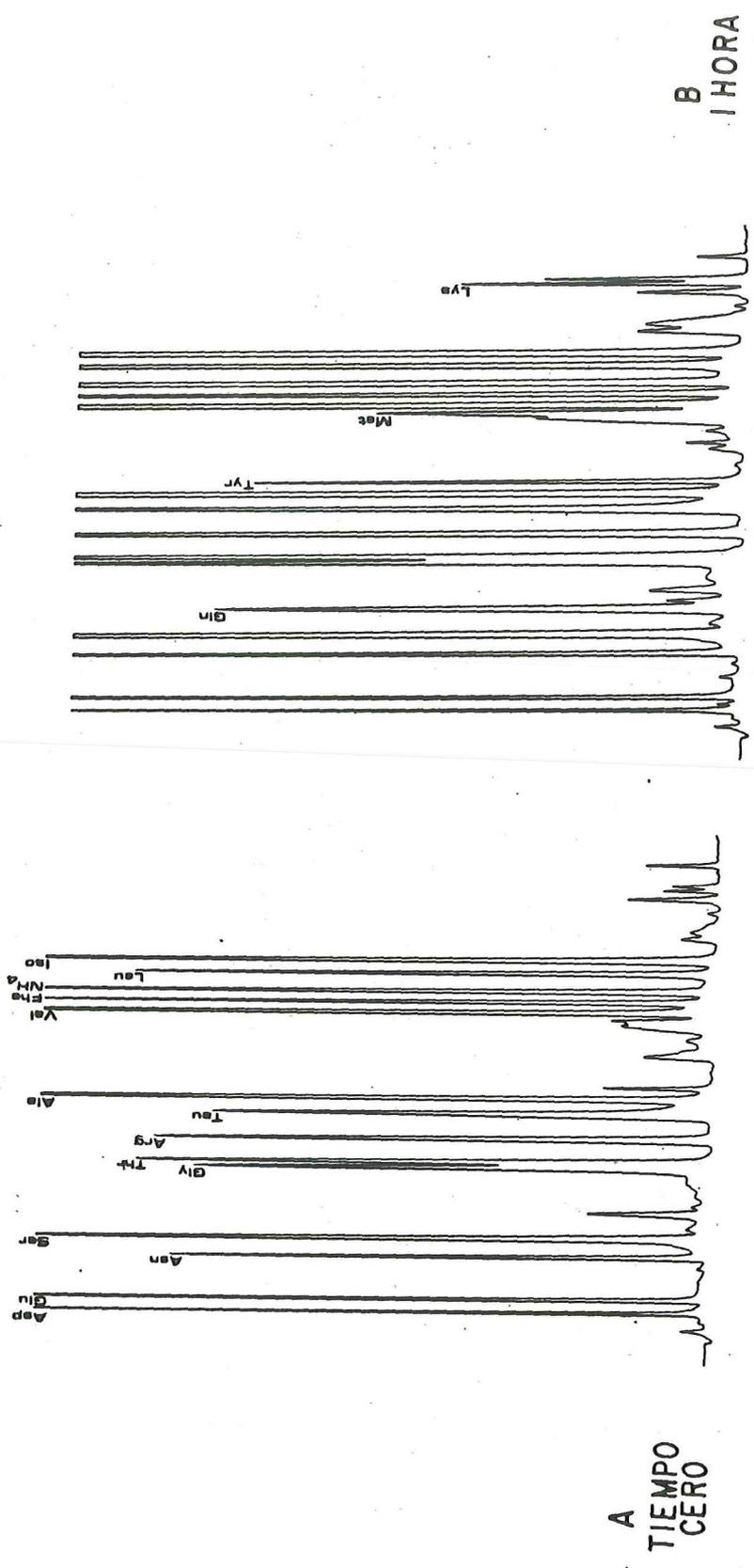


Fig. 2.- Cromatogramas de HPLC de una mezcla de 12 aminoácidos a una concentración de 0.25  $\mu$ M cada uno, con huevos de E. mordax. A: A tiempo cero, B: Después de incubarlos por una hora.

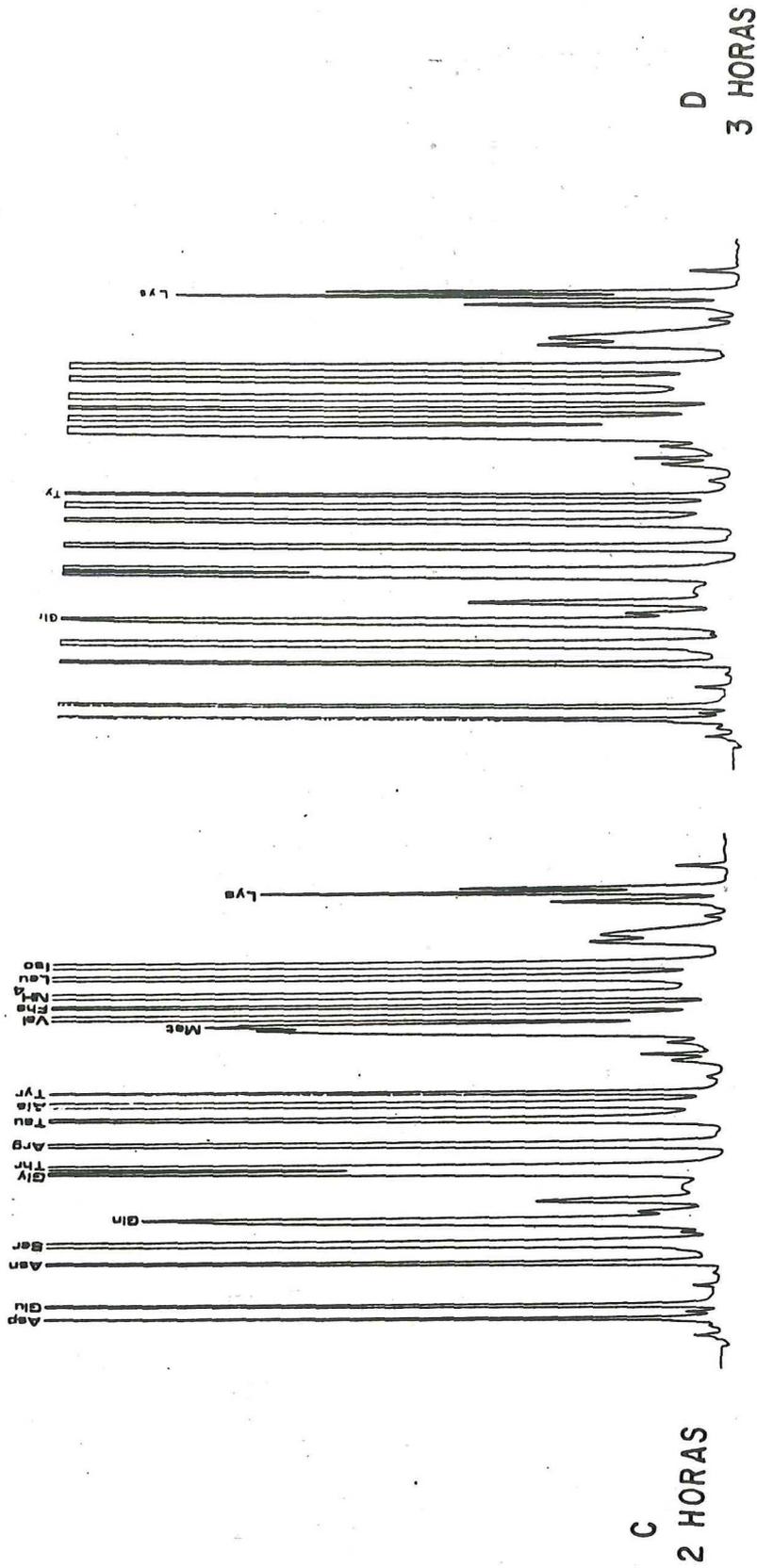


Fig. 2.- Cromatogramas de HPLC de la concentración de aminoácidos en el medio con huevos de E. mordax. C: Después de dos horas de incubación, D: Después de tres horas, con un total de 17 aminoácidos en el medio.

Tabla III. Concentraci6n y flujo total de cada aminoácido durante tres horas de experimentaci6n con huevos de *E. mordax*.

A. A.	0 (min)	60 (min)	120 (min)	180 (min)	Tasa de Salida (pM/huevo/hora)
Asp	0	162.2	208.2	259.3	8.24
Glu	250	274.6	318.0	364.7	3.87
Asn	250	372.9	458.9	485.8	7.93
Ser	250	667.7	914.2	1001.4	25.00
Gln	0	267.9	406.9	456.4	15.08
Gly	250	450.5	559.8	608.0	11.83
Thr	250	524.6	660.5	728.2	15.70
Arg	250	557.0	710.7	782.0	17.50
Tau	250	349.4	366.1	446.1	6.05
Ala	250	1011.6	1361.5	1640.9	45.20
Tyr	0	183.7	269.4	346.1	11.24
Met	0	404.9	374.8	-	18.74
Val	250	986.1	1412.5	1722.4	48.44
Phe	250	424.0	531.8	643.0	12.87
Leu	250	661.4	961.5	1156.6	30.20
Iso	250	1142.1	1645.0	1977.0	56.84
Lys	0	464.4	764.9	918.5	30.56
Total					365.29

Tabla IV. DPM de alanina marcada detectados en muestras del medio durante tres horas de experimentaci6n con larvas vitelinas de *E. mordax*.

Tiempo (min)	Repeticiones				
	1	2	3	4	5
0'	5560.00	5489.73	5601.67	5276.41	5655.56
30'	5498.38	5471.35	5629.44	4798.00	5402.63
60'	5084.50	5088.00	5181.54	4693.50	4952.50
90'	4740.00	4762.00	4842.00	4481.00	4165.50
120'	4390.00	4046.50	4340.50	4429.00	3836.00
150'	3895.00	3617.50	3850.50	3921.00	3395.50
180'	3867.00	3469.00	3975.00	3330.00	3404.00

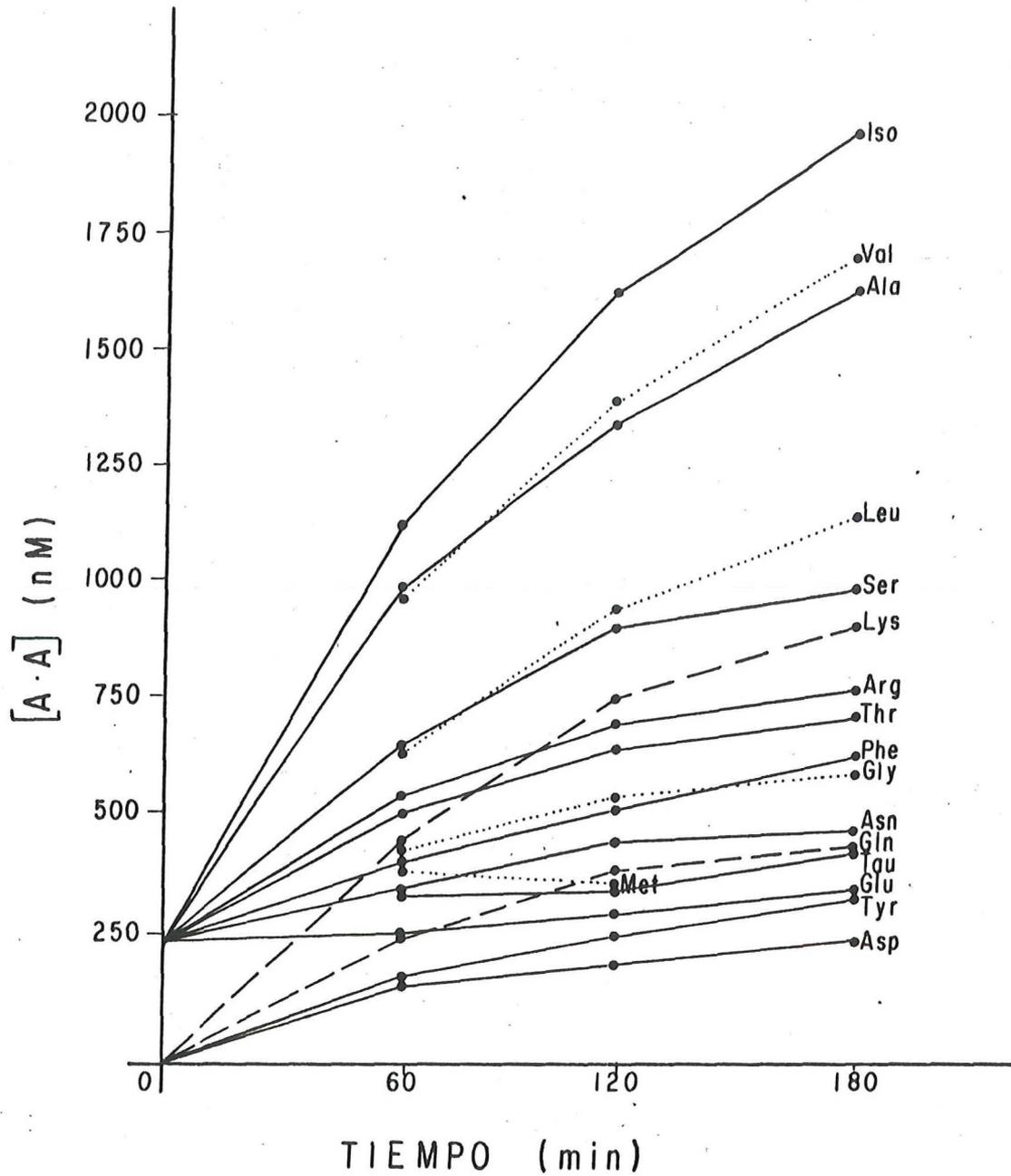


Fig. 3.- Concentración de 17 aminoácidos en el medio durante tres horas de incubación de huevos de E. mordax.

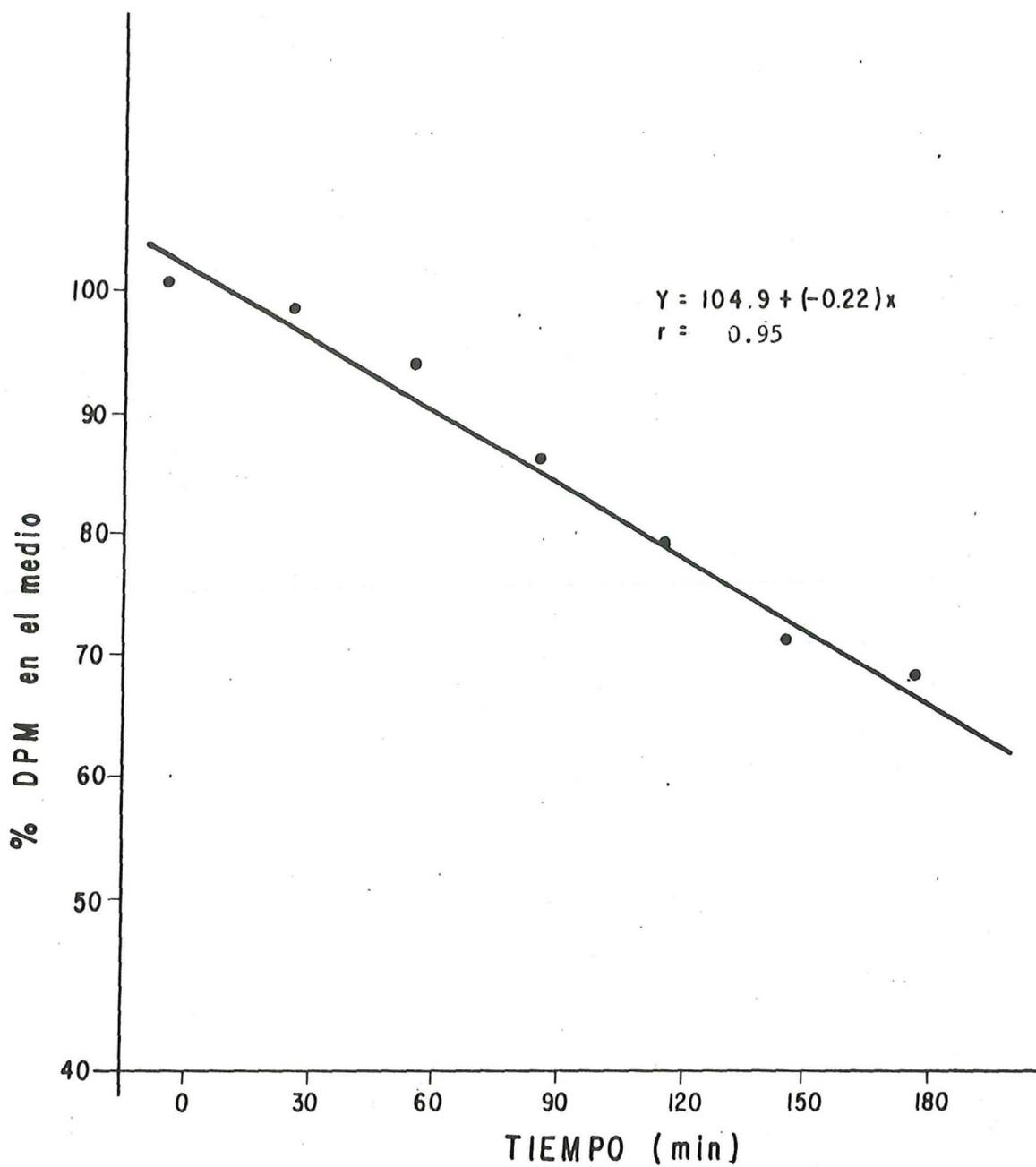


Fig. 4.- Porcentaje de radioactividad que permaneció en el medio de larvas vitelinas de E. mordax durante tres horas de experimentación (n=5).

### III.2.2 Flujo de alanina marcada ( $^{14}\text{C}$ ) a larvas vitelinas

Los valores calculados para la entrada de  $^{14}\text{C}$  en larvas se presentan en la Tabla V. El promedio es de 5.44  $\pm$  0.51 pM/mg/hora (1.71  $\pm$  0.16 pM/larva/hora). En la Tabla VI se presentan los valores calculados del decremento de desintegraciones por minuto en muestras del medio. En este caso, el valor promedio fue de 8.74  $\pm$  1.31 pM/mg/hora (2.75  $\pm$  0.41 pM/larva/hora).

Tabla V. Entrada de alanina marcada a larvas vitelinas midiendo la radioactividad en el tejido.

Repetición	(pM/mg/hora)	(pM/larva/hora)
No.1	5.40	1.70
No.2	6.19	1.95
No.3	5.21	1.64
No.4	5.60	1.76
No.5	4.81	1.51
Total X	5.44	1.71
D. E.	0.51	0.16

Tabla VI. Entrada de alanina marcada a larvas vitelinas de *E. mordax* considerando la disminuci3n de radioactividad del medio.

Repetici3n	(pM/mg/hora)	(pM/larva/hora)
No.1	8.06	2.53
No.2	9.63	3.07
No.3	7.68	2.42
No.4	7.68	2.42
No.5	10.53	3.31
Total X	8.74	2.75
D. E.	1.31	0.41

### III.3 Cromatografía Líquida de Alta Precisi3n (HPLC) en Larvas Vitelinas.

En las figuras 5 A,B,C y D se presentan los cromatogramas para muestras de cada hora en un experimento de tres horas. Se ve una p3rdida de amino3cidos de la larva, aunque en una cantidad menor que en el caso con huevos. En la Tabla VII se presenta la concentraci3n individual de los 17 amino3cidos durante tres horas y la tasa de salida neta de cada uno. La tasa m3nima se observ3 para la taurina con 1.30 pM/larva/hora y una m3xima para isoleusina con 19.31 pM/larva/hora con una tasa de salida total de los 17 amino3cidos de 108.46 pM/larva/hora. Puede tambi3n ser observado que para el caso del 3cido glut3mico y asparagina, los valores presentan una pendiente negativa indicando una entrada de estos amino3cidos a la larva ( $b = -2.08$  y  $b = -2.25$  pM/larva/hora respectivamente, Tabla VII, Fig. 6).

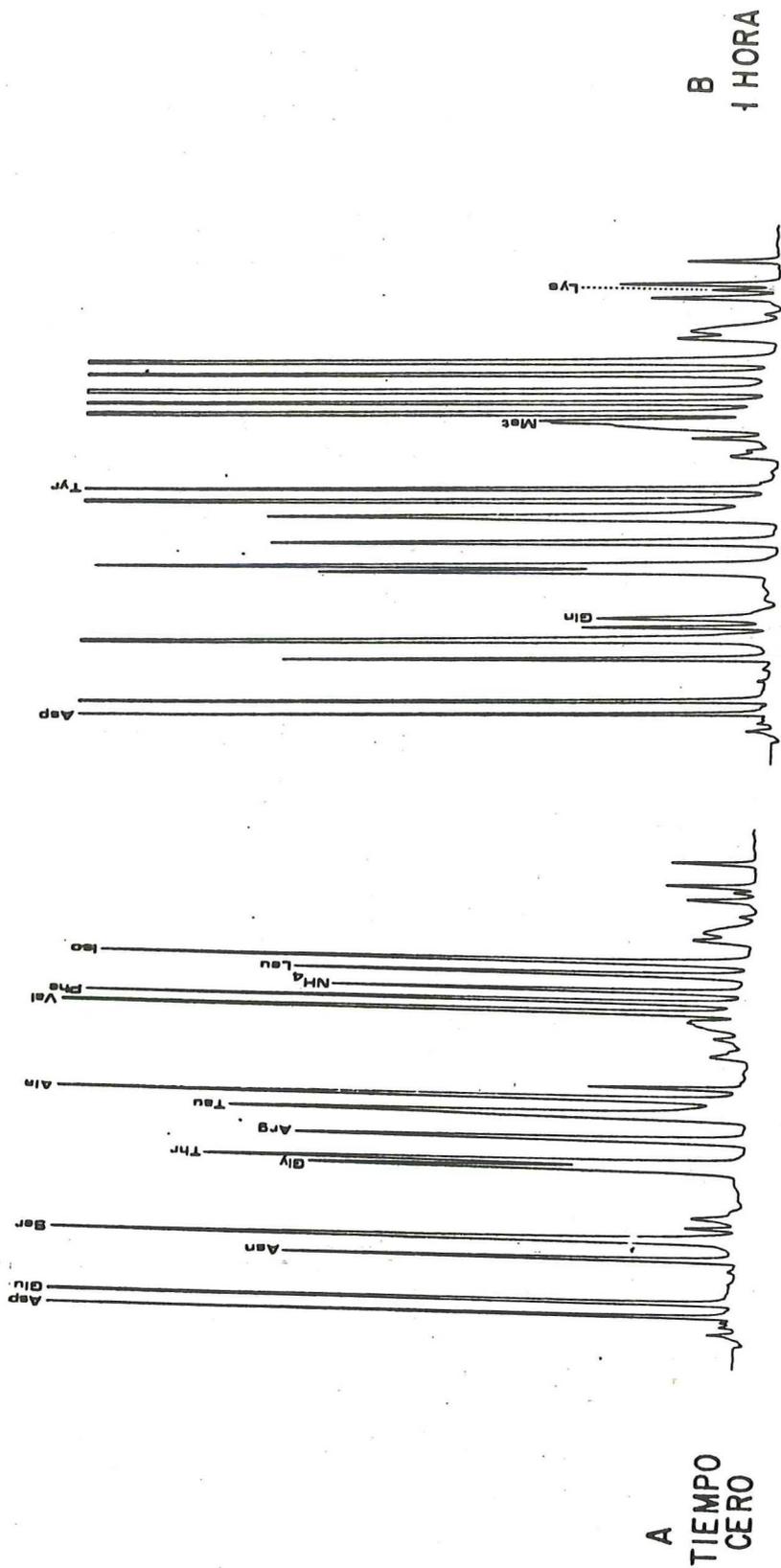


Fig.5.- Cromatogramas de HPLC de una mezcla de 12 aminoácidos a una concentración de 0.25  $\mu$ M cada uno, con larvas vitelinas de E. mordax. A: A tiempo cero, B: Después de una hora de incubación.

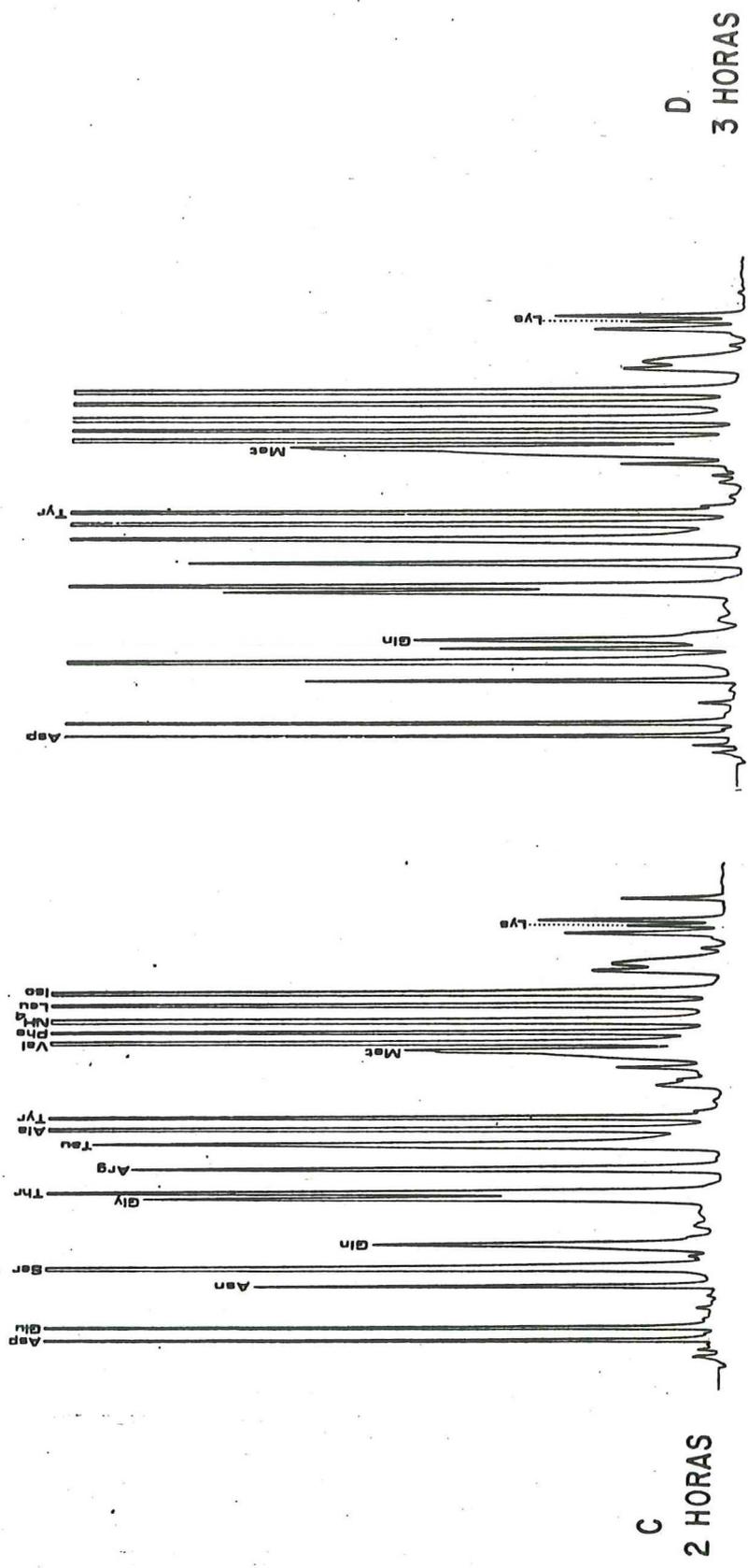


Fig. 5.- Cromatogramas de HPLC de la concentración de aminoácidos del medio de larvas vitelinas de *E. mordax*. C : Después de dos horas de incubación, D : Después de tres horas.

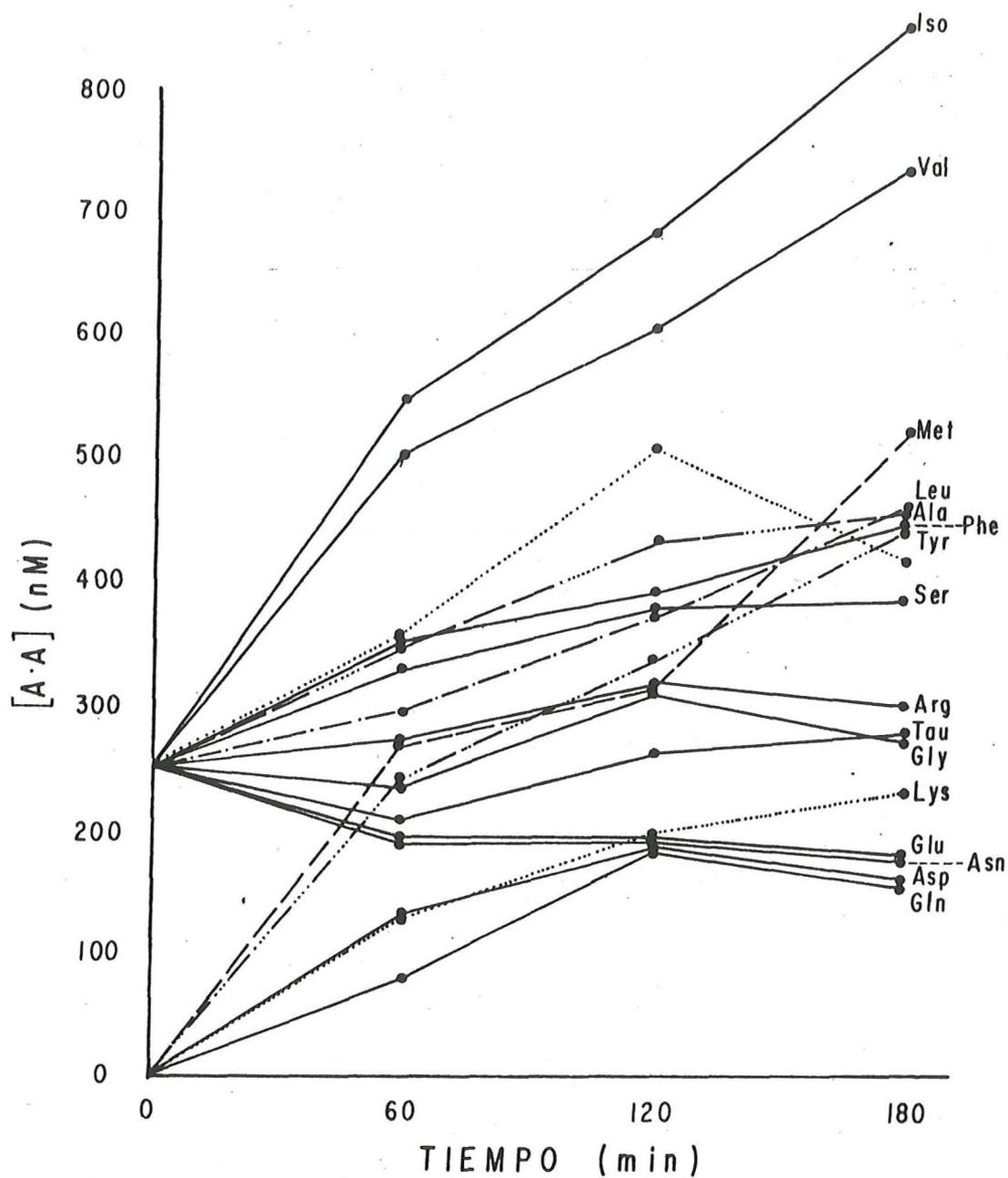


Fig. 6.- Flujo de 17 aminoácidos de larvas vitelinas de E. mordax durante tres horas de incubación.

Tabla VII. Concentración de cada aminoácido y su tasa de flujo durante tres horas de incubación de larvas vitelinas de *E. mordax*.

A. A.	0 (min)	60 (min)	120 (min)	180 (min)	Tasa de salida (pM/larva/hora)
Asp	0	132.4	189.6	158.4	5.32
Glu	250	193.0	194.6	180.0	- 2.08
Asn	250	190.1	191.0	174.7	- 2.25
Ser	250	354.3	504.6	413.1	6.39
Gln	0	77.9	183.8	153.7	5.67
Gly	250	238.4	314.0	273.7	1.46
Thr	250	329.5	378.1	383.7	4.49
Arg	250	271.1	319.8	301.3	2.02
Tau	250	209.7	261.4	276.4	1.30
Ala	250	350.9	428.3	456.4	6.96
Tyr	0	240.4	334.9	442.0	7.59
Met	0	267.5	314.5	514.6	15.90
Val	250	502.2	603.8	732.8	15.50
Phe	250	353.5	389.4	445.4	6.22
Leu	250	297.4	369.5	460.6	7.04
Iso	250	545.5	683.5	847.6	19.31
Lys	0	126.6	193.9	231.7	7.62
					----- Total 108.46 -----

En la figura 7A se presentan los resultados de la entrada y salida de la alanina en larvas vitelinas de *E. mordax* determinada por el monitoreo de la alanina marcada ( $^{14}\text{C}$ ) que entró (línea 1) y la salida de alanina sin marcar ( $^{12}\text{C}$ ) determinada por HPLC (línea 2). Observamos que la concentración de alanina del medio aumentó de 250 a 456.4 nM durante las tres horas del experimento (Tabla VII). En la figura 7B se observan los valores sin corregir y corregidos de la entrada de alanina marcada. Al aplicar esta pequeña corrección se observó que no hay una diferencia significativa

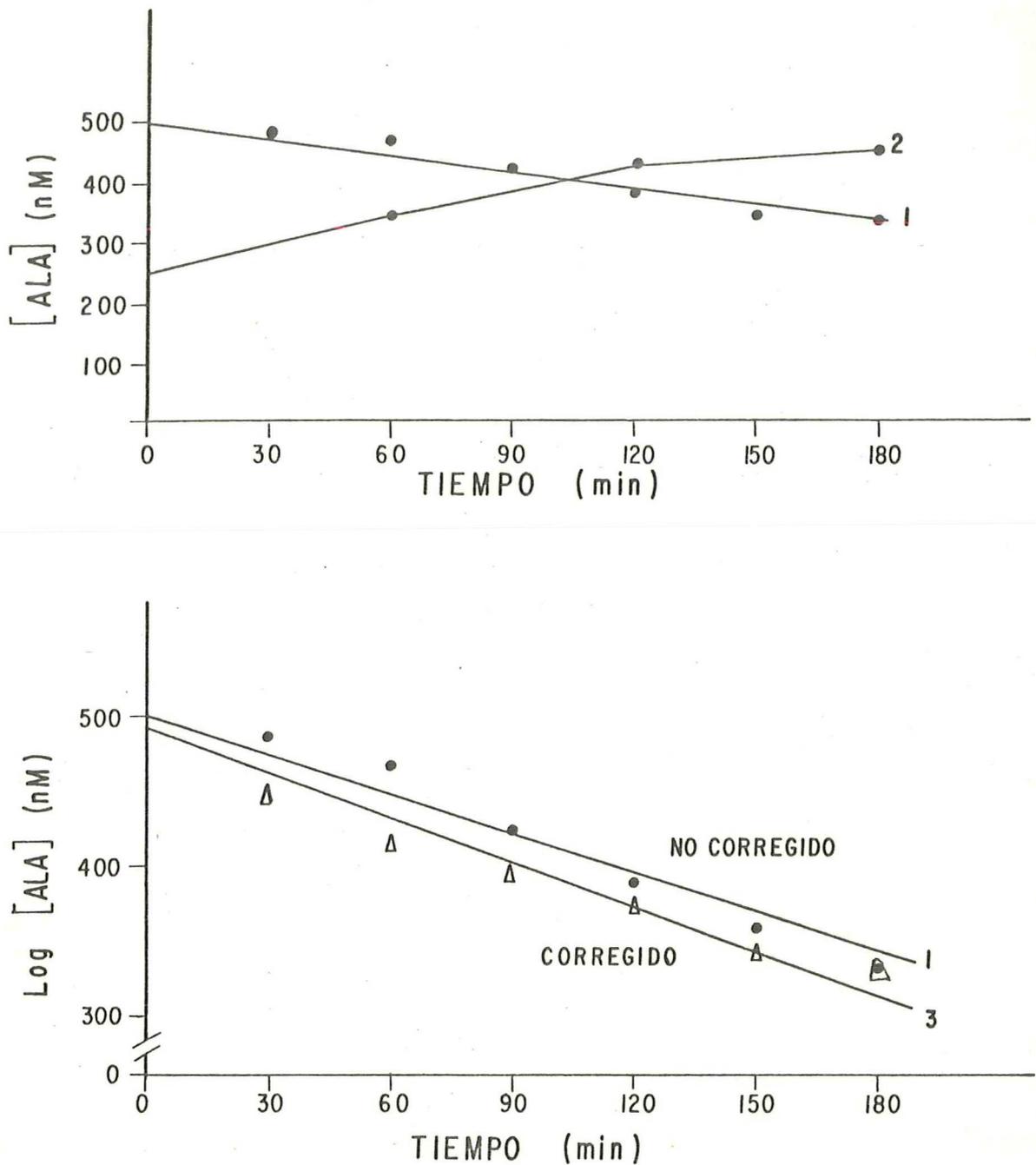


Fig. 7.- A : Cambios en la concentración de alanina del medio determinada por la desaparición de alanina marcada del medio (1) y por la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) (2), por larvas vitelinas de *E. mordax* durante tres horas de incubación. B: Curvas de los valores no corregidos (1) y corregidos (3) de la entrada de alanina marcada expresada en logaritmos.

al aplicar un análisis de covarianza ( $\alpha = 0.05$ ;  $P = 0.17$ ) entre las curvas. En la figura 8 se observa el porcentaje de carbono 14 corregido removido del medio durante las tres horas de incubación de larvas vitelinas de *E. mordax* con un valor de 33.2%.

Las tasas calculadas para la salida total y salida neta y la entrada de aminoácidos corregidas para larvas se presentan en la figura 9 y Tabla VIII.

Tabla VIII. Valores en nM de la salida total y entrada y salida neta (corregidas) de alanina de larvas vitelinas de *E. mordax*.

Tiempo	SALIDA	ENTRADA	SALIDA NETA
0'	500.00	500.00	500.00
30'	-	449.00	-
60'	656.38	414.00	603.70
90'	-	394.00	-
120'	803.54	374.00	667.90
150'	-	360.00	-
180'	952.00	332.00	752.00
PENDIENTE	2.50	-0.86	1.37
TASA	7.5 pM/l/h	2.58 pM/l/h	4.11 pM/l/h

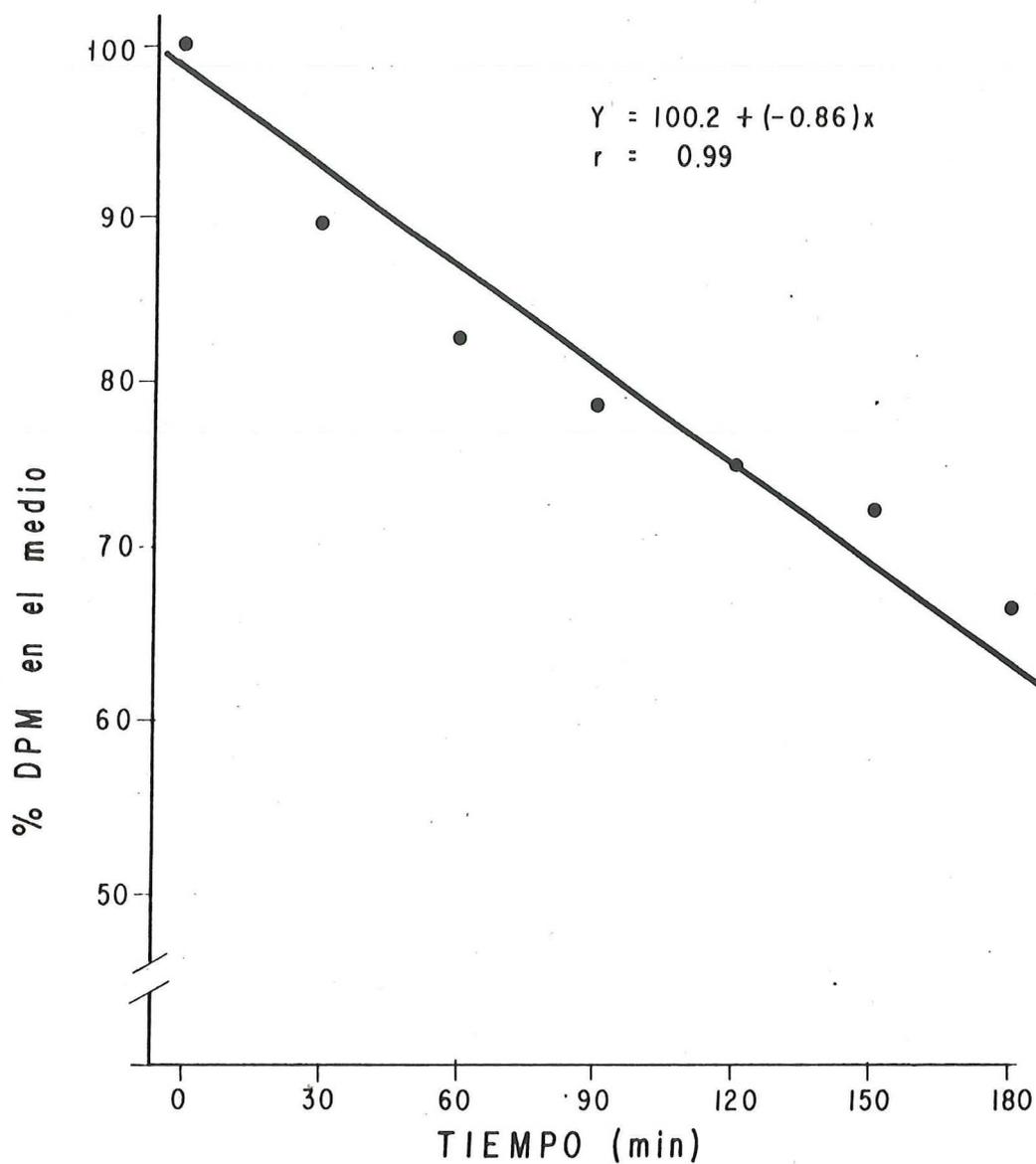


Fig. 8.- Porcentaje de radioactividad corregida que permaneció en el medio de larvas vitelinas de E. mordax, durante tres horas de experimentación.

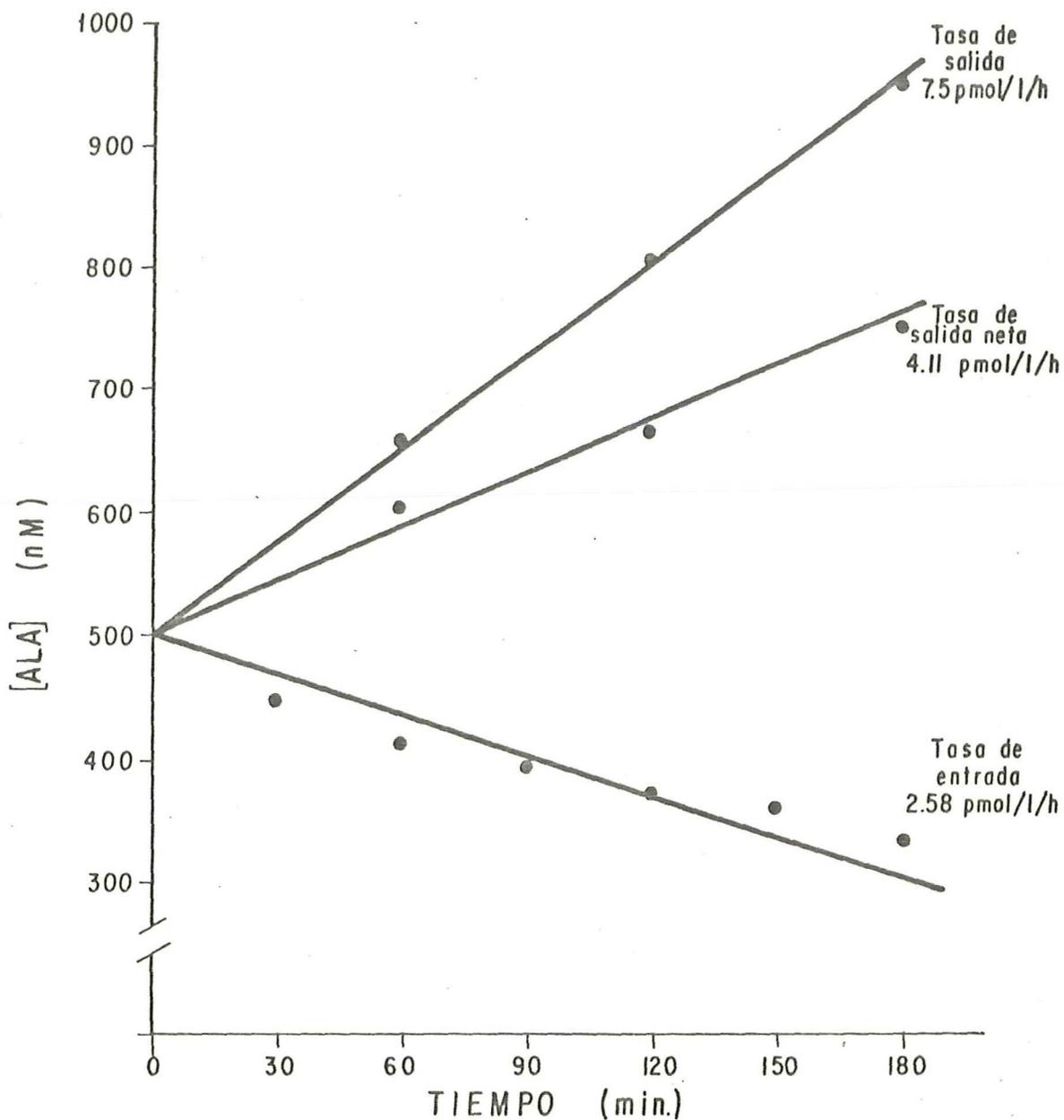


Fig. 9.- Tasa de salida total, entrada y salida neta de alanina de larvas vitelinas de *E. mordax* después de tres horas de incubación.

### III.4 Incorporación de Alanina Marcada $^{14}\text{C}$ (Asimilación) por Larvas Vitelinas de *E. mordax*.

Del 33.2% (valor corregido) de la alanina marcada que fue removida del medio, sólo el 56.0% se pudo medir, el 49.3% se encontró en proteínas y el 6.7% en aminoácidos libres, el restante 44.0% no fue detectado (Tabla IX). Así, de la alanina asimilada el 88% fue incorporado a proteínas y el 12% a aminoácidos libres.

Tabla IX Distribución de  $^{14}\text{C}$  en larvas vitelinas de *E. mordax* después de tres horas de incubación.

---

% Removido	33.2%	
Proteínas (TCA insoluble)	49.3%	88%
Aminoácidos libres (TCA soluble)	6.7%	12%

---

#### III.4.1 Composición de Aminoácidos Libres en Huevos y Larvas Vitelinas.

El análisis cromatográfico de la composición de aminoácidos libres mostró que la concentración total en huevos es de 4357.15  $\mu\text{M}$ /huevo de los 17 aminoácidos presentes. El aminoácido más abundante fue la isoleucina con 653.18  $\mu\text{M}$ /huevo, representando el 14.99%, le sigue la valina y alanina con 14.19% y 9.9% respectivamente. Considerando un volumen del huevo de aproximadamente 2.45  $\mu\text{l}$ , se obtuvo un total de 1778.43  $\mu\text{M}/\mu\text{l}$  (Tabla X).

De la misma manera se analizó la concentración en larvas, encontrando un total de aminoácidos libres de 3221.72

pM/larva. La isoleucina fue la más abundante (21.58%), seguida por la valina y leucina (12.27 y 10.67%) respectivamente. Considerando el peso de una larva (aproximadamente 0.315 mg) uno obtiene un total de 10,227.68 pM/mg por larva (Tabla X).

En la figura 9 A y B se presentan los cromatogramas de los aminoácidos libres en huevos y larvas vitelinas de *E. moroax* respectivamente.

Tabla X. Concentraciones de aminoácidos libres en huevos y larvas vitelinas de la anchoveta norteña después de tres horas de incubación.

Aminoácidos	Huevos		Larvas	
	(pM/huevo)	(pM/ul)	(pM/larva)	(pM/mg)
ASP	40.88	16.69	62.30	197.68
Glu	123.55	50.43	204.49	649.17
Asn	113.43	46.30	36.59	116.17
Ser	230.72	94.17	114.15	362.38
Gln	136.76	55.82	155.90	494.92
Gly	160.93	65.70	68.72	218.16
Thr	165.50	67.55	129.80	412.06
Arg	160.40	65.47	101.30	321.58
Tau	228.72	93.35	187.16	594.15
Ala	431.82	176.25	89.90	285.41
Tyr	140.64	57.40	285.31	905.76
Met	212.18	86.60	157.28	499.30
Val	618.71	252.53	395.23	1254.71
Phe	134.29	54.81	194.42	617.20
Leu	375.24	153.16	343.70	1091.11
Iso	653.18	266.60	695.28	2207.25
Lys	430.20	175.60	193.94	615.68
TOTAL	4357.15	1778.43	3221.72	10227.68

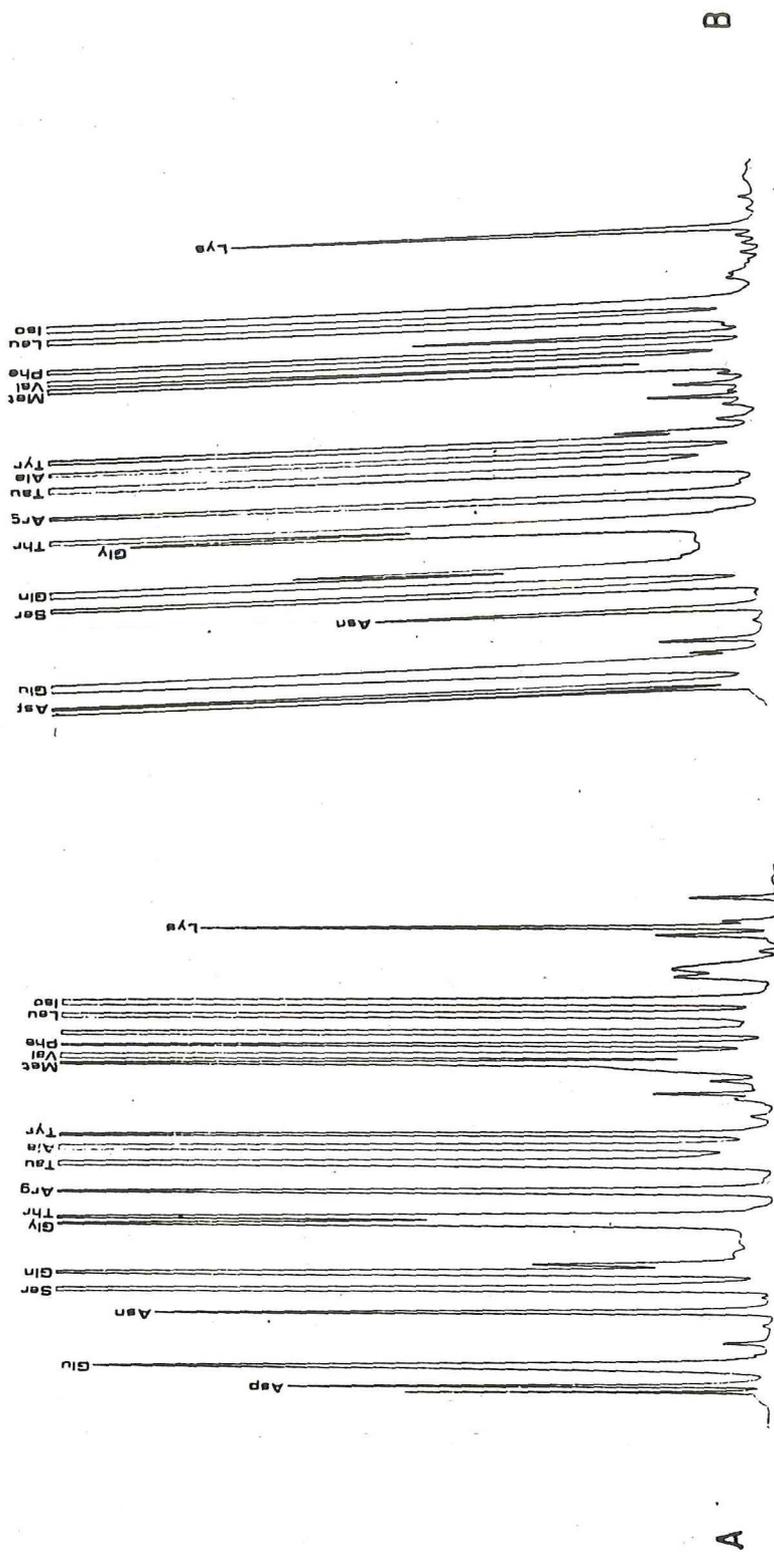


Fig. 10. Cromatogramas de HPLC de la concentración interna de aminoácidos libres de *E. mordax*. A : En huevos, B : En larvas vitelinas después de tres horas de incubación.

### III.5 Crecimiento y Supervivencia

Los resultados obtenidos al aplicar el análisis de covarianza entre el tratamiento con agua sintética (1A) y Agua de mar (1B) (condiciones de inanición) indican que para el crecimiento no hay una diferencia significativa con un  $\alpha=0.05$  ( $p = 0.6105$ ), sin embargo, para la supervivencia la diferencia es significativa ( $P < 0.01$ ).

Los datos obtenidos de los parámetros físicos en los nueve tratamientos se muestran en la tabla XI. El promedio de temperatura se mantuvo entre 16.4 y 17.3 °C en todos los tratamientos, a excepción del tratamiento 1B, donde la variación en las repeticiones estuvo entre 17.2 y 20.4 °C. Los promedios de salinidad fueron 32 ppm para el tratamiento 1A (agua sintética) y entre 34 y 35.6 ppm para los otros ocho tratamientos. No fue posible tomar los valores de oxígeno para los tratamientos 1A y 1B por problemas en la presión del aparato, los otros siete tratamientos se mantuvieron sin grandes variaciones entre ellos (7.15 a 7.55 ml/l). El pH estuvo aproximadamente constante entre 8.00 y 8.24.

En la tabla XII se muestra el porcentaje de eclosión y la concentración promedio de alimento tanto de zooplancton como de fitoplancton. Las tres concentraciones de aminoácidos usadas se agregaron un día antes de la introducción de los huevecillos

TABLA XI. Parámetros físicos :temperatura ( $^{\circ}$ C), salinidad (ppm), oxígeno (ml/l), y pH promedio de los experimentos llevados a cabo en el laboratorio con estdios larvales de *E. mordax*.

---

Experimentos	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Salinidad (PPM)	Oxígeno (ML/L)	pH
1A	17.3	32.0	----	8.00
1A	17.3	32.0	----	8.00
1A	17.2	32.0	----	8.04
1B	17.2	34.0	----	8.00
1B	18.9	34.3	----	8.02
1B	20.4	34.8	----	8.00
2B	17.0	34.6	7.38	8.21
2B	17.1	34.4	7.28	8.20
2B	17.2	34.2	7.28	8.24
3B	17.2	35.1	7.53	8.02
3B	17.1	35.0	7.54	8.09
3B	17.1	35.0	7.27	8.03
4B	16.5	34.7	7.20	8.22
4B	16.4	34.7	7.20	8.21
4B	16.4	34.2	7.30	8.24
5B	16.7	35.6	7.33	8.04
5B	16.7	35.6	7.38	8.02
5B	17.3	35.6	7.15	8.04
6B	17.3	35.1	7.49	8.05
6B	17.1	35.2	7.48	8.00
6B	17.1	34.6	7.55	8.02
7B	16.8	35.1	7.13	8.04
7B	16.7	35.6	7.32	8.01
7B	16.7	35.6	7.36	8.02
8B	16.9	34.6	7.40	8.06
8B	16.9	34.6	7.43	8.06
8B	16.8	34.8	7.39	8.02

---

Tabla XII. Resumen de datos del diseño experimental para los estadios larvales de *E. mordax*.

EXPERIMENTOS	AMINOACIDOS ( ug/l )	ECLOSION (%)	CONC. DE	
			ALIMENTO (org/ml)	FITOPLANCTON (cél/ml)
			Desig/Actual	Desig/Actual
1A	-	77	-	-
1A	-	77	-	-
1A	-	77	-	-
1B	-	77	-	-
1B	-	77	-	-
1B	-	77	-	-
2B	1	77	-	-
2B	1	77	-	-
2B	1	77	-	-
3B	16	90	-	-
3B	16	90	-	-
3B	16	90	-	-
4B	40	77	-	-
4B	40	77	-	-
4B	40	77	-	-
5B	1	80	1 0.7	5000-4000
5B	1	80	1 0.6	5000-3900
5B	1	80	1 0.8	5000-4800
6B	16	80	1 0.9	5000-5400
6B	16	80	1 0.9	5000-4900
6B	16	80	1 1.0	5000-4600
7B	40	80	1 1.0	5000-4100
7B	40	80	1 0.8	5000-4700
7B	40	80	1 0.9	5000-4900
8B	-	80	1 0.8	5000-4800
8B	-	80	1 0.8	5000-4600
8B	-	80	1 0.9	5000-5100

y no se agregaron más, ni se monitoreó su concentración a lo largo del experimento. Los ensayos se llevaron a cabo con tres desoves. El porcentaje de eclosión en cada uno de ellos fue de 80%, 90% y 80%, razón por la cual, el número inicial de larvas varió en cada tanque. La concentración de alimento particulado (microzooplancton) nunca sobrepasó la concentración designada inicialmente; el rango estuvo entre 0.6 y 1.0 org/ml en todos los tanques. Con respecto al fitoplancton, de la concentración designada inicialmente de 5000 cél/ml se mantuvo entre 3900 y 5400 cél/ml en todos los tanques.

### III.5.1 Crecimiento

En la tabla XIII se presenta el número de larvas por muestra, así como el rango, el promedio y la desviación estándar de las tallas (mm) de las larvas medidas en los nueve tratamientos durante los 12 días del experimento. Aquí observamos que la mayor variación entre larvas de un mismo tratamiento se detectó en el experimento 5B para el día 11, con una D.E. = 1.120 mm y en el experimento 3B para el día siete, con una D.E. = 0.936 mm. Las larvas que alcanzaron mayores tallas fueron las del experimento 7B (con 1 org/ml más 40 ug/l de una mezcla de aminoácidos) ( $\bar{X} = 6.45 \pm 0.564$  mm). Fue necesario eliminar una de las repeticiones de los tratamientos 6B y 7B debido a que hubo desconfianza en las mediciones.

Un patrón adicional es evidente en esta Tabla: un

incremento en las tasas de crecimiento de los experimentos desarrollados bajo condiciones mínimas de alimentación (5B, 6B, 7B y 8B), es decir, en aquellos experimentos bajo "'mejores"' condiciones de alimentación comparados con los experimentos bajo condiciones reales de inanición (1A y 1B) y bajo condiciones teóricas de inanición (2B, 3B y 4B).

Tabla XIII. Datos de crecimiento de larvas de *E. mordax* en nueve diferentes tratamientos, durante 12 días de experimentación.

DIAS	EXPERIMENTO	NO. DE LARVAS MUESTREADAS	RANGO DE TALLA (mm)	MEDIA	D. E
0	1A	15	2.85 - 3.45	3.10	0.176
3	1A	9	3.20 - 3.45	3.33	0.079
5	1A	15	3.00 - 3.90	3.63	0.217
0	1B	10	2.70 - 3.45	3.09	0.202
3	1B	6	3.20 - 3.35	3.27	0.052
5	1B	10	3.38 - 3.90	3.66	0.220
0	2B	15	2.62 - 3.52	3.23	0.261
5	2B	15	3.15 - 3.66	3.38	0.136
7	2B	15	3.60 - 3.90	3.49	0.255
5	2B	5	3.60 - 3.90	3.74	0.168
0	3B	10	3.00 - 3.45	3.24	0.161
5	3B	10	3.75 - 4.50	4.06	0.197
7	3B	9	3.15 - 5.55	4.06	0.936
9	3B	5	3.15 - 4.75	4.01	0.567
0	4B	10	3.00 - 3.55	3.25	0.205
5	4B	10	3.35 - 3.66	3.44	0.092
7	4B	10	3.23 - 3.75	3.42	0.164
9	4B	10	3.55 - 3.90	3.73	0.134
11	4B	10	3.55 - 3.95	3.60	0.128
0	5B	10	2.94 - 3.30	3.09	0.137
5	5B	10	3.75 - 4.20	3.93	0.116
7	5B	10	4.43 - 5.40	4.86	0.315
5	5B	10	4.35 - 6.45	5.34	0.585
11	5B	10	4.65 - 7.50	5.64	1.120
12	5B	10	5.10 - 6.45	5.62	0.399
0	6B	10	2.85 - 3.45	3.25	0.166
5	6B	10	3.90 - 4.50	4.02	0.166
7	6B	10	4.05 - 5.05	4.52	0.292
9	6B	10	4.65 - 6.53	5.41	0.557
11	6B	10	5.03 - 6.63	5.98	0.645
12	6B	10	5.70 - 6.55	5.92	0.279
0	7B	10	2.85 - 3.45	3.09	0.209
5	7B	10	3.90 - 4.35	4.19	0.151
7	7B	10	4.20 - 5.25	4.77	0.317
9	7B	10	4.88 - 6.08	5.29	0.406
11	7B	10	5.10 - 6.98	5.64	0.519
12	7B	10	5.70 - 7.50	6.45	0.564
0	8B	10	2.94 - 3.30	3.07	0.143
5	8B	10	3.75 - 4.15	3.94	0.138
7	8B	10	3.75 - 5.16	4.37	0.457
9	8B	10	4.26 - 5.16	4.63	0.352
11	8B	10	4.50 - 5.40	4.92	0.269
12	8B	10	4.80 - 5.70	5.15	0.246

En la tabla XIV se presentan los resultados del análisis de regresión entre la longitud estandar de las larvas y la edad en días. En esta se observa que los tratamientos 1A, 1B, 2B, 3B, 5B, 7B y 8B siguen un modelo lineal ( $P > 0.05$ ) a excepción de los tratamientos 4B ( $P=0.0115$ ) y el 6B ( $P = 0.0081$ ) La linealidad es importante sólo para saber si las pruebas aplicadas son las adecuadas para conocer la tasa de crecimiento de las larvas.

Tabla XIV. Análisis de regresión lineal y Prueba F de los datos de crecimiento de larvas de *E. moroax*.

Exp	Hipótesis	P	Prueba F	Ecuación	Tasa de crecimiento
1A	Linealidad	0.1934	37.16	$Y=3.088+0.105x$	0.105
1B	Linealidad	0.0642	12.56	$Y=3.059+0.116x$	0.116
2B	Linealidad	0.2869	15.94	$Y=3.201+0.045x$	0.045
3B	Linealidad	0.2219	8.07	$Y=3.341+0.103x$	0.103
4B	Linealidad	0.0115	19.87*	$Y=3.206+0.051x$	0.051
5B	Linealidad	0.3423	154.19	$Y=3.029+0.239x$	0.239
6B	Linealidad	0.0081	94.99*	$Y=3.059+0.245x$	0.245
7B	Linealidad	0.1148	237.65	$Y=2.958+0.270x$	0.270
8B	Linealidad	0.3159	288.27	$Y=3.106+0.174x$	0.174
1A	$B = 0$	0.1035	33.51		
1B	$B = 0$	0.1751	25.63		
2B	$B = 0$	0.0574	7.67		
3B	$B = 0$	0.1048	5.31		
4B	$B = 0$	0.2010	23.58		
5B	$B = 0$	0.0002	36.44*		
6B	$B = 0$	0.0006	76.03*		
7B	$B = 0$	0.0001	94.41*		
8B	$B = 0$	0.0001	70.92*		

\* significativo al 0.05

La figura 11 representa gráficamente los datos de crecimiento para todos los experimentos. Aquellos con un mínimo crecimiento estadísticamente no significativo fueron los primeros cinco (1A, 1B, 2B, 3B y 4B), caracterizados por condiciones reales y condiciones teóricas de inanición, con tasas de crecimiento de 0.105, 0.116, 0.045, 0.103 y 0.051 mm/día respectivamente. Entre éstos, las tasas de crecimiento de los tratamientos bajo condiciones reales de inanición (1A y 1B) fueron casi las mismas, mientras que en los siguientes tres, desarrollados bajo condiciones teóricas de inanición (2B, 3B y 4B), éstas fueron ligeramente menores, aunque estadísticamente ninguna de ellas fue significativa ( $\alpha = 0.05$ ). En los experimentos bajo condiciones mínimas de alimentación (5B, 6B, 7B y 8B) las tasas de crecimiento fueron mayores significativamente, con tasas de crecimiento diario de 0.239, 0.245, 0.270 y 0.174 mm/día respectivamente. Puede observarse para estos experimentos una relación entre el incremento en las tasas de crecimiento y el incremento de la concentración de aminoácidos; de una tasa de crecimiento de 0.174 mm/día en el tratamiento con condiciones mínimas de alimentación, pero sin aminoácidos (8B), hasta una tasa máxima de crecimiento de 0.270 mm/día para el tratamiento con condiciones mínimas de alimentación y además con la mayor concentración de aminoácidos (7B; 40  $\mu\text{g/l}$ )

En el análisis de covarianza entre el tratamiento original

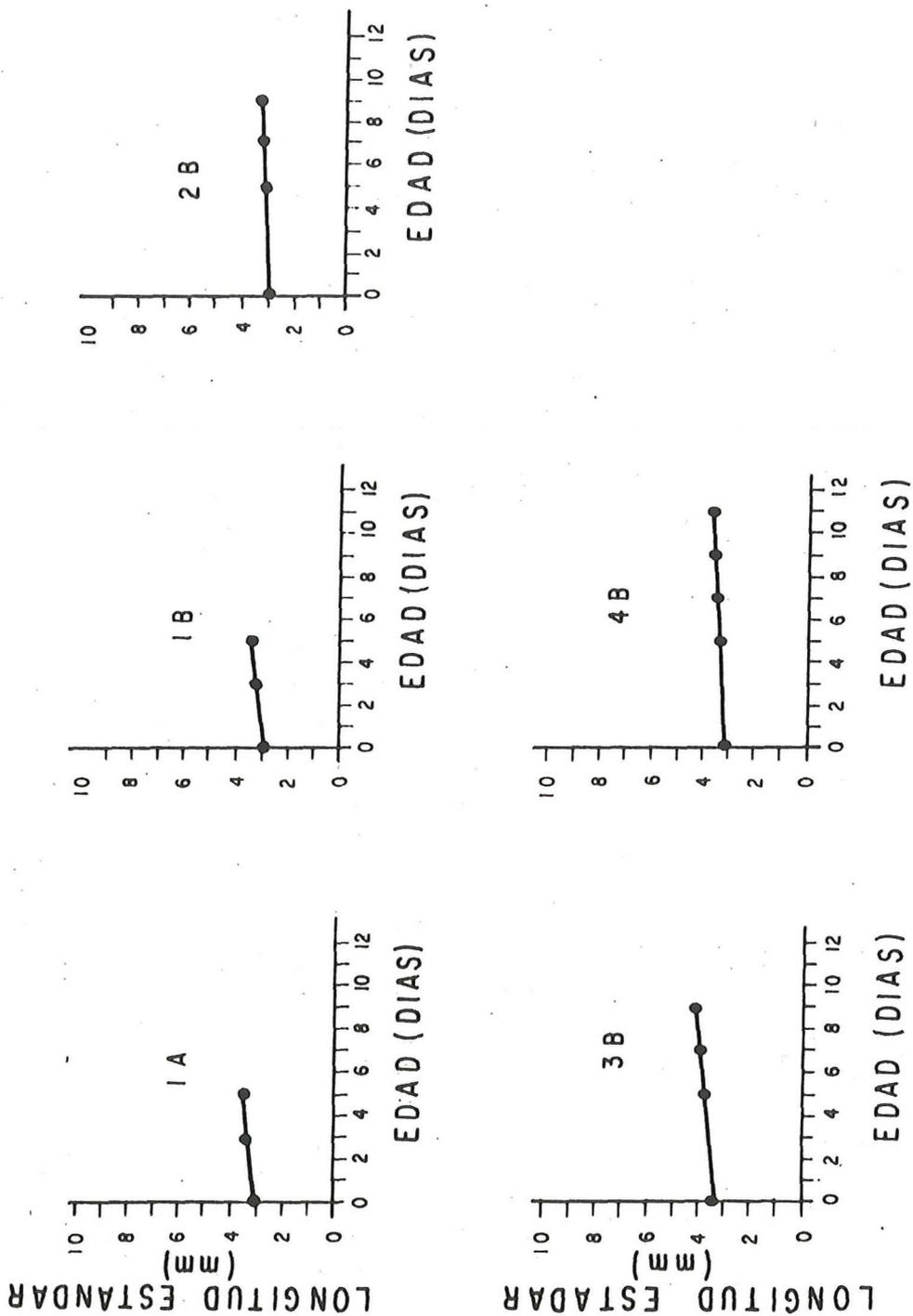


Fig. 11.- Crecimiento de larvas de *E. mordax* durante 12 días de experimentación en el laboratorio. 1A : Agua sintética. 1B : Agua de mar. 2B, 3B y 4B : Tres concentraciones de aminoácidos (1,16 y 40 ug/l respectivamente).

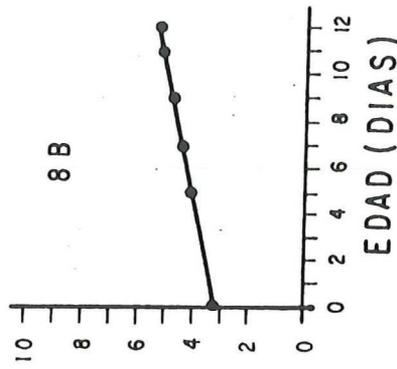
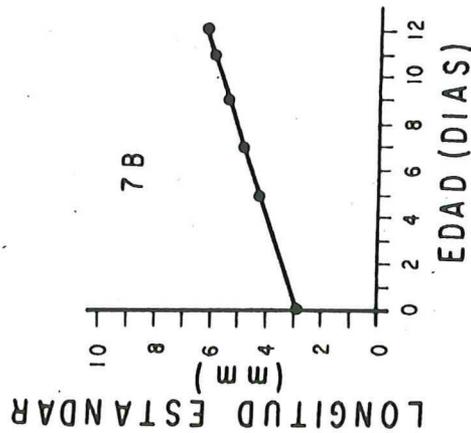
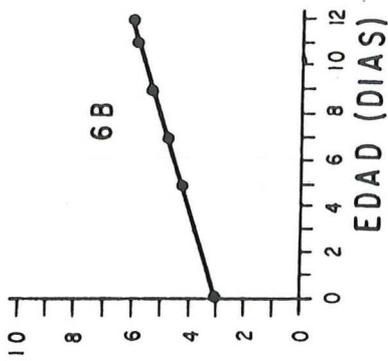
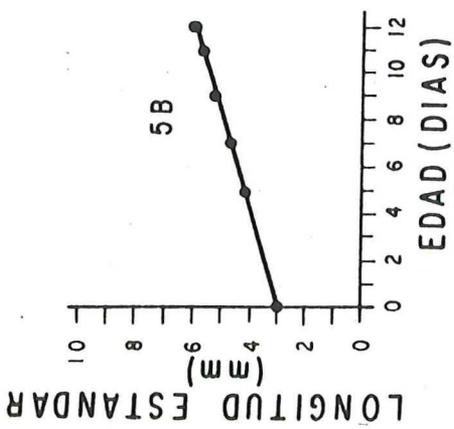


Fig. 11.- Crecimiento de larvas de *E. mordax* durante 12 días de experimentación en el laboratorio. 5B, 6B y 7B : Mezcla de aminoácidos más alimento particulado. 8B : Solo con alimento particulado.

y sus repeticiones, se encontró que hay tasas de crecimiento similares y que los organismos provienen de la misma población con un nivel de confianza del 95% (Tabla XV), por lo cual se procedió a tratar original y repeticiones como un sólo paquete en los análisis posteriores .

Del resultado del análisis de covarianza entre los tratamientos con tasas de crecimiento significativo (5B, 6B, 7B y 8B) representado por condiciones mínimas de alimentación hay diferencias altamente significativa entre los primeros tres tratamientos (5B, 6B y 7B) que contenían aminoácidos y el 8B que no los tenía ( $P = 0.001$ ;  $\alpha = 0.05$ ) (Tabla XVI y Fig.12).

Tabla XV. Análisis de covarianza para probar la homogeneidad de pendientes (tasas de crecimiento) entre original y repeticiones de los cuatro tratamientos con alimento particulado.

Exp	Original		Repeticion 1		Repeticion 2		F	P	0.05
	b +/- D.E		b +/- D.E		b +/- D.E				
5B	0.038	0.003	0.037	0.003	0.039	0.002	0.0045	0.7435	
6B	0.036	0.002	0.037	0.003	-----		2.7155	0.8699	
7B	0.042	0.002	0.040	0.008	-----		0.5558	0.5716	
8B	0.032	0.002	0.031	0.002	0.034	0.004	0.7442	0.6905	

Tabla XVI. Análisis de covarianza para probar la diferencia en las tasas de crecimiento entre los cuatro tratamientos con alimento particulado.

F.de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F
		$\sum X^2$	$\bar{X}^2$	
Trat. Ajustados	3	0.15	0.052	17.6558 **
Regresión	1	5.22	5.222	
Error	235	0.69	0.002	
Homogeneidad	3	0.04	0.014	5.2209
Error Homogen.	232	0.65	0.002	
Total	239	6.07		

\*\* diferencia altamente significativa al 0.05

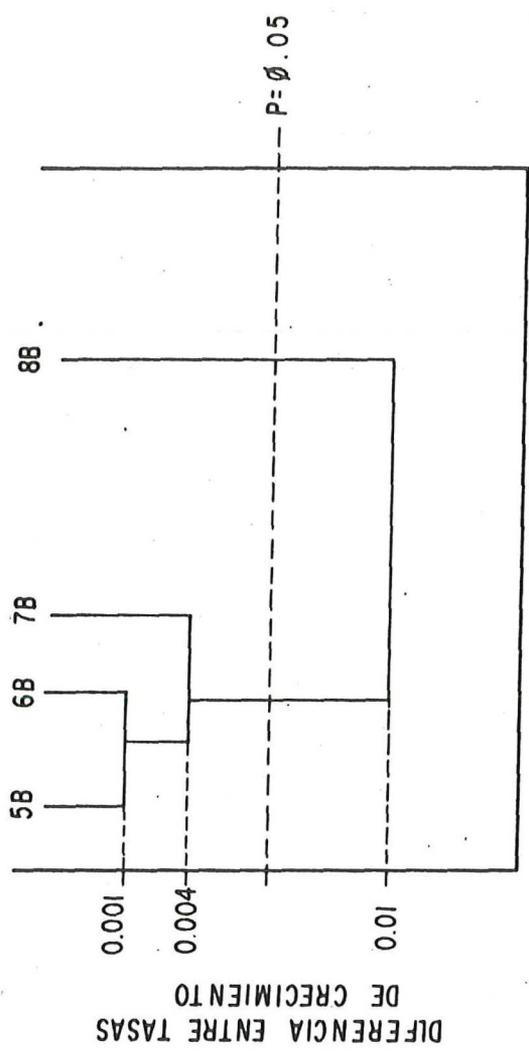


Fig. 12.- Dendograma de la diferencia significativa en las tasas de crecimiento de larvas de *E. mordax* en cuatro diferentes tratamientos con alimento particulado.

### III.5.2 Supervivencia Larval y Mortalidad

La Tabla XVII resume el número de larvas muertas y removidas diariamente de cada tanque, el número de supervivientes y el número de organismos totales. La mayor mortalidad ocurrió entre el sexto y séptimo día después de la eclosión bajo condiciones de inanición (1A y 1B) y bajo condiciones tébricas de inanición (2B, 3B y 4B). Por el contrario, bajo condiciones mínimas de alimentación (5B, 6B, 7B y 8B) la mayor mortalidad se presentó posteriormente, entre el séptimo y octavo día después de la eclosión. La mortalidad total (duración del experimento) fue también diferente entre estos grupos: se presentó al octavo día bajo condiciones de inanición (1A y 1B) y también en el experimento 2B; al décimo primer día en dos de los experimentos bajo condiciones tébricas de inanición (3B y 4B) y al concluir artificialmente al décimo segundo día los experimentos bajo condiciones mínimas de alimentación (5B, 6B, 7B y 8B). En estos cuatro experimentos se encontraron todavía supervivientes.

La tabla XVIII y la Figura 13 resumen los datos de porcentaje de supervivencia para todos los tratamientos y sus repeticiones. Pueden observarse tendencias similares a las descritas en la tabla XVII. En adición, se presentan en general dos patrones de supervivencia que parecen representar por un lado a los experimentos desarrollados bajo condiciones de

inanición (1A y 1B) y bajo condiciones tóxicas de inanición (3B y 4B, exceptuando el tratamiento 2B), y por otro lado a los experimentos desarrollados bajo condiciones mínimas de alimentación (5B, 6B, 7B y 8B).

En el primer caso, el porcentaje de supervivencia se mantuvo por arriba del 74% hasta el sexto día después de la eclosión, seguido de una drástica mortalidad que dio lugar a un porcentaje de supervivencia entre el 0 y el 16.5% para el octavo día después de la eclosión. En el segundo caso, el 75% mínimo de supervivencia también se observó hasta el sexto día después de la eclosión, seguido de una mortalidad comparativamente más reducida y menos pronunciada que dio lugar a un porcentaje de supervivencia superior al 20% que se mantuvo aproximadamente constante desde el noveno día después de la eclosión, hasta el día 12 en el que el experimento fue concluido artificialmente. En estos tanques la supervivencia final fue de 21.3%, 33.0%, 34.1% y 18.2% para los experimentos 5B, 6B, 7B y 8B respectivamente.

No hubo una diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre el tratamiento original y sus repeticiones, a excepción del tratamiento 2B (fig. 1 y 2B), posiblemente debido a una mala elección de los huevecillos.

En los resultados obtenidos al aplicar la corrección por

Tabla XVII. Número de larvas muertas diariamente a lo largo del experimento (M), número de supervivientes (S) y totales (T) en un experimento de 12 días en el laboratorio.

Exp	D I A S												M	S	T
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1A	09	03	02	07	14	01	84	36	-	-	-	-	156	0	156
1A	10	04	03	07	03	05	83	16	-	-	-	-	131	0	131
1A	12	04	02	06	02	01	46	57	-	-	-	-	130	0	130
1B	01	05	07	02	03	17	81	34	-	-	-	-	150	0	150
1B	09	01	05	02	02	27	131	03	-	-	-	-	180	0	180
1B	09	00	06	00	03	02	130	28	01	-	-	-	179	0	179
2B	03	20	39	20	03	01	03	30	-	-	-	-	119	0	119
2B	00	112	22	02	02	01	00	01	-	-	-	-	140	0	140
2B	01	00	25	25	03	00	48	55	-	-	-	-	157	0	157
3B	02	00	16	05	05	09	16	77	31	-	-	-	161	0	161
3B	00	02	04	03	04	08	26	130	17	01	01	-	196	0	196
3B	01	03	03	02	03	01	18	97	09	15	08	01	161	0	161
4B	02	23	13	03	03	07	16	79	06	05	02	-	159	0	159
4B	01	14	16	01	02	03	18	107	03	04	-	-	169	0	169
4B	05	05	12	02	02	04	23	72	12	-	-	-	137	0	137
5B	00	09	25	01	10	01	10	11	06	17	0	0	90	32	122
5B	02	06	05	00	06	05	13	33	22	04	0	0	96	16	112
5B	00	19	05	01	09	05	20	34	11	01	0	0	105	32	137
6B	01	20	01	01	08	05	09	26	08	07	01	0	87	32	119
6B	00	05	02	02	07	00	08	32	22	04	02	0	84	49	133
6B	00	06	02	01	06	07	05	15	09	10	04	0	65	35	100
7B	03	14	09	05	08	05	03	11	26	06	0	0	90	56	146
7B	01	03	06	02	03	04	06	39	18	10	01	01	94	35	129
7B	00	02	03	01	13	09	06	12	13	09	0	0	68	37	105
8B	02	12	04	05	04	04	17	39	20	05	0	01	113	14	127
8B	01	00	01	05	01	01	34	57	08	10	03	00	121	32	153
8B	00	08	04	03	07	00	10	43	33	06	01	00	115	34	149

Tabla XVIII. Datos de supervivencia no corregidos de los estadios larvales de *E. mordax*, mantenida en diferentes concentraciones de aminoácidos y alimento particulado en el laboratorio.

EXP	# INICIAL DE LARVAS	DURACION DEL EXP	PORCIENTO DE SUPERVIVENCIA				
			DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	FINAL DEL EXP
1A	156	8	76.9	23.1	0	-	-
1A'	131	8	75.6	12.2	0	-	-
1A''	130	8	79.2	43.8	0	-	-
1B	150	8	76.7	22.7	0	-	-
1B'	180	8	74.4	1.7	0	-	-
1B''	179	9	88.8	16.2	0.6	-	-
2B	119	8	27.7	25.2	0	-	-
2B'	140	8	0.7	0.7	0	-	-
2B''	157	8	65.6	35.0	0	-	-
3B	161	9	77.0	67.1	19.3	0	-
3B'	196	11	89.3	76.0	9.7	1.0	-
3B''	161	12	91.9	80.7	20.5	14.9	0
4B	159	11	67.9	57.9	8.2	4.4	0
4B'	169	10	78.1	67.5	4.1	2.4	0
4B''	137	9	78.1	61.3	8.8	0	-
5B	122	12	62.3	54.1	45.1	40.2	26.2
5B'	112	12	80.6	70.1	43.4	17.5	14.3
5B''	137	12	71.5	56.9	32.1	24.1	23.4
6B	119	12	69.7	62.2	40.3	33.6	26.9
6B'	133	12	88.0	82.0	57.9	41.4	36.8
6B''	100	12	78.0	73.0	58.0	49.0	35.0
7B	146	12	69.9	67.8	60.3	42.5	38.4
7B'	129	12	85.3	80.6	50.4	36.4	28.7
7B''	105	12	73.3	67.6	56.2	43.8	35.2
8B	127	12	75.6	62.2	31.5	15.7	11.0
8B'	153	12	94.1	71.9	34.6	29.4	20.9
8B''	149	12	85.2	78.5	49.7	27.5	22.8

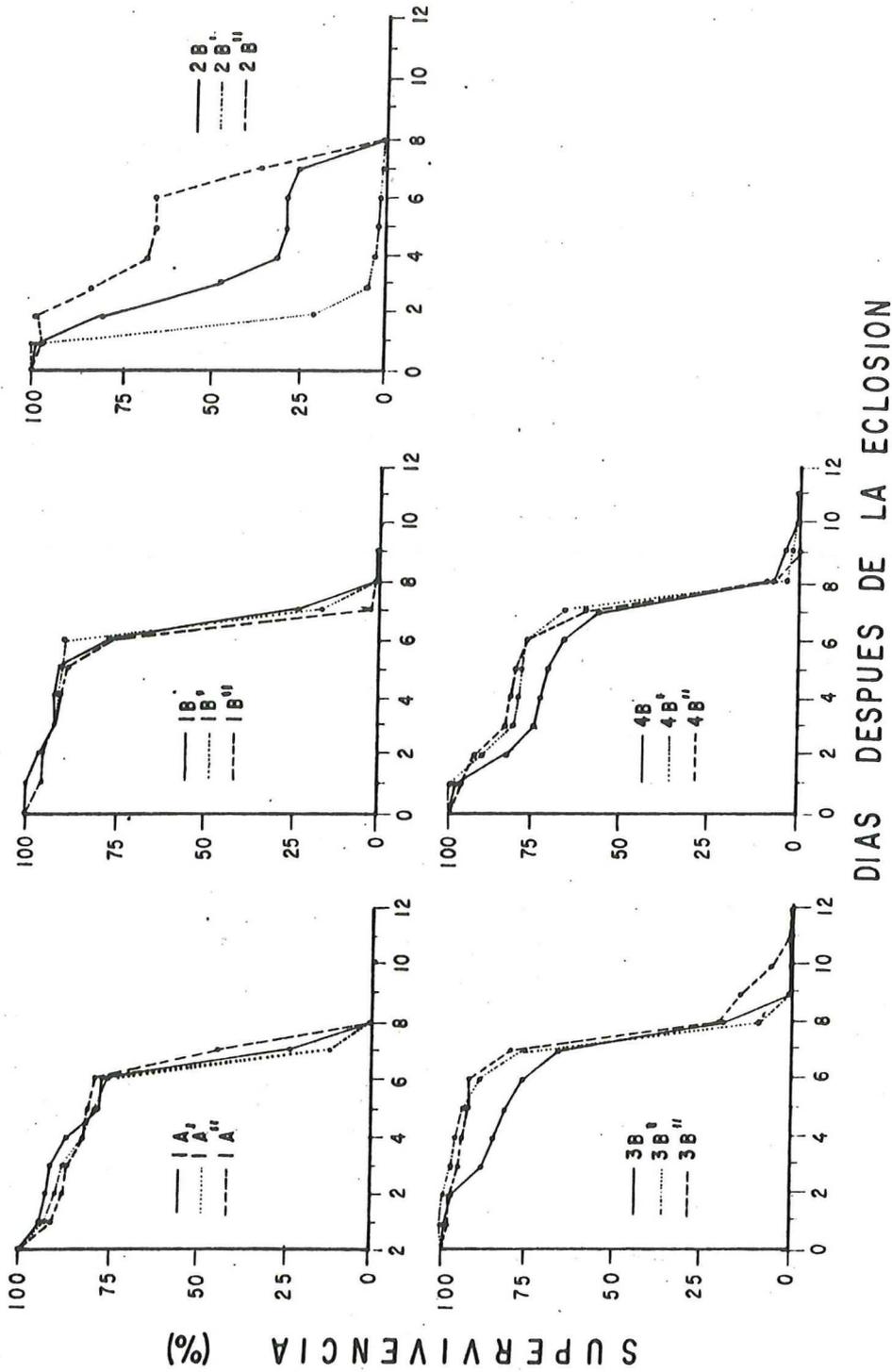


Fig. 13.- Curvas no corregidas de supervivencia de larvas de *I.* mordax cultivadas durante 12 días en el laboratorio. 1A : Agua sintética. 1B : Agua de mar. 2B, 3B y 4B : Tres concentraciones de aminoácidos ( 1, 16 y 40 ug/l respectivamente).

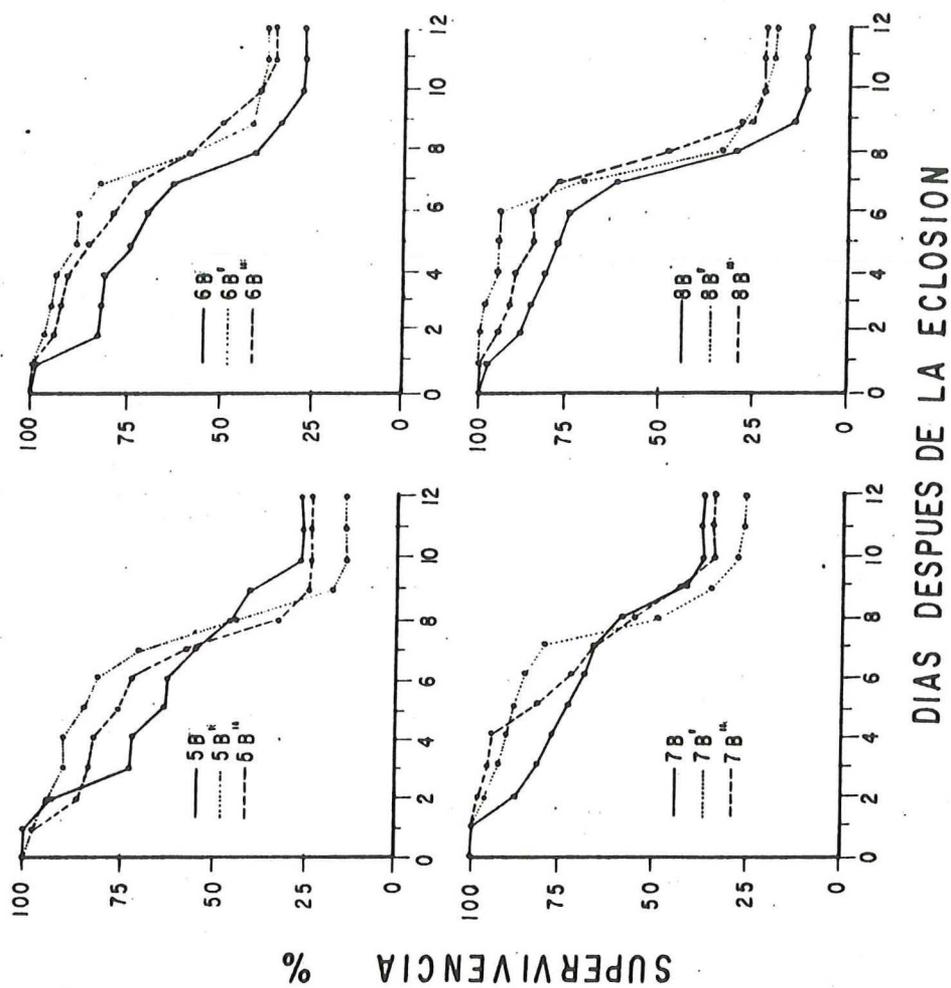


Fig. 13.- Curvas no corregidas de supervivencia de larvas de *E. mordax* cultivadas en tres concentraciones de aminoácidos 1, 16 y 40  $\mu\text{g}/\text{l}$  más alimento particulado en los experimentos 5B, 6B y 7B respectivamente. 8B : Solo con alimento particulado.

pesca (Tabla XIX) se observa que, aunque el número de supervivientes esperados se incrementó, el porcentaje de supervivencia esperado fue el mismo que el obtenido al considerar únicamente mortalidad natural. Los coeficientes instantáneos de mortalidad ( $Z$ ) más bajos fueron en el experimento 7B con un rango de 0.079 a 0.108 y los mayores en el experimento 8B con un rango de 0.123 a 0.183.

Tabla XIX. Datos corregidos de supervivencia considerando la mortalidad por pesca: Número de supervivientes actuales, número de supervivientes esperados, porcentaje de supervivencia esperada y coeficiente de mortalidad instantáneo (%).

EXP	# inicial de larvas	Larvas medidas	Larvas muertas	Superviv, actuales	Superviv, esperada	% de sup. esperada	Coefic. de mort.
1A	169	13	156	0	-	-	-
1A'	144	13	131	0	-	-	-
1A''	143	13	130	0	-	-	-
1B	160	10	150	0	-	-	-
1B'	189	9	180	0	-	-	-
1B''	188	7	179	0	-	-	-
2B	134	15	119	0	-	-	-
2B'	155	15	140	0	-	-	-
2B''	177	20	157	0	-	-	-
3B	173	12	161	0	-	-	-
3B'	208	12	196	0	-	-	-
3B''	176	15	161	0	-	-	-
4B	184	25	159	0	-	-	-
4B'	194	25	169	0	-	-	-
4B''	162	25	137	0	-	-	-
5B	152	30	90	32	40	26.3	0.111
5B'	142	30	96	16	20	14.3	0.162
5B''	167	30	105	32	39	23.4	0.121
6B	149	30	87	32	40	26.9	0.109
6B'	163	30	84	49	60	36.8	0.083
6B''	130	30*	65	35	45	34.9	0.089
7B	176	30	90	56	68	38.7	0.079
7B'	159	30	94	35	43	27.3	0.108
7B''	135	30*	68	37	48	35.3	0.086
8B	157	30	113	14	17	11.1	0.183
8B'	183	30	121	32	38	20.9	0.131
8B''	179	30	115	34	40	22.7	0.123

\* se eliminaron estos datos para las curvas de crecimiento.

## IV. DISCUSION

Utilización de aminoácidos por huevos de *E. mordax*. En los experimentos con huevos de *E. mordax* se observó que el intercambio de material marcado fue insignificante, representando menos del 1% del material radioactivo del medio. Al haber una entrada insignificante de alanina marcada hacia los huevos de esta especie y existiendo por el contrario una salida de 17 aminoácidos, no se puede hablar de un proceso de absorción de aminoácidos y por consiguiente de ningún beneficio energético para los huevos de *E. mordax*. Estos resultados son contrarios a los reportados por Siebers y Rosenthal (1977) quienes trabajando con huevos del arenque *Clupea harengus*, encontraron que hay absorción de aminoácidos en un rango de  $0.5 \pm 0.1$  a  $18.8 \pm 2.7$  pM/huevo/hora y que ésta depende del desarrollo embriológico del huevo. Sin embargo, estos resultados fueron obtenidos en base a experimentos desarrollados con carbono 14, y a través de la utilización de este método se puede detectar únicamente lo que entra al organismo, pero no lo que sale del mismo. Para este caso, la entrada de sustancias marcadas no demuestra una entrada neta del sustrato (Johannes et al., 1969; Davis y Stephens, 1983). Por esta razón y en base a la técnica utilizada, Siebers y Rosenthal (1977) concluyeron la existencia de un beneficio nutricional para los huevos de *C. harengus*. Tal conclusión debe ser demostrada por análisis más directos y específicos,

como al utilizar la HPLC, como se hizo en este estudio que indica el flujo total entre el organismo y el medio.

Utilizando técnicas más precisas en su trabajo con huevos de *C. harengus*, Holleland y Fyhn (1986) encontraron, al igual que para este trabajo con huevos de *E. mordax*, una disminución en la concentración de aminoácidos libres, de 95 a 68 nM/huevo entre el tercero y séptimo día. En base a sus resultados concluyeron que este fenómeno fue el resultado de un proceso natural dentro del desarrollo ontogenético del organismo. Es también posible que la salida de aminoácidos de los huevos de *E. mordax* pudiera explicarse como un proceso similar al encontrado en *C. harengus*.

Para el caso de huevos de invertebrados marinos, aparentemente sí ha podido detectarse la absorción de aminoácidos. Por ejemplo, Manahan (1982) encontró absorción de glicina de una concentración ambiental de 0.57  $\mu$ M en huevos de *Crassostrea gigas* 60 minutos después de la fertilización y Epel (1972) encontró absorción de aminoácidos diez minutos después de la fertilización en huevos del erizo de mar *Stonylocentrotus purpuratus*.

Utilización de aminoácidos por larvas vitelinas de *E. mordax*. Los resultados de los experimentos desarrollados con larvas vitelinas de *E. mordax* indican una diferencia entre los

flujos de  $^{14}\text{C}$  obtenidos midiendo la radioactividad en el tejido de la larva vitelina (5.44 +/- 0.51 pM/mg/hora) y aquellas de mediciones en el medio (8.74 +/- 1.31 pM/mg/hora). Posiblemente esto representa el carbono metabolizado por la larva. Del 33.2% de alanina marcada que disminuyó del medio, solo el 56.0% pudo ser medido; 49.3% incorporado a proteínas y 6.7% a aminoácidos libres. El faltante 44.0%, como se mencionó anteriormente, fue quizás perdido como  $^{14}\text{CO}_2$ , un producto de la respiración metabólica. Resultados similares fueron reportados por Davis y Stephens (1984 a) quienes encontraron 48% del  $^{14}\text{C}$  incorporado a proteínas, 25.1% dentro de aminoácidos libres y 14.7% presumiblemente como  $\text{CO}_2$  en larvas de galleta de mar *Dendraster excentricus*. Manahan (1982) también encontró que después de 100 minutos de incubación de larvas de bivalvos en glicina radioactiva, 47% estuvo incorporada a proteínas, 12.8% en aminoácidos libres y 38% fue oxidado a  $\text{CO}_2$ . Davis y Stephens (1984 b) mencionaron que para equinodermos, si el proceso de incorporación fuera continuo y si se asume que 50% de los aminoácidos libres son incorporados en macromoléculas, esto puede ser una estimación de la tasa de síntesis de proteínas. Sin embargo, no se puede asumir la misma hipótesis para larvas vitelinas de *E. mordax* debido a que se observó una incorporación del 49.3% de  $^{14}\text{C}$  a proteínas, pero a la vez hubo una gran salida de aminoácidos al medio como se observó en los análisis de HPLC.

En un experimento con larvas de tres días del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*, se encontró que después de una incubación en una mezcla de aminoácidos previo al experimento, hubo salida de glicina y serina y la tasa de salida aumentó con el desarrollo larval (Davis y Stephens 1984b). Sin embargo, cuando estos mismos autores trabajaron con larvas de seis días de edad, hubo un decremento significativo en el flujo de serina. Rice et al. (1980) también encontraron pérdida de aminoácidos de larvas de ostra (*Ostrea edulis*) pero consideraron que esto se debió a la gran densidad de organismos en el experimento (400/ml), y que la calidad del agua circundante de las larvas pudo haberse deteriorado. Johannes et al. (1969) reportó la pérdida de aminoácidos de un ectoparásito marino *Bdelloura candida* a una tasa cuatro veces mayor que la tasa de entrada, de una concentración de 0.5  $\mu$ M de aminoácidos marcados, a la vez hubo incorporación de  $^{14}$ C en el organismo que se atribuyó a un posible cambio difusional. Debido a que se observó que la salida de aminoácidos de larvas vitelinas de *E. mordax* (7.5 pM/larva/hora) fue tres veces mayor que la entrada (2.5 pM/larva/hora), no se puede hablar de un beneficio energético de los aminoácidos, aunque haya habido incorporación a proteínas, esto posiblemente fue debido a un intercambio. Considerando los cinco aminoácidos que salieron tanto de huevos como de larvas y que no se agregaron en el medio inicial, es posible que se deba también a un proceso de difusión. Davis y Stephens (1984 b) encontraron que para la

serina, el flujo cambió en proporción al gradiente de concentración sugiriendo también un proceso de difusión.

Efecto de aminoácidos en el crecimiento y supervivencia de larvas de E. mordax. Aun cuando los experimentos de utilización de aminoácidos sugieren que las larvas de E. mordax no pueden haberlos utilizado como fuentes directas de energía, los datos de crecimiento y supervivencia indican la posibilidad de utilización indirecta a través de los microflagelados presentes y/o a través del zooplancton del cual se alimentan.

Por ejemplo tanto el crecimiento como la supervivencia se incrementaron significativamente a partir de la adición de aminoácidos, y entre los experimentos desarrollados con estas sustancias orgánicas disueltas, tanto el crecimiento, como también la supervivencia final se incrementaron con un incremento en la concentración de aminoácidos.

El efecto positivo de los aminoácidos es particularmente evidente en los experimentos desarrollados bajo condiciones reales de inanición en tanques con agua de mar sintética y en tanques con agua de mar natural. La supervivencia de larvas de E. mordax en estos últimos se incrementó significativamente, sugiriendo la importancia de las sustancias orgánicas disueltas presentes en forma natural en el medio ambiente

marino.

No existe en la literatura informaci3n para comparar los datos encontrados en este trabajo. Este es el caso particularmente para larvas de *E. mordax*. Sin embargo, la informaci3n disponible (Quiñ3nez Velázquez, 1985; Rodríguez Murillo, 1983) apoyan los resultados derivados de este estudio y contemplan tambi3n la importancia ecol3gica de la materia orgánica disuelta en el crecimiento y en la supervivencia de larvas de peces marinos.

Por ejemplo, las tasas de crecimiento (0.17-0.27 mm/día) de larvas de *E. mordax* bajo las condiciones mínimas de alimentaci3n empleadas en este estudio son superiores a las reportadas en la literatura (0.07 mm/día) para larvas de esta especie bajo condiciones de alimentaci3n comparables y son similares a la tasa de crecimiento (0.03 mm/día) encontrada para larvas de *E. mordax* bajo condiciones subóptimas de alimentaci3n (> condiciones mínimas de alimentaci3n) (Lasker et al., 1970; Kramer y Zweifel, 1970). Los valores más elevados de tasas de crecimiento reportadas para larvas de esta especie bajo condiciones óptimas de alimentaci3n se encuentran entre 0.40 - 0.50 mm/día (Lasker et al., 1970; Quiñ3nez Velázquez, 1985).

Por otro lado, las tasas de crecimiento (0.04-0.11 mm/día)

de larvas de *E. mordax* encontradas en este trabajo bajo condiciones teóricas de inanición (aminoácidos presentes en diferentes concentraciones como única "fuente de alimento") son similares a las encontradas por Quiñónez Velázquez (1985) para larvas de esta especie (0.09 mm/día) también bajo condiciones teóricas de inanición (material orgánico particulado como única "fuente de alimento"). Las tasas de crecimiento encontradas para ambos casos son mayores que las reportadas en la literatura para larvas de *E. mordax* (0.04-0.07 mm/día) bajo condiciones reales de inanición y ligeramente menores a las reportadas por Lasker et al., (1970) para larvas de *E. mordax* bajo condiciones óptimas de alimentación (0.14 mm/día).

Un beneficio evidente de la presencia de aminoácidos se da en el efecto aparente que tienen en prolongar la supervivencia a larvas de *E. mordax* hasta en más de tres días, comparada con los experimentos desarrollados bajo condiciones reales y condiciones teóricas de inanición. La significancia ecológica de factores que pudieran extender el tiempo de supervivencia de larvas de peces es evidente y ha sido discutida por Rodríguez Murillo (1983).

Prolongar la supervivencia de larvas de peces en su medio natural bajo condiciones de alimentación les permitiría incrementar las probabilidades de encontrar mejores condiciones

alimenticias y de esta manera reducir también la mortalidad por inanición y depredación, que se podría traducir en un mejor reclutamiento para una clase anual más fortalecida. Esta importancia sería al menos significativa hasta antes de que las larvas llegaran al punto de inanición irreversible (Lasker et al., 1970; May, 1971; Houde, 1974), o a un punto de tal deterioro energético en el que la depredación sería una causa significativa de mortalidad por la susceptibilidad de las larvas a este fenómeno (O'Connell y Raymond, 1970; Alvariño, 1977; Hunter, 1984; Cisneros-Mata, 1985).

Los postulados más importantes en la ecología alimenticia de larvas de peces marinos basan el éxito en la supervivencia de éstas en una serie de premisas centradas en la disponibilidad de alimento del tipo y tamaño adecuado (Lasker et al., 1970; Lasker, 1975; Hunter, 1977, 1981; Scura y Jerde, 1977), en la concentración mínima necesaria (O'Connell y Raymond, 1970; Houde, 1977, 1978; Houde y Schecter, 1981), y además disponible antes del inicio de la inanición irreversible (Lasker et al., 1970; May, 1971; Houde, 1974).

Ante condiciones naturales caracterizadas por aparentes concentraciones subóptimas de alimento (Beers y Stewart, 1967, 1971; Arthur, 1976, 1977) y condiciones medioambientales impredecibles y aleatorias (Lasker, 1975), el éxito alimenticio de larvas de peces marinos y su consecuente efecto en la clase

anual correspondiente tendrían que estar supeditadas a la coincidencia espacio-temporal de estos factores.

Los resultados obtenidos en los experimentos de crecimiento y supervivencia aunados a otros estudios en los que se hace evidente el efecto positivo de "fuentes no convencionales" de alimento para larvas de *E. mordax*, sugieren que existen otras fuentes de energía potencial en el océano que pudieran ser utilizadas con éxito por larvas de peces marinos (Moffatt, 1981; Rodríguez Murillo, 1983; Quiñónez Velázquez, 1985; Carrillo Barrios-Gómez y Solís Guevara, manuscrito (b)).

De lo expuesto en este trabajo se puede resumir que en huevos de *E. mordax* hubo una entrada insignificante de material marcado y hubo liberación elevada de aminoácidos. Posiblemente esto se debió a un proceso fisiológico del organismo como sucede en *Clupea harengus* (Holleland y Fyhn 1986). Si la materia orgánica disuelta puede proveer un beneficio energético a las larvas vitelinas, es poco evidente, como lo muestran los análisis bioquímicos; sin embargo, considerando los experimentos de crecimiento y supervivencia es claro que directa o indirectamente, están recibiendo algún beneficio de los aminoácidos; cuando y bajo que mecanismo no es claro todavía, pero quizás sea en algún momento posterior a la absorción del vitelo. Desde luego que esto se tomaría con

cierta reserva, ya que no se conoce realmente el estado fisiológico de la larva, y esto es de suma importancia en la naturaleza, ya sea para poder competir con otros organismos por alimento o para evitar la depredación.

## V. CONCLUSIONES

1.- Los huevos de *E. mordax* no obtienen ningún beneficio energético de los aminoácidos, debido a que no se observó un proceso de absorción, sino una pérdida de aminoácidos.

2.- Aunque hay incorporación de alanina marcada a las larvas vitelinas en un 49.3 % en proteínas, y 6.7 % en aminoácidos libres, existe también una salida de aminoácidos tres veces mayor que la entrada, por lo cual se concluye, que las larvas vitelinas no están obteniendo ningún beneficio energético de la absorción de aminoácidos.

3.- Los experimentos bioquímicos demuestran que tanto huevos, como larvas vitelinas no utilizan aminoácidos. Sin embargo, los experimentos de crecimiento y supervivencia demuestran que las larvas están recibiendo algún beneficio de los aminoácidos libres, esto es posiblemente debido a un efecto sinergista entre el fitoplancton, zooplancton y aminoácidos después de la absorción del saco vitelino, por lo cual se concluye que indirectamente las larvas recibieron un posible beneficio nutricional de los aminoácidos.

## RECOMENDACIONES

- 1.- Realizar monitoreos bioquímicos del flujo de aminoácidos entre el medio y la larva a diferentes concentraciones, por medio de análisis de HPLC y  $^{14}\text{C}$ .
- 2.- Realizar análisis bioquímicos con estadios larvales al término de la absorción del saco vitelino, ya que es en este momento cuando un suplemento energético por la MOD puede ser muy importante.
- 3.- En los experimentos de supervivencia y crecimiento controlar la concentración de aminoácidos a lo largo del experimento, posiblemente al principio, a la mitad y al final del experimento ya que son análisis muy importantes pero laboriosos.
- 4.- Tener extremo cuidado en el manejo de huevos y larvas de *E. mordax* en la separación, tamizado y sifoneo, ya que son organismos muy delicados y fácilmente pueden ser dañados.

## LITERATURA CITADA

- Alvariño, A. 1977. Depredadores planctónicos y la pesca, p. 139-160. En: Mem. II simp. Latinoam. Oceanogr. Biol. Venezuela.
- Alvariño, A. 1980. The relation between the distribution of zooplankton predators and anchovy larvae. CalCOFI Rep. XXI: 150-160.
- Anónimo. 1983. Northern anchovy fishery management plan (FMP) amendment # 5). Final supplementary environmental impact statement. Pac. Fish. Man. Council, NMFS. oct.24, 1983.
- Arthur, D.K. 1956. Particulate food and the food resources of the larvae of three pelagic fishes especially the pacific sardine *Sardinops caerulea*. Ph. D. Thesis Univ. of California, San Diego, Cal. 231pp.
- Arthur, D.K. 1976. Food and feeding of larvae of three fishes occurring in the California Current. *Sardinops sagax*, *Engraulis mordax* y *Trachurus symmetricus*. Fish. Bull. U.S. 74 (3) : 517 - 530.
- Arthur, D.K. 1977. Distribution, size and abundance of microcopepods in the California current system and their possible influence on survival of marine teleost larvae. Fish. Bull. U.S. 75 (3) : 601- 611.
- Bakun, A. 1982. Turbulence, transport, and pelagic fish in the California and Peru Current System CalCOFI Rep. vol. XXIII
- Beers, J.R. y G. L. Stewart. 1967. Microzooplankton in the euphotic zone at five locations in the California Current. J. Fish. Res. Bd. Canada. 24: 2053- 2058.
- Beers J.R. y G.L. Stewart. 1971. Microzooplankton in the communities of the upper waters of the eastern tropical Pacific. Deep-sea Res. 18: 861-883 .
- Carrillo Barrios-Gómez., E y J.C. Solís Guevara Manuscrito . Efecto de concentraciones elevadas de *Tetraselmis* sp en la inanición irreversible en los estadios larvales de la anchoveta, *Engraulis mordax* G. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Carrillo Barrios-Gómez, E y J.C. Solís Guevara. Manuscrito (b). *Tetraselmis* sp como fuente de alimento para los estadios larvales de la anchoveta *Engraulis mordax* Girard. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Cavanaugh, G.M. 1956. Formulae and methods of the Marine Biological

Laboratory Chemical Room. Woods Hole, MA: Marine Biological Laboratory, vol. IV.

- Chavez, H., S. Silva, y J.S. Sunada. 1979. La pesquería de Anchoveta Engraulis mordax, en California y Baja California durante 1975, con datos sobre el desarrollo de la industria en 1976 y 1977. Departamento de Pesca. serie científica # 20 pag. 5-48.
- Cisneros Mata, M.A. 1985. Efecto de la depredación por Acartia tonsa (COPEPODA, CALANOIDEA) y de una baja densidad de alimento en la mortalidad de los primeros estadios larvales de Engraulis mordax (Pisces, Engraulidae). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Tesis de Maestría en Ciencias., Ensenada, B.C. México. 92 p.
- Clark, M.E., G.A. Jackson, & W.J. North. 1972. Dissolved free amino acids in southern California coastal waters. *Limnology and Oceanogr.* 17: 749-58.
- Corkett, C. J. y D.L. Urry. 1968. Observations on the keeping of adult female Pseudocalanus elongatus under laboratory conditions. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 48:97-105. Davis, J.P., and G.C. Stephens. 1983. Determination of net flux of 14 amino acids in Tetrahymena pyriformis. *J. Comp. Physiol.* 152: 27-33.
- Davis, J.P., and G.C. Stephens. 1984 a. Uptake of free amino acids by acteria-free larvae of the sand dollar Dendraster excentricus. *Am. J. Physiol.* 247 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 16): R733-R739.
- Davis, J.P., and G.C. Stephens. 1984 b. Regulation of net amino acids exchange in sea urchin larvae. *Am. J. Physiol.* 247 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 16): R1029-R1037.
- Dengens, E.T., J.H. Reuter, & K.N.F. Shaw. 1964. Biochemical Compounds in offshore California sediments and sea waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 28: 45-66.
- Duursma, E.K. 1961. Dissolved organic carbon, nitrogen and phosphorus in the sea. *Netherlands Journal of sea Research* 1: 1-148.
- Epel, D. 1972. Activation of a Na<sup>+</sup>-dependent amino acid transport system upon fertilization of sea urchin eggs. *Expt. Cell Res.* 72: 74-89.
- Gomme, J. 1982. Epidermal nutrient absorption in marine invertebrates: A comparative analysis. *American Zoologist.* Vol 22, No.3 : 691-708.
- Henrichs, S.M. and J. W. Farrington. 1979. Amino acids in interstitial waters of marine sediments. *Nature* 279: 955 - 959.
- Hewitt, R.P., G.H. Theilacker and N.C.H. Lo. 1986. Causes of mortality in young Jack mackerel (Manuscrito aceptado por el Marine

Ecology 1986).

- Hjort, J. 1914. Fluctuations in the great fisheries of northern Europe viewed in the light of biological research. Rapp. p. -v. Reun. Cons. int. explor. Mer. 20: 1-228.
- Hjort, J. 1926. fluctuations in the year classes of important food fishes. J. Cons. int. Explor. Mer. 1: 1-38.
- Holleland, T. and H.J. Fyhn. 1986. Osmotic properties of eggs of the herring *Clupea harengus*. Marine Biology 91: 377-383.
- Holliday, F.G.T. 1969. The effects of salinity on the eggs and larvae of teleosts in : Fish Physiology vol I pag 293-311. Ed. by W.S. Hoar and D.J. Randall. Academic press .
- Houde, E. D. 1974. Effects of temperature and delayed feeding on growth and survival of larvae three species of subtropical marine fishes. Mar. Biol. 26: 271-285.
- Houde, E.D. 1977. Food concentration and stocking density effects on survival and growth of laboratory-reared larvae of Bay anchovy *Anchoa mitchilli* and Line sale *Archirus lineatus*. Mar. Biol. 43: 333-341.
- Houde, E.D. 1978. Critical food concentration for larvae of three species of subtropical marine fishes. Bull. Mar. Sci. 28(3):. 395 - 411 .
- Houde, E.D. y R.C. Schekter. 1981. Growth rates, relations and cohort consumption of marine fish larvae in relation to prey concentrations. Rapp. P.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer. 178: 441-453.
- Howell, B.R. 1973. Marine fish culture in Britain VIII. A marine rotifer *Brachionus* S.C. Jan. 1974.
- Husby, D.M. and C.S. Nelson. 1982. Turbulence and vertical stability in the California Current CalCOFI Rep., vol. XXIII. 112-129.
- Hunter, J.R. 1972. Swimming and feeding behavior of larval northern anchovy *Engraulis mordax* Fish. Bull. U.S. 70 (3): 821-838.
- Hunter, J.R. 1976. Report on a colloquium on larval fish mortality studies and their relation to fishery research. NOAA Tech. Rep. NMFS. Circ.-395, p.1-5 .
- Hunter, J.R. 1977. Behavior and survival of northern anchovy *Engraulis mordax* larvae. CalCOFI Rep. XIX: 138-146.
- Hunter, J.R. 1981. Feeding ecology and predation of marine fish larvae, p.33-77. In: Lasker, R. (ed.) Marine Fish Larvae: Morphology, Ecology and Systematics. Univ. Wash. Press. Seattle.

- Hunter, J.R. (1983). Synopsis of culture methods for marine fish larvae. Ontogeny and Systematics of Fishes Symposium, La Jolla, Ca. Aug. 15-18, 1983.
- Hunter, J.R. 1984. Inferences regarding predation on the early life stages of cod and other fishes. En: The propagation of cod *Gadus morhua* L. (E. Dahl., D.S. Danielssen, E. Moksness y P. Solemdal, Eds.) Flodevigen rapportser, 1: 533-562.
- Hunter, J.R. and C. Kimbrell. 1980. Eggs cannibalism in the northern anchovy, *Engraulis mordax*. Fish. Bull. U.S. 78 (3): 811-816.
- Hunter, J.R. y G.L. Thomas. 1974. Effect of prey distribution and density on the searching and feeding behavior of larval anchovy *Engraulis mordax* (Girard). p.559-574 In: Blaxter, J.H.S. (ed.) The Early Life History of Fish. Springer-Verlag, Berlin. 765p.
- Johannes, R.E., S.J. Coward, and K.L. Webb. 1969. Are dissolved amino acids an energy source for marine invertebrates? Comp. Biochem. Physiol. 29: 283-288.
- Jorgensen, B.C. 1976. August Putter, August Krogh, and modern ideas of the use of dissolved organic matter in aquatic environments Biol. Rev. 51: 291-328.
- Josefsson, B. 1973. Determination of dissolved organic compounds in natural waters. Department of analytical chemistry. Goteborgs Universitet Sweden 1 -45 pp. Tesis doctoral.
- Kramer, D. y J.R. Zweifel .1970. Growth of anchovy larvae , *Engraulis mordax* in the laboratory as influenced by temperaturep. CalCOFI Rep. XIV: 84 -87.
- Krogh, A. 1934 a . Conditions of life in the ocean . Ecol. mono. 421- 429.
- Krogh, A. 1934 b. Conditions of life at great depths in the ocean. Ecol. mono. 4, 430-439.
- Lasker, R. 1975. Field criteria for survival of anchovy larvae: the relation between inshore chlorophyll maximum layers and succesful first feeding fish. Bull. U.S. 73 (3): 453-462.
- Lasker, R. 1978 . The relation between oceanographic conditions and larval anchovy food in the California current: identification of factors contributing to recruitment failure. Rapp. p.-v. . Reun. Cons. int Explor. Mer. 173: 212-230.
- Lasker, R. 1981. Factors contributing to variable recruitment of the northern anchovy (*Engraulis mordax*) in the California Current: Contrasting years, 1975 through 1978. Rapp. p.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer. 178: 375-388.

- Lasker, R., H.M. Feder, G.H. Theilacker y R.C. May. 1970. Feeding, growth and survival of *Engraulis mordax* larvae reared in the laboratory. Mar. Biol. 5 (4): 345-353.
- Lasker, R. and G.H. Theilacker. 1962. Oxygen consumption and osmoregulation by single pacific sardine eggs and larvae *Sardinops caerulea* G. J. Cons. int. Explor. Mer. 27: 25-33.
- Lasker, R. and Threadgold, L.T. 1968. "Chloride Cells" in the skin of the larval sardine. Exptl. Cell. Res. 52: 582-590.
- Lee, C. and J.L. Bada. 1977. Dissolved amino acids in the equatorial pacific, the Sargasso Sea and Byscaine Bay. Limnol. Oceanogr. 22: 502-510.
- Leong, R. 1971. Induced spawning of the northern anchovy, *Engraulis mordax* Girard. Fish. Bull. U.S. 69 (2): 357-360.
- Lucas, C.E. 1949. External metabolites and ecological adaptation. Symp. Soc. Exp. Biol. 2n: 336-356.
- Lucas, C.E. 1961 a. On the significance of external metabolites in ecology Symp. Soc. Exp. Biol. 15: 190-206 pp.
- Lucas, C.E. 1961 b. Interrelationships between aquatic organisms mediated by external metabolites. In M. Sears (ed) Oceanography. A.A.A.S., Washington, D.C. pp 419-517 (publish. Am. Ass. Advent. Sci. 67.)
- Mais, K.F. 1974. Pelagic fish surveys in the California Current. Calif. dept. Fish and Game. Fish. Bull. (162): 79p.
- Manahan, D.T. 1982. The role of dissolved organic material in the nutrition of bivalve larvae. Ph.D. Diss. University of Wales, United Kingdom.
- Manahan, D. T. y Dennis J. Crisp. 1982. The role of dissolved organic material in the nutrition of pelagic larvae: Amino acid Uptake by Bivalve Veligers. Amer. Zool., 22: 635-646.
- Manahan, D.T. and Dennis J. Crisp. 1983. Autoradiographic studies on the uptake of dissolved amino acids from sea water by bivalve larvae. J. Mar. Biol. U.K. 63, 673-682.
- May, R.C. 1971. Effects of delayed initial feeding on larvae of the grunion, *Leuresthes tenuis* (Ayres) .U.S. Fish. Bull. 69: 411-425.
- May, R.C. 1974. Larval mortality in marine fishes and the critical period concept, p. 3-19. En: Blaxter, J.H.S. (ed.). The early life history of fish Springer-Verlag, Berlin. 765 pag.
- Moffatt, N.M. 1981. Survival and growth of northern anchovy larvae on low zooplankton densities as affected by the presence of a

- Chlorella* sp bloom. Rapp. P.-v. Reun. Cons. Perm. int. Explor. Mer. 178: 475-486.
- Neunes, H.W. y G.F. Pongolini. 1965. Breeding a pelagic copepod, *Euterpina acutifrons* (Dana), in the laboratory. Nature. 208: 571-573.
- North, B.B. 1975. Primary amines in California coastal waters: Utilization by phytoplankton. Limnol and Oceanogr. 20: 20-27.
- O'Connell, Ch. P. y L.P. Raymond. 1970. The effect of food density on survival and growth of early post-yolk sac larvae of the northern anchovy (*Engraulis mordax* G.) in the laboratory. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 5: 187-197.
- Parrish, R.H., C.S. Nelson, y A. Bakun. 1981. Transport mechanisms and reproductive success of fish in the California Current. Biol. Oceanogr. 1 (2): 175-203.
- Potts, W.T.W. and P.P. Rudy. 1969. Water balance in the eggs of the Atlantic salmon *Salmo salar*. J. Exp. Biol. 50:223-237.
- Quiñonez Velázquez, C. 1985. Utilización de material orgánico particulado como fuente de alimento por larvas de la anchoveta norteña *Engraulis mordax* Girard. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Tesis de Maestría en Ciencias, Ensenada, Baja California, México. 91 pp.
- Rice, M. A., K. Wallis and G. C. Sephens. 1980. Influx and net flux of amino acids into larval and juvenile european flat oysters, *Ostrea edulis* (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 48: 51-59.
- Riley, J.D. 1966. Marine fish culture in Britain VII. Plaice *Pleuronectes platessa*. post-larval feeding on *Artemia salina* L. nauplii and the effects of varying feeding levels. J. Cons. Perm. int. Explor. Mer. 30 (2) : 204-221.
- Rodríguez Murillo, J.A. 1983. Efecto de bajas densidades de alimento y concentraciones variables de *Tetraselmis* sp. en el crecimiento y supervivencia de estadios larvales de la anchoveta norteña *Engraulis mordax* G. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Tesis de Maestría en Ciencias Ensenada, B.C. México. 80 p.
- Saunders, G.W. 1957. Interrelations of dissolved organic matter and phytoplankton. Botanical Rev. 23 (6): 389-410.
- Scura, E.D. y Ch. W. Jerde. 1977. Various species of phytoplankton as food for larval northern anchovy, *Engraulis mordax* and relative nutritional value of the dinoflagellates *Gymnodinium splendens* and *Gonyaulax polyedra*. Fish. Bull. U.S. 75(3): 577-583.
- Shanklin, D.R. 1959. Studies on the *Fundulus* corion. J. Cell. Comp. Physiol. 53: 1-12. Shelbourne, J.E. 1957. The feeding

- and condition of plaice larvae in good and bad plankton patches. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 35: 539-552.
- Siebers, D. 1982. Bacterial-invertebrate interactions in uptake of dissolved organic matter. Amer. Zool. 22: 723-733.
- Siebers, D. y H. Rosenthal. 1977. Amino-acid absorption by developing herring eggs. Helgolander Wiss. Meeresunters. 29: 464 - 472.
- Siegel, A & E.T. Degens. 1966. Concentration of dissolved amino acids from saline waters by ligand exchange chromatography. Science. 151: 1098-1101.
- Smith, P.E. 1981. Fisheries on Coastal Pelagic Schooling Fish. p. 1-32 En: Marine Fish Larvae. (R. Lasker, ed.). Univ. Wash. Press. 131pp.
- Stephens, G.C. 1982. Recent progress in the study of "Die Ernährung der Wassertiere und der Stoffhaushalt der Gewässer. Amer. Zool. , 22: 611-619.
- Stephens, G.C. y Schinske, R.A. 1958. Amino acid uptake in marine invertebrates. Biological Bulletin of the Marine Biological Laboratory Woods Hole, Mass. 115, 341-342 (abstr).
- Stephens, G.C. and R.A. Schinske. 1961. Uptake of amino acids by marine invertebrates. Limnol. and Oceanogr. 6: 175 -181.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1979. Biometria. H. Blume Ediciones, Madrid. 832 pp.
- Theilacker, G.H. y M.E. McMaster. 1971. Mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Mar. biol. 10: 183-188.
- Ukeles, R. 1965. A simple method for the mass culture of marine algae Limnol. oceanogr. 851-868.
- Warner, R.G. and J.H.S. Blaxter. 1980. Growth and survival of larvae herring *Clupea harengus* in relation to prey density Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 37 (7) 1063-1069.
- Williams, P.J. LeB. 1975. Biological and chemical aspects of dissolved organic material in sea water. In J.P. Riley and G. Skirrow (Eds.) Chemical Oceanography, vol. 2, pp 301-363. Academic Press, London.

