



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DEL EFECTO DE SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS
EN LA DIETA DE LAS LARVAS DE
Crassostrea gigas.**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

Martha Patricia Fernández García

México, D. F.

1985.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	Pág.
RESUMEN	1
1 INTRODUCCION.	2
1.1 OBJETIVO.	5
2 ANTECEDENTES.	6
3 MATERIALES Y METODOS.	11
3.1 PROGENITORES.	11
3.1.1 COLECTA Y TRANSPORTE.	11
3.1.2 SISTEMA DE MANTENIMIENTO EN EL LABORATORIO.	12
3.1.3 EXPERIMENTOS PREVIOS.	18
3.1.4 INDUCCION AL DESOVE	23
3.2 LARVAS.	25
3.2.1 FERTILIZACION Y OBTENCION DE LARVAS	25
3.2.2 SISTEMA DE MANTENIMIENTO DE LARVAS.	27
3.2.3 DENSIDAD DEL CULTIVO.	29
3.2.4 ALIMENTACION.	29
3.2.5 CONTROL DE VARIABLES FISICOQUIMICAS	32
3.2.6 REGISTRO DE DENSIDAD LARVAL	33
3.3 TRATAMIENTO ESTADISTICO	35
4 RESULTADOS.	39
4.1 VARIABLES FISICOQUIMICAS.	39
4.2 CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE LAS LARVAS	41
4.3 ANALISIS ESTADISTICO.	35
5 DISCUSION	52
6 CONCLUSIONES.	52
7 RECOMENDACIONES	65
LITERATURA CITADA	67

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1. Localización de la zona de colecta de los Adultos de <u>C. gigas</u> donde: A) Mina Vieja, B) Localización de la balsa.	13
2. Sistema de mantenimiento para los adultos de <u>C. gigas</u> (2 de 4): 1) Acuarios de 40 - lts., 2) Soportes de acrílico, 3) Entrada de agua recirculante, 4) Salida de agua - recirculante, 5) y 6) Salidas de agua superior e inferior, 7) Base de acústico, - 8) Nivel de agua, 9) Llaves de paso, 10) Unión Universal, 11) Salida de agua del - drenaje, 12) Cubierta del calentador, 13) Calentador, 14) y 15) Entrada y salida de agua del calentador, 16), 17) y 18) Man--guera, válvula e inyección de aire respec--tivamente, 19) Aireador, 20) Suministro - de agua, 21) Filtro de algodón plástico,- 22) Reservorio de agua, 23) Motobomba, -- 24) Cámara de distribución, 25) Válvula - de agua, 26) Manguera de agua.	15
3. Sistema de mantenimiento para las larvas de <u>C. gigas</u> . 1) Estanque de fibra de vi--	28

Lista de figuras (Cont.)

Pág.

- drio, 2) Salida de agua del estanque, 3) Unión universal, 4) Filtro de carbón activado, 5) Calentador, 6) Retorno de agua, - 7) Inyección de aire, 8) Sistema de difusión para el baño maría, 9) Nivel de agua 10) Sistema de aire, 11) Cámara de distribución del aire, 12) Mangueras de aire, - 13) Cubetas de plástico (10 1).
4. Comportamiento del error experimental en función del número de larvas. 36
5. Relación entre la longitud y el ancho de las larvas de C. gigas. 37
6. Registro de variables físicoquímicas. A) Concentración de pH, B) Concentración de oxígeno disuelto, C) Concentración de Amonio. Los números indican cada tratamiento. 40
7. Curva de crecimiento de las larvas. Línea de regresión y cinturón de confianza al - 5%. A) Dieta 1, B) Dieta 2. 44
8. Curva de crecimiento de las larvas. Línea de regresión y cinturón de confianza al - 5%. A) Dieta 5, B) Dieta 6. 45

9. Curvas de sobrevivencia para cada tratamiento. 46
10. Diagrama de Conectividad entre dietas. - 51
Prueba de SNK al 5%. Los números indican las dietas. Las líneas indican diferencias no significativas.

LISTA DE TABLAS.

	Pág.
I. Combinación y concentración de los tratamientos durante el experimento.	30
II. Crecimiento y sobrevivencia de las larvas de <u>C. gigas</u> en cada dieta experimental. (Tamaño inicial de las larvas = 774) - =Cero incremento; - = Cero sobrevivencia.	42
III. Análisis de Covarianza.	48
IV. Prueba de Student-Newman-Keuls al 5% - para el día 22.	50

RESUMEN.

Se obtuvieron larvas de Crassostrea gigas en condiciones de laboratorio; desarrollando las técnicas de cultivo apropiadas para el acondicionamiento de los progenitores; inducción al desove y fertilización.

Se diseñó un sistema para el mantenimiento de los progenitores, el cual permite una circulación del agua abierta al sistema general y/o una circulación cerrada únicamente entre dos acuarios; puede recibir un flujo de agua continuo de velocidad regulable, lo cual permite estudiar la tasa de renovación de agua en el sistema. La temperatura se puede elevar en un intervalo de 1 a 5°C en 24 horas. El nivel del agua se mantuvo constante y su limpieza puede realizarse diariamente, sin necesidad de perturbar a los organismos.

Se llevó a cabo un experimento para evaluar la alimentación de las larvas de C. gigas, probándose un total de 10 dietas alimenticias diferentes con una duración de 24 días.

Un alimento consistió únicamente de la microalga Pseudoisochrysis paradoxa y los nueve restantes en diversas combinaciones de esta microalga con dos suplementos alimenticios: almidón de maíz y miel de abeja, ambas en concentraciones diferentes.

Durante el experimento se registró la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, ph y concentración de amonio del agua, se registró sobrevivencia y crecimiento de las larvas con el fin de valorar la eficiencia de las dietas probadas.

Se empleó la prueba estadística de optimización máxima de recursos para conocer el comportamiento del error experimental en función del número de larvas, lo cual proporciona con base en el esfuerzo invertido en el desarrollo del experimento, el tamaño de muestra que debe tomarse para el manejo adecuado de los resultados.

La combinación de la microalga P. paradoxa con almidón de maíz en una concentración de 0.9 ppm resultó ser la mejor dieta para los cultivos larvales en las condiciones físico-químicas y densidad a los cuales se mantuvieron durante este experimento.

ESTUDIO DEL EFECTO DE SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS
EN LA DIETA DE LAS LARVAS DE
Crassostrea gigas.

1 INTRODUCCION.

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

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

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

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

En la actualidad aún se depende en gran medida de la importación de semilla del ostión C. gigas de E.U.A., pero se hacen esfuerzos en Baja California Norte, Sur y Sonora principalmente, para adaptar la biotecnología. El laboratorio experimental de producción de semilla del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (I.I.O.) de la Universidad Autónoma de Baja California (U.A.B.C.), fue diseñado para satisfacer los requerimientos de semilla en Bahía San Quintín a un nivel comercial con una capacidad de producción de 15 millones de fijaciones en 6 meses. (Islas-Olivares, op. cit.). Por otra parte, en algunas cooperativas de la región (Eréndira y Bahía San Quintín) se realizan intentos para la producción de su propia semilla.

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

Uno de los puntos que más atraen la atención en estos estudios es el de la alimentación, pues a la fecha y aunque mucho se ha escrito al respecto, no se ha elaborado ningún alimento en fórmula, que proporcione una dieta balanceada

a los ostiones en los primeros estadios de desarrollo, y de hecho no se sabe cuales son los elementos que pudieran componer una dieta balanceada (Wheaton, 1982).

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

En la investigación realizada por Paniagua-Michel y Granados-Machuca, (1981), se desarrolló un medio de cultivo para las microalgas Skeletonema costatum y Monochrysis Lutheri a base de productos biodigeridos (excretas de vaca, de gallina y macroalgas) no encontrando una diferencia significativa en el crecimiento de las microalgas así cultivadas en comparación con las cultivadas en el medio químico de Matthiessen y Toner (1966). Sin embargo, sugieren probar el valor nutritivo de las microalgas cultivadas en el medio orgánico para detectar su efecto en el crecimiento y vigor de las larvas de moluscos. De resultar un alimento satisfactorio, el costo de producción de semilla sería reducido, ya que el medio orgánico es considerablemente menos costoso que el medio químico.

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

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

1.1 OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo es el de utilizar el almidón de maíz y/o la miel de abeja como suplementos alimenticios en combinación con la microalga Pseudoisochrysis paradoxa para mantener cultivos de larvas de C. gigas evaluando su alimentación a través de sus respuestas de sobrevivencia y crecimiento.

2 ANTECEDENTES.

La investigación sobre la alimentación de larvas de moluscos, se remonta desde el empleo de organismos filtrados directamente del mar (Windsor, 1977).

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

Davis (1953) observa que el tipo de alimento que -- pueden ingerir las larvas de C. virginica está limitado por el tamaño de la partícula o del microorganismo.

Mackie (1969) establece que las larvas de ostión -- son capaces de seleccionar las microalgas que varían de 1 a 30 micras; aunque el tamaño es importante, los trabajos de Davis y Guillard (1958) demuestran que el grosor de la pared de las microalgas y el grado de toxicidad de sus metabolitos, -- son factores importantes que determinan su asimilación por -- las larvas.

La microalga Pseudoisochrysis paradoxa utilizada en esta investigación, tiene una dimensión promedio de 6 micras, presenta dos flagelos que la movilizan. El tamaño, resistencia y rápido crecimiento en laboratorio, la hacen un alimento muy accesible. Su valor nutritivo es alto cuando se combina con Pyramimonas virginica y Chlorella sp. (Windsor, op.cit.)

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

A raíz de las investigaciones realizadas para encontrar "el mejor alimento" para las larvas cultivadas, se han desarrollado tantas dietas como autores han trabajado sobre el tema y existe una gran divergencia en cuanto a utilizar determinadas especies de algas ya sea en forma individual o en sus combinaciones. En general, la mayoría de los autores coinciden en que una dieta consistente en más de una especie de microalgas, promueve un crecimiento más rápido y proporciona más requerimientos nutricionales que las dietas consistentes en una sola especie (Walne, 1979; Windsor, 1977; Gallager y Mann, 1981). Además Gerdes (1983) menciona que una alimentación a base de una mezcla de microalgas induce a las larvas a tomar más alimento que en las dietas constituídas por un monocultivo. Sin embargo, en el trabajo de Nascimento-Iracema, op.cit. se indica que al alimentar larvas de C. gigas con --

Chaetoceros calcitrans, resulta en una tasa de crecimiento -- más alta que cuando se utiliza una mezcla de C. calcitrans -- con I. galbana.

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

Los estudios de Millar y Scott (1967) y Holland y - Spencer (1973) establecen que el crecimiento de la larva de - Ostrea edulis, se correlaciona positivamente con la cantidad de lípidos que contiene el animal. Helm (1973), Holland (1978) citados por Nascimento-Iracema (op.cit.) y Helm et. al. - - (1973); destacan la importancia de los lípidos como principal reserva de energía en las larvas de ostión y sugieren que en cualquier intento para asegurar la calidad de las larvas, la presencia de los lípidos es de especial importancia.

Devel (1957) menciona que existen evidencias en los moluscos adultos de la transformación de carbohidratos a grasas, sin embargo, puede suceder un cambio inverso, por lo que ácidos grasos con glicerol pueden producir triacilglicéridos o glicógeno. Los ácidos grasos y glicerol se absorben a través del intestino y de los ductos del diverticulum digestivo y se almacenan en grandes vacuolas del tejido conectivo (George, 1952). Sin embargo, las larvas de ostión son capaces de - tomar compuestos orgánicos disueltos en el agua del cultivo -

(Davis y Chanley, 1956); por lo que se debe considerar con atención la exposición intra y extracelular de las larvas a los nutrientes en que fueron cultivadas las microalgas que reciben como alimento (Windsor, op.cit.).

Davis (1950) citado por Windsor (1977), menciona -- que la adición de extracto de glucosa y almidón disuelto a -- los cultivos larvales no es adecuado en bajas concentraciones y que a mayores concentraciones sólo promueve densos florecimientos de bacterias y una alta mortalidad en las larvas. Sin embargo, Haven (1965); Dupuy (1975); Dupuy et al. (1977); -- Creekman (1977); y Windsor (1977), alimentaron ostiones adultos en el laboratorio con un suplemento de almidón de maíz mejorando notablemente su condición. El mecanismo principal mediante el cual asimilan el almidón, es por la presencia de la lipasa, enzima secretada por el estilo cristalino y por la secreción de amilasa, enzima capaz de hidrolizar el almidón a carbohidratos (Van Weel, 1961).

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

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

La miel de abeja que se utilizó fue producida en el Valle de Mexicali, cerca del Río Colorado. Es importante considerar la fuente vegetal de la que proviene, pues de ello depende su composición. Las principales plantas de las que se obtiene la materia prima fueron: Berthelotia sericea ("Cachanilla"); Tamarix aphylla ("Tamarix"); Gossypium sp. ("Algodón") y Viburnum americanum ("Gobernadora") (Pellet, 1977). Siendo básicamente un carbohidrato la levulosa y la dextrosa son los azúcares simples que forman la mayor parte de la miel, (95% de los sólidos), contiene además 18 ácidos orgánicos con grados variables de certidumbre y de 11 a 21 diferentes aminoácidos libres, vitaminas y enzimas.

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

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 PROGENITORES

3.1.1 COLECTA Y TRANSPORTE.

Los ostiones que se utilizaron como progenitores durante este estudio, forman parte del proyecto "Transferencia de energía en ostras de la especie Crassostrea gigas", del Laboratorio de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, (CICESE).

Este proyecto se lleva a cabo en Bahía San Quintín localizada en la costa Noroccidental de Baja California entre los 30°24' y 30°30'N y 115°57' y 116°01'W a 200 - km. al sur de la Ciudad de Ensenada, B.C.

En este lugar se encuentran ubicadas una serie de estaciones experimentales en las cuales se colocaron -- balsas de 6x3 metros construídas con tubos plásticos de ABS de 4" de diámetro con una red semirígida de plástico, sumergidas a 1.0 metro de la superficie. En éstas - balsas se colocaron semillas de ostión de C. gigas (Octubre de 1981), originarias de Peugeon Point Ca. cuyo - tamaño inicial era de 3.0-4.0 mm. y que alcanzaron la - talla comercial de 8 a 10 cms. aproximadamente en 7 meses (Acosta, com.pers. CICESE.).

La zona de Bahía San Quintín se caracteriza por ser un cuerpo de agua fértil, con una variación de tempera-

tura anual de 15 a 19°C con un máximo de productividad primaria de 0.9 g. C/m³/día en verano (Lara-Lara y Alvarez Borrego, 1975).

La figura 1 muestra la ubicación de la balsa de la cual se obtuvieron los progenitores. Se colectaron 50 - ostiones cuya talla variaba de 8 a 16 cms. en longitud antero-posterior; éstos se acomodaron en una hielera poniéndoles una base de pasto marino y macroalgas que se encontraban en la balsa, para evitar "stress" por efecto mecánico y conservarles la humedad durante su transporte al laboratorio de Acuicultura del CICESE.

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

3.1.2 SISTEMA DE MANTENIMIENTO EN EL LABORATORIO.

El laboratorio de Acuicultura del CICESE tiene un sistema de circulación de agua cerrado, el cual se mantiene por medio de dos filtros biológicos con una capacidad de almacenamiento de 7 metros cúbicos de agua.

En el lugar en que se encuentran los acuarios hay llaves de paso para tomar de las redes de distribución agua dulce, agua de mar y agua de mar pasada por un sistema de esterilización con luz ultravioleta (U.V.), el cual consta de 10 lámparas y tiene una capacidad de 50

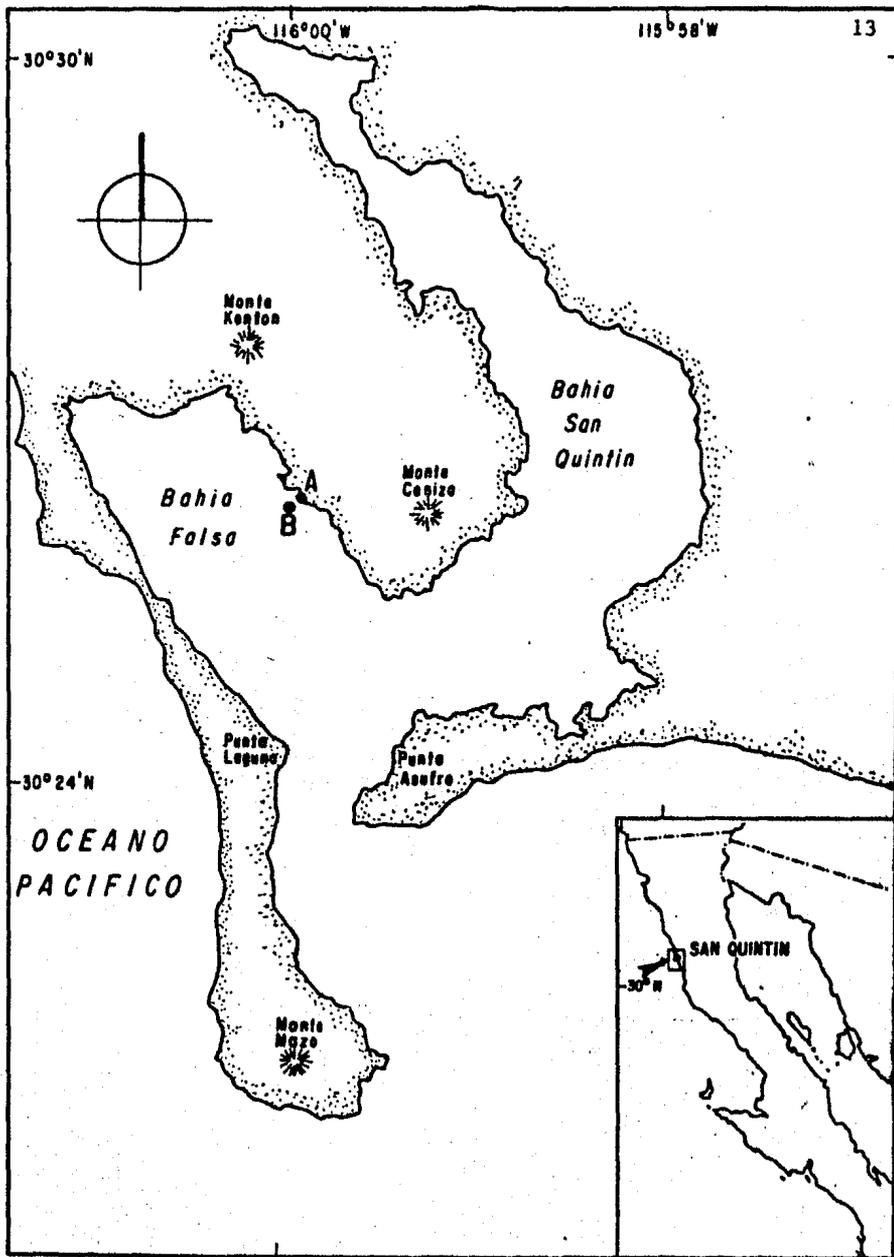


Fig. 1.-Localización de la zona de colecta de los adultos de *C. gigas* donde: A) Mina Vieja, B) Localización de la Balsa.

gal/min. el aire proviene de un Rotron DR modelo DR 55 K72 de 3 HP. con una capacidad de $5.5 \text{ m}^3/\text{min}$.

El sistema que se diseñó para el acondicionamiento de los progenitores se muestra en la figura 2. Consta de 4 acuarios (Fig.2-1) con capacidad de 40 litros cada uno, a los cuales se les hicieron 4 perforaciones que permitieron un sistema de circulación abierta.

Las perforaciones en las paredes del acuario (Fig.2 3,2-4,2-5) tienen un diámetro de $1/2''$ y se encuentran colocadas a una distancia del marco superior del acuario de 2,12 y 4.5 cms. respectivamente. La perforación en el centro de la base del acuario (Fig.2-6) tiene un diámetro de $3/4''$. Cada orificio de la pared del acuario se reforzó con cuadros de acrílico (Fig.2-2) adheridos a la pared del acuario con pegamento y silicón.

Los organismos se colocaron sobre una base de acústico (similar a una rejilla de plástico) (Fig.2-7) para permitir que las excretas se depositaran en el fondo.

El sistema puede funcionar con circulación continua abierta hacia el sistema general del laboratorio o con circulación cerrada únicamente entre 2 acuarios. La limpieza se realiza abriendo la llave de paso del fondo del acuario (Fig.2-9) la cual descarga hacia el drenaje del sistema (Fig.2-11).

En cualquier momento en que fuera necesario separar un acuario del sistema, ésto se podía hacer por medio de las uniones universales (Fig.2-10), quedando el otro acuario en funcionamiento.

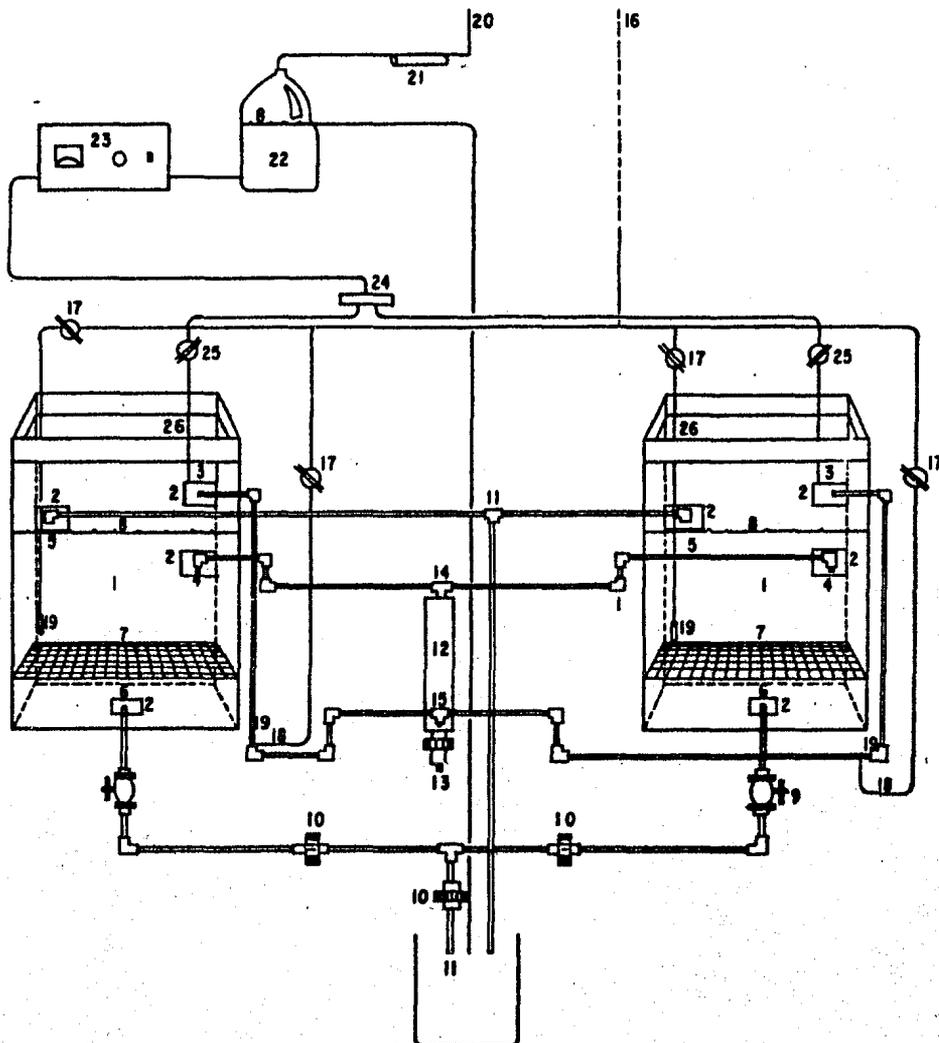


FIG. 2 - Sistema de mantenimiento para los adultos de *C. gigas*. (2 de 4):

1) Acuarios de 40 lts., 2) Soportes de acrílico, 3) Entrada de agua recirculante, 4) salida de agua recirculante, 5) y 6) salidas de agua superior e inferior, 7) base de acústico, 8) nivel de agua, 9) llaves de peso, 10) union universal, 11) Salida de agua al drenaje, 12) cubierta del calentador, 13) calentador, 14) y 15) entrada y salida de agua al calentador, 16), 17) y 18) manguera, valvula e inyección de aire respectivamente, 19) alrededor, 20) suminietro de agua, 21) filtro de algodón plastico, 22) reservorio de agua, 23) motobomba, 24) cámara de distribución, 25) valvula de agua, 26) manguera de agua.

La circulación continua abierta se hizo por medio - de una motobomba (Ministaltic-Manostat) con capacidad - máxima de 1800 ml/min. (Fig.2-23) que permite ajustar - el fluido de entrada de agua al acuario y determinar la tasa de renovación deseada. Un reservorio de agua (Fig. 2-22) sirve para permitir una entrada continua de agua a la motobomba. Con una velocidad de entrada de 200 ml/min. el acuario tiene una tasa de renovación de 7 veces en 24 horas.

El agua de mar (Fig.2-20) pasa por un filtro de algodón plástico y carbón activado (Fig.2-21) que elimina gran cantidad de detritus y partículas grandes que pudieran venir del sistema general e introducirse en el acuario.

Una cámara hecha de tubo de PVC con orificios (Fig. 2-24) distribuye el agua a los 4 acuarios y su entrada a éstos es a su vez regulada por llaves de paso de teflón (Fig. 2-25).

El agua entra al acuario por una manguera Nalgene - 8000 esterilizable, no tóxica, de 1/8" de diámetro - - (Fig.2-26) y sale directamente al drenaje del sistema - general (Fig.2-11) por el orificio de salida (Fig.2-5), el cual se encuentra a un nivel más bajo que el orificio de entrada del agua recirculante al acuario (Fig. 2-3) de tal manera que no se corre el riesgo de un derrame por desigualdad del flujo en el sistema, manteniendo siempre su nivel (Fig.2-8).

La circulación continua cerrada entre dos acuarios

se realizó cortando el flujo de agua de entrada al sistema y permitiendo la salida de agua de los acuarios por el orificio medio (Fig.2-4) y retornándola por medio de una inyección de aire (Fig. 2-18) que pasa por una piedra de aireación (Fig.2-19) impulsando el agua hacia el orificio de entrada al acuario (Fig.2-3).

El agua que sale del acuario por el orificio medio (Fig.2-4) pasa por el calentador EBO-JAGER de 100 watts (Fig.2-14), teniendo la opción de poder regular la temperatura deseada. El calentador (Fig.2-13) se encuentra dentro de un tubo PVC de 3/4" de diámetro (Fig.2-12) y puede elevar la temperatura de los acuarios hasta 26°C, con circulación abierta al sistema general, y hasta 30°C con circulación cerrada entre los acuarios en un período de 24 horas.

Una tercera opción del sistema de mantenimiento, es dejar desconectado el calentador para mantener la temperatura del sistema general del laboratorio. Una vez que el agua sale del calentador (Fig.2-15) regresa al acuario por medio de una inyección de aire (Fig.2-18) regulando su presión mediante una válvula de aire (Fig.2-13) y al final de la manguera (Fig.2-16) con una piedra de aireación (Fig.2-19) que tiene una mayor superficie de contacto con el agua, provocando una mayor aireación del agua que retorna al acuario por el orificio de entrada (Fig.2-3).

Debido al sistema de circulación dentro del acuario, se presentan corrientes que ayudan a mantener el alimento en suspensión, no obstante, si en algún momento se -

cortaba la circulación del agua, se tenían piedras de aireación suspendidas en el centro del acuario (Fig.2--19) para permitir una aireación continua.

3.1.3 EXPERIMENTOS PREVIOS.

Los desoves naturales de C. gigas en Bahía San Quintín ocurren a finales de verano y principios de otoño - (Acosta, com.pers.), los primeros ostiones que se colectaron en primavera para ensayos preliminares en laboratorio, no presentaban aún madurez gonadal, por lo que se decidió intentar un período de acondicionamiento en el laboratorio con el fin de probar el funcionamiento del sistema de mantenimiento para los adultos antes de realizar el experimento de alimentación de las larvas.

Este sistema (Fig.2) se modificó ajustándole un serpentín de refrigeración Blue M modelo PCC-24A-3 capacidad 3400 BTU/hr. de manera que la temperatura del agua se mantuvo a 15°C tratando de igualar las condiciones físicoquímicas del lugar en que los ostiones fueron colectados. Posteriormente se elevó 1°C diariamente hasta alcanzar 21°C (Lossanoff y Davis, 1963). Sin embargo, los ostiones no abrieron sus valvas en los rangos más bajos registrándose además una alta mortalidad. Los ensayos posteriores se llevaron a cabo colocando los progenitores a la temperatura promedio del sistema en el laboratorio (20°C).

Para observar periódicamente la madurez de los pro-

genitores, se sacrificaron especímenes con el fin de observar el tamaño y coloración de la gónada.

También se intentó conocer el sexo y grado de madurez de los progenitores a través de una pequeña perforación hecha en la concha a la altura de la gónada, extrayendo con una jeringa, una muestra de los productos sexuales que se observaron al microscopio. Los progenitores se marcaron externamente, con un círculo a las hembras y con una línea a los machos.

El orificio que se hizo en la concha se selló con silicón no tóxico, observándose que con la presión interna del organismo, éste tapón se desprendía al día siguiente. Posteriormente se probó con una mezcla de yeso lo cual dio un excelente resultado, pues organismos que permanecieron vivos después de un mes, tenían el orificio en su parte interna perfectamente sellado.

Para la alimentación de los adultos en laboratorio existen varios antecedentes de diversos tipos de microalgas que han sido aprobadas como "buenos alimentos" para su mantenimiento; además de otras fuentes alimenticias como las mencionadas por Mitchel (1915), quien proporciona evidencias de que los protozoarios y los fragmentos de la macroalga Ulva lactuca pueden servir como alimento.

En su periodo de acondicionamiento, los adultos se alimentaron con las microalgas Tetraselmis suecica, Pseudoisochrysis paradoxa, extracto de la macroalga Ulva lactuca, almidón de maíz y miel.

Las microalgas se cultivaron en estanques de fibra de vidrio de 400 litros de capacidad. En la parte superior de los estanques se colocaron dos lámparas tipo luz fría (Phillips, 40 watts) de 1.83 metros de largo - cada una.

El medio de cultivo que se utilizó para reproducir las microalgas fue el de Matthiessen y Toner, (1966) y la composición para la preparación de nutrientes fue la siguiente: Nitrato de Sodio (150 g/l); Fosfato de Sodio (10 g/l); E.D.T.A. más minerales (10 g/l) y vitaminas - (B12, Tiamina y Biotina), la esterilización del medio de cultivo se realizó siguiendo los procedimientos descritos por Hemerick, (1973).

La inoculación de las microalgas, se realizó tomando 50 mililitros del medio de cultivo en un Erlenmeyer y se transfirió 1 mililitro de la cepa previamente cultivada en el laboratorio a un tubo de ensayo. Cuando el matraz Erlenmeyer alcanzó la máxima densidad celular, se vació a "Carboys" (recipientes de vidrio) de 18 litros de capacidad hasta alcanzar su máxima densidad, - posteriormente se vertió a los estanques de fibra de vidrio nivelados a 100 litros de su capacidad y fertiliza dos diariamente agregando 1 mililitro del medio de cultivo por cada litro de agua de mar.

Se realizaron recuentos diarios del número de células en el cultivo, tomando una muestra de 50 mililitros de diversos puntos del cultivo y agitándola. De esta muestra se fijaba 1 mililitro mediante la solución de -

Ütermohl; se añadían 9 mililitros de agua destilada, y después de agitarse se cargaba la cámara de conteo (Hauser Scientific de 0.2 mm.) con dos a tres gotas de la muestra.

La fórmula para la estimación de la densidad celular fue:

$$\text{Concentración celular} = \text{N.D.} \times \text{F.D.} \times \text{V.T.}$$

Donde:

N.D. = Número de células contadas.

F.D. = Factor de dilución (mililitros).

V.T. = Volumen total del cultivo (mililitros).

Se determinó la fase de crecimiento exponencial de las microalgas graficando el número de células contra el tiempo. Esta fase se obtenía a las dos semanas de vida del cultivo. Las condiciones fisicoquímicas se mantuvieron en una temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, Salinidad de 32‰ y un pH de 8.

Con el fin de asegurar su buena calidad nutritiva, se trataban de cosechar en la fase de crecimiento exponencial del cultivo. Para cada acuario se tomaban 2.5 litros de T. suecica y 2.5 litros de P. paradoxa.

En la zona de Bahía San Quintín se colectó la macroalga Ulva lactuca. Esta se molía en una licuadora durante 5 minutos y después se filtraba por una malla de 12 micras. De esta solución se tomaban 300 mililitros para agregar en cada acuario.

Se disolvieron 2 gramos de almidón de maíz en 100 mililitros de agua de mar, los cuales se calentaron du-

rante 5 minutos evitándose alcanzar el punto de ebullición. Con el calor se producía la conversión del almidón en amilosa y amilopectina (Haven, 1965). El almidón precalentado permanece por más tiempo en suspensión en el agua de los acuarios. Con el fin de igualar el tamaño de las partículas, el almidón se pasó por un tamiz de 35 micras antes de introducirlo a las dietas.

Dos gramos de miel se disolvieron en 100 mililitros de agua de mar.

Las cantidades mencionadas para cada alimento se -- agregaron a los acuarios dos veces al día.

Al suministrarse el alimento a los acuarios, el sistema permanecía funcionando en circulación cerrada por el lapso de una hora. Después se volvía a abrir el sistema a la modalidad de circulación abierta con un flujo de 200 ml/min. Según Walne (1974) para ese flujo la tasa de filtración de un ostión de 7-8 cms. de longitud y a una temperatura de 20 a 21°C es de 130 ml/min.

Los acuarios se limpiaron diariamente debido a la alta tasa de excreción de los ostiones (0.63 gramos en promedio de peso seco por ostión por semana) (Nishikawa 1977).

Los progenitores mantenidos a una temperatura de -- 20°C, salinidad de 32%. y oxígeno a saturación (7.9 a -- 8.2 mg/l) en el sistema de circulación continua y con -- la dieta probada en el laboratorio sobrevivieron al período de verano presentando la gónada blanquecina y buenos reflejos de apertura y cierre de sus valvas. Se lo-

graron algunos desoves pero debido a que no se cuantificaron los efectos de esta nueva dieta en la condición fisiológica de los ostiones y dado que se sabe que el período y tipo de acondicionamiento de los adultos repercute directamente en el desarrollo y vigor de sus larvas (Creeckman, 1977), se decidió trabajar con los desoves de los ostiones adultos traídos directamente de la balsa.

Los meses en que se realizó el experimento coincidieron con la época de madurez gonadal natural de los ostiones en Bahía San Quintín.

Antes de inducir al desove al nuevo grupo de progenitores, éstos se colocaron en el sistema de circulación continua y se mantuvieron sin alimento por un período de 24 horas, con el fin de que limpiaran su tracto intestinal (Breese y Malcuf, 1974).

3.1.4 INDUCCION AL DESOVE.

El desove se llevó a cabo utilizando un estanque de fibra de vidrio en el que se colocaron los progenitores con agua de mar recirculada por el sistema ultravioleta.

Por lo general, un organismo que responde cerrando repentinamente sus valvas al sentirse externamente perturbado, refleja un buen estado de salud. Debido a que en este trabajo no se registraron índices de condición fisiológica, los progenitores se eligieron empíricamente, considerando los que respondían más rápidamente a un es

tímulo externo.

Para la inducción al desove se elevó la temperatura del agua de 25 a 28°C en un período de 30 minutos fluctuando levemente en ese rango. Esto permitió a los adultos colocados en agua recirculante, bombear y eliminar materia fecal antes de iniciar el desove (Breese y Malouf, 1974). Sin embargo, el calentamiento del agua de mar puede provocar una sobresaturación con gases atmosféricos y los ostiones expuestos a estas condiciones llegan a formar burbujas de gas entre los filamentos branquiales y sobre el tejido del manto, pudiendo causar su muerte. Para prevenir la formación de estas burbujas, se inyectó aire en el estanque reduciendo con esto la concentración de gases atmosféricos disueltos en el agua de mar. (Dupuy y Rivkin, 1972; Malouf et al., 1973).

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

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

3.2 LARVAS.

3.2.1 FERTILIZACION Y OBTENCION DE LARVAS.

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

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

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

Cada 5 minutos se tomaron muestras para revisar en el microscopio; si en 25 minutos la mayoría de los hue-

vos presentaban de 3 a 4 divisiones, se consideraba una buena fertilización (Gendrop-Funes, com.pers., I.I.O.). Los huevos fertilizados fueron tamizados por una malla de 10 micras para eliminar el exceso de esperma.

El conteo de los huevos se hizo en un volumen conocido de agua, en este caso de 4 litros. Se uniformó la muestra con un agitador hecho con un mango y un disco de acrílico perforado. Se tomó 1 mililitro de la muestra y se aforó a 100 mililitros con agua de mar pasada por U.V. De este volumen se extrajo 1 mililitro de muestra y se contó al microscopio. Seguidamente los huevos se colocaron en 180 litros de agua de mar esterilizada (U.V.) a una temperatura de 25°C y una salinidad de 30‰. Se utilizó penicilina en una concentración de 0.3 mg/ml. como antibiótico para controlar la población bacteriana (Brereton et al., 1973; citado por Le Pennec y Prieur, 1977).

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

Posteriormente, las larvas se tamizaron por una malla de 45 micras, para eliminar los huevos que no se hubieran desarrollado. Las larvas se concentraron en 10 litros de agua de mar pasada por U.V. La densidad de calculó en la misma forma que la de los huevos, sólo que se utilizó una cámara de conteo similar a la

sedwick-rafter, pegando en los bordes de un portaobjetos, sin subdivisiones en la base, paredes de vidrio de 2 milímetros de alto aproximadamente, para formar la cámara que contenía la muestra tomada con una pipeta de 1 mililitro.

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

3.2.2 SISTEMA DE MANTENIMIENTO DE LARVAS.

El sistema utilizado para el cultivo de las larvas estuvo constituido por un estanque de fibra de vidrio - (Fig.3-1) que sirvió para mantener un baño maría que -- controló la temperatura de los recipientes a 25°C. Esto se logró recirculando agua dulce en el estanque manteniendo el nivel del agua (Fig.3-9). La salida de agua - del sistema (Fig.3-2) pasa por un filtro de carbón activado (Fig.3-4) y entra al calentador (Ebo-Jager 100 - - Watts) (Fig. 3-5). El retorno del agua (Fig.3-6) se llevó a cabo con inyección de aire (Fig.3-7) la cual desemboca a un tubo de PVC con varias perforaciones que atraviesa el estanque transversalmente (Fig.3-8) con el fin de distribuir uniformemente el agua caliente en el sistema.

Los recipientes donde se mantenían las larvas fueron cubetas de plástico de 10 litros de capacidad (Fig.

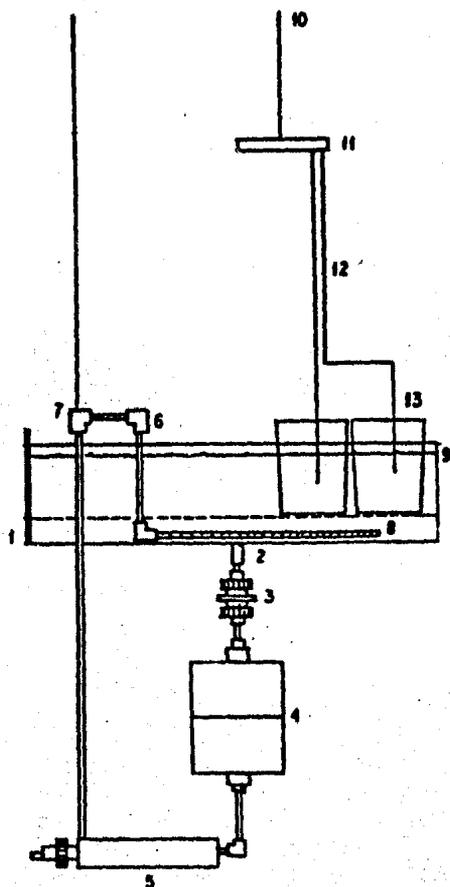


Fig. 3 Sistema de mantenimiento para las larvas de *C. gigas* (visto lateral)

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

3-13) con aireación individual. El sistema de distribución de aire (Fig.3-10) pasaba por dos cámaras intermedias (Fig.3-11) hechas de tubo PVC de 1/2" de diámetro, con 10 perforaciones cada una, para distribuir el aire en cada dieta experimental por medio de mangueras independientes (Fig.3-12). Cada manguera se selló en su parte final por medio de calor y se perforó tres veces con una aguja, con el fin de que salieran hileras finas de burbujas.

3.2.3 DENSIDAD DEL CULTIVO.

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

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

3.2.4 ALIMENTACION.

La tabla I muestra el régimen alimenticio llevado a cabo durante el experimento.

Las dietas experimentales están basadas en la mez--

TABLA I Combinación y concentración de los tratamientos durante el experimento.

DIETAS EXPERIMENTALES

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

CONCENTRACION DE LAS DIETAS

	SUPLEMENTOS				MICROALGAS (No. células /ml)	VOLUMEN DE AGUA (Lts.)	DENSIDAD LARVAL INICIAL (No. larvos/ml)
	A	e	M	m	P		
Peso en gramos	0.045	0.0045	0.45	0.045	30 x 10 ³ 1ª Semana 50 x 10 ³ 2ª Semana	5	10
Concentración ppm	9	0.9	90	9	80 x 10 ³ 3ª Semana		

P = Microalga *Pseudocostyrax paradoxa*

A = Almidón de maíz en concentración alta

M = Miel en concentración alta

e = en concentración baja

m = en concentración baja

cla de la microalga Pseudoisochrysis paradoxa con dos suplementos alimenticios. Estos suplementos fueron, almidón de maíz (Maizena) y miel de abeja, en dos concentraciones llamadas "alta" y "baja" y sus combinaciones, dando un total de 8 dietas diferentes más dos grupos -- control, uno sin alimento y otro alimentado únicamente a base de microalgas. Todos los tratamientos tuvieron una réplica.

La concentración de las microalgas para alimentar a las larvas, se basó en las densidades dadas por Breese y Malouf (1974), como óptimas para el desarrollo de las larvas de C. gigas, se le dio una concentración de 30×10^3 cel./ml. durante la primera semana, 50×10^3 cel./ml. en el transcurso de la segunda semana y 80×10^3 cel./ml. en la tercera.

Al tratar de igualar el contenido de carbohidratos en las dietas experimentales, se encontró que no se conoce el contenido exacto de este compuesto en las microalgas, y los valores que se encuentran, se refieren al fitoplancton en general. Por otra parte, no es posible comparar la cantidad de carbohidratos que existe en los suplementos alimenticios, ya que la miel sobrepasa por mucho al almidón de maíz. Debido a estos problemas, se optó por tomar un criterio considerando sólo el peso.

El peso de 1×10^6 células de Tetraselmis suecica es de 0.2 mg. (Helm et al., 1973). En la literatura, no se encuentra el peso para P. paradoxa, pero se obtuvo en el laboratorio, filtrando 1×10^6 células en filtros de

policarbonato (Nucleopore) de 0.4 micras y 47 milímetros de diámetro, previamente pesados en una balanza Mettler HL52 de capacidad de 160.1 g. \pm 0.1 mg. Se obtuvo el peso húmedo en 10 réplicas dando un promedio de 0.03 mg.

Considerando este peso, se sacó la relación en cuanto a la cantidad de microalgas que se utilizaría como alimento, obteniendo como resultado un peso total de 0.0045 g. de microalgas. Este peso se eligió para el almidón de maíz como la baja concentración, siendo la alta 10 unidades mayor (0.045 g.). Las estimaciones de la miel fueron de 0.045 g. la baja y 0.45 g. la alta, por la dificultad que representó el pesar valores más bajos. Considerando la disolución que tienen en el volumen de agua de 5 litros, se realizaron los cálculos en partes por millón. Las concentraciones fueron, para el almidón de maíz, en alta de 9 ppm y en baja 0.9 ppm. La miel en alta estimación fue de 90 ppm y en baja fue de 9 ppm (Tabla I).

3.2.5 CONTROL DE VARIABLES FISICOQUIMICAS.

Durante el experimento se cambió el agua cada segundo día, ésto dio lugar a una rutina de trabajo en la cual los días sin cambio de agua, se preparaba un reservorio Nalgene de 180 litros de capacidad con agua de mar esterilizada por un sistema ultravioleta y filtrada por algodón plástico y una malla de 10 micras. Se intro

ducía en el agua un calentador de inmersión para que la temperatura del agua se estabilizara a 25°C. Se ajustaba la salinidad a 30‰, y se le agregaban 1.73 ml. de Penprocilina (Lakeside, solución inyectable de 400,000 U.I.) para ajustar la cantidad recomendada de 0.3 mg/l. para los cultivos de larvas de C. gigas. 200,000 U.I. de Penprocilina corresponden a 125 mg. de Penicilina (Gendrop-Funes, V. com. pers., I.I.O.). El agua preparada en esta forma, se utilizaba para hacer el cambio en los recipientes al día siguiente.

En los dos días (con cambio y sin cambio de agua), se realizaba el control de la salinidad con un refractómetro de gota (Goldberg A0), el oxígeno disuelto y la temperatura se medían con un oxímetro YSI 57 de una precisión $\pm 0.1\%$. Además, cada segundo día se determinaba el pH con un potenciómetro digital 1900 de rango pH 0-14 y la concentración de amonio con un microanalizador de iones ORION 901 de rango 0.000 a 999.000 ppm tomando la muestra del agua antes de ser cambiada.

3.2.6 REGISTRO DE DENSIDAD LARVAL.

Cada segundo día al cambiar el agua se colectaban las larvas en un tamiz de abertura de malla de 44 micras durante la primera semana y de 75 micras en los días siguientes y se transvasaban a un vaso de precipitado con 150 ml. de agua de mar limpia que se mantenía en un baño maría a 25°C. Después de uniformar el conte-

nido del vaso se tomaba una muestra para realizar el conteo en cada uno de los tratamientos, con el fin de obtener la densidad de la muestra de la cual se preservaban por lo menos 50 larvas con un fijador especial -- preparado de la siguiente manera: 5 ml. de formalina ajustada a un pH de 8.0 con glicerofosfato de sodio; 1 ml. de propilen phenoxitol; 10 ml. de propilen glicol; -- esta solución se afora a 100 ml. con agua destilada -- (SCOR/UNESCO (Culliney et al., 1975)).

Cada muestra se almacenaba en tubos de vidrio (Monoject de 2.5 ml. de capacidad) debidamente etiquetados -- con la dieta a que pertenecían y la fecha de colecta, -- para posteriormente medir la longitud y el ancho de las larvas mediante un microscopio con un ocular micrométrico.

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

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

Con las mediciones de densidad se calculó el porcentaje de sobrevivencia en los días 6, 14 y 22 considerando los datos de densidad obtenidos como el 100% de sobrevivencia con respecto a la siguiente densidad, y el

porcentaje de sobrevivencia final obtenido del cociente del número inicial entre el número final por 100.

Con las mediciones de longitud se obtuvo el incremento del crecimiento en el tiempo de duración de los tratamientos, y el incremento total, al finalizarlos.

3.3 TRATAMIENTO ESTADISTICO.

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

La figura 4 muestra el comportamiento del error experimental en función del número de larvas, obtenida mediante el análisis propuesto por Sokal y Rohlf (1979) para la distribución óptima de recursos. Se observa que existe una gran diferencia en cuanto a la varianza de la muestra si se miden de 1 a 20 larvas; sin embargo, esta varianza disminuye muy lentamente a partir de la medición de 20 a 100 larvas. El número de 25 larvas corresponde a una varianza de 0.0017; el medir un mayor número de larvas implica mayor esfuerzo y una reducción insignificante en la varianza obtenida.

Las larvas se midieron en su longitud y ancho; la figura 5 muestra la correlación entre los dos parámetros. Todas las pruebas estadísticas realizadas posteriormente, -

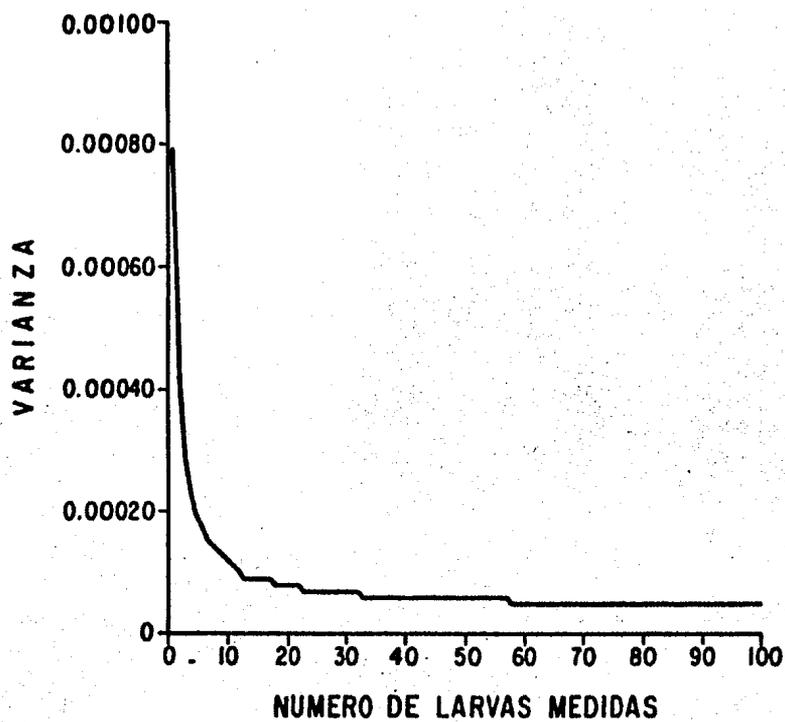


FIG. 4 - Comportamiento del error experimental en función del número de larvas.

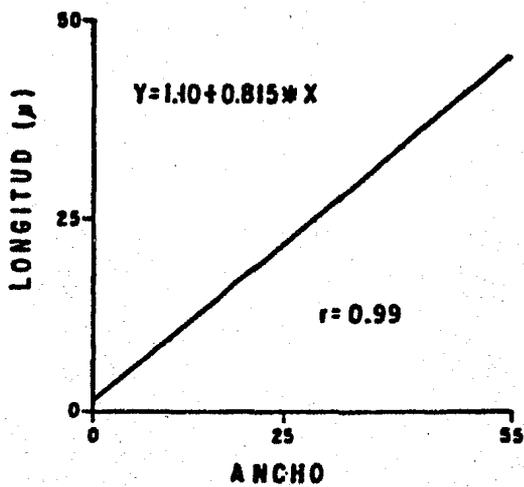


FIG. 5 = Relación entre la longitud y el ancho de las larvas de *C. gigas*.

fueron únicamente sobre los datos de la longitud, debido a la alta correlación existente entre ambas condiciones.

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

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

Todas las pruebas estadísticas se llevaron a cabo - sólo en las dietas que tuvieron una mayor sobrevivencia.

Los cálculos se realizaron en la computadora PRIME 400 con la biblioteca de programas ESIMSL (Chagoya A., C.I. C.E.S.E.).

4 RESULTADOS.

El experimento contempló la alimentación de las larvas sólo en el período previo a la metamorfosis; en este lapso (22 días), se pudo observar hasta el 50% de las larvas con mancha ocular en algunos de los tratamientos. En este momento el experimento se dio por terminado, pero se agregaron fragmentos de concha de ostión de 2 a 5 milímetros aproximadamente con el fin de observar la ulterior fijación de las larvas en este sustrato.

4.1 VARIABLES FISICOQUIMICAS.

La figura 6 muestra el registro de las variables físicoquímicas para cada dieta durante el experimento. Las líneas se encuentran cortadas en el momento en que se suspendió el tratamiento debido a una alta mortalidad.

El pH varió de 7.3 a 8.0 excepto por una medición - en la dieta 1 con un valor de 6.7 (Fig.6-A).

La concentración de oxígeno (mg/l) muestra una separación en las dietas en cuanto a la concentración de alimento y la presencia de miel (Tabla I), Así las dietas 3, 7 y 10, variaron de 7.36 a 5.20 mg/l. y las dietas restantes se mantuvieron en un rango de 7.9 a 6.2 mg/l. (Fig.6-8)

Las concentraciones más altas de amonio, se detectaron en las dietas 3, 7 y 10 que tuvieron valores de 0.2 a -

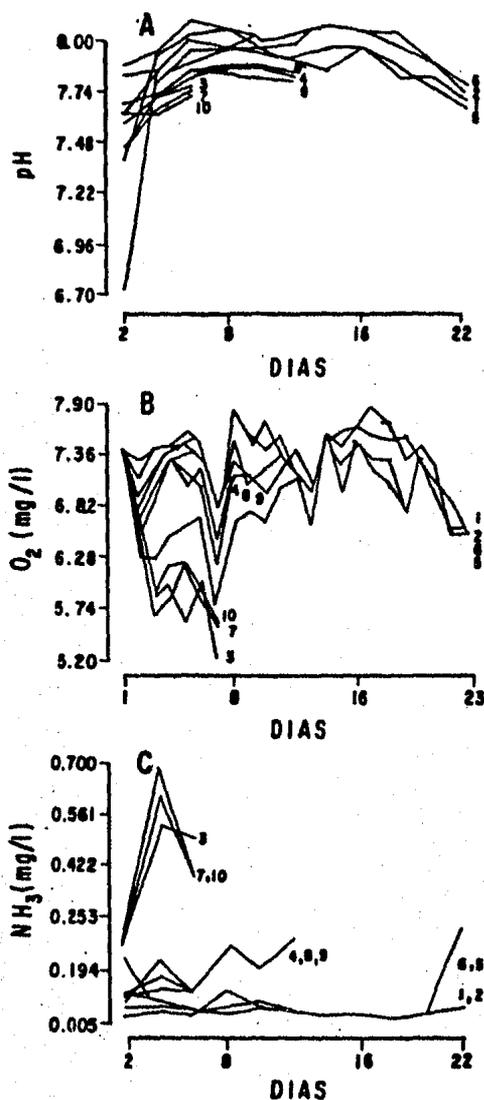


FIG. 6.- Registro de variables Fisicoquímicas
 A).- Concentración de pH., B).- Concentración de oxígeno disuelto, C).- Concentración de Amonio.
 Los números indican cada tratamiento

0.7 mg/l. Las dietas 4, 8 y 9 variaron de 0.05 a 0.19 mg/l. y las dietas 1,2,5 y 6 las concentraciones más bajas observadas, entre 0.001 y 0.03 mg/l. (Fig.6-C)

4.2 CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE LAS LARVAS.

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

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

Curvas de crecimiento.

Se graficaron únicamente las dietas testigo y las dos dietas en las que se detectó un mayor crecimiento y so-

TABLA II. Crecimiento y sobrevivencia de los larvas de *C. gigas* en cada dieta experimental. (tamaño inicial de los larvas = 77 μ)
 — = cero incremento ; — = cero sobrevivencia

DIETAS	INCREMENTO PROMEDIO EN EL CRECIMIENTO (μ)			PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA			
	A1 día 6	A1 día 14	A1 día 22	A1 día 2	A1 día 6	A1 día 14	A1 día 22
1	3	23	33	80	80	80	30
2	13	33	43	80	80	80	30
3	—	—	—	10	4	—	—
4	3	—	—	80	20	4	—
5	3	23	33	80	78	80	30
6	23	30	83	60	80	98	40
7	—	—	—	10	4	—	—
8	10	—	—	60	10	30	—
9	3	—	—	80	40	10	—
10	—	—	—	10	4	—	—

brevivencia.

La figura 7 muestra las líneas de regresión y el --cinturón de confianza al 5% para las mediciones de longitud en las larvas de las dietas 1 (Fig.7-A) y 2 (Fig.7-B); y la figura 8 para las dietas 5 (Fig.8-A) y 6 (Fig. 8-B). Cada --punto representa la longitud promedio de 25 larvas. La li--nealidad del modelo de regresión fue rechazado en todas las dietas excepto en la dieta de control 1.

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

Los datos se encuentran dispersos a lo largo del --cinturón de confianza de manera que en todas las gráficas --se observan fluctuaciones ascendentes y descendentes, aun--que las líneas de regresión marcan una tendencia de incre--mento en el crecimiento. El rango de valores para el creci--miento de las larvas en las dietas control fueron entre 75 y 110 micras para la dieta 1, de 80 a 115 micras para la --dieta 2, entre 70 y 110 micras para la dieta 5 y de 80 a --120 micras en la dieta 6.

Curvas de sobrevivencia.

La figura 9, muestra las curvas de sobrevivencia pa--ra cada tratamiento. El porcentaje de sobrevivencia final --fue de 1% considerando como el 100% el valor inicial del --inóculo para el experimento.

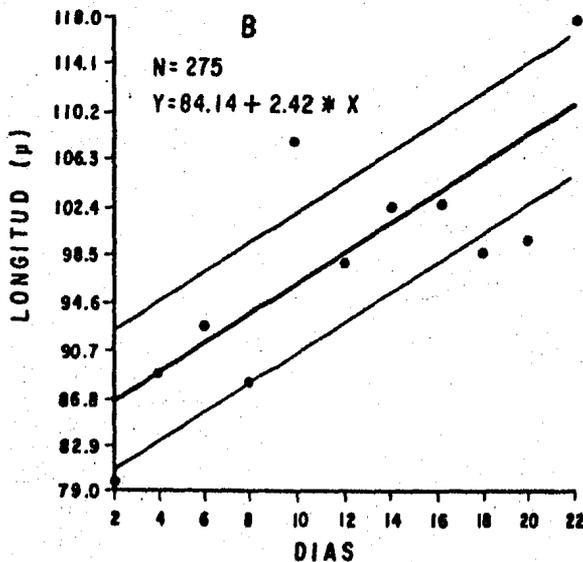
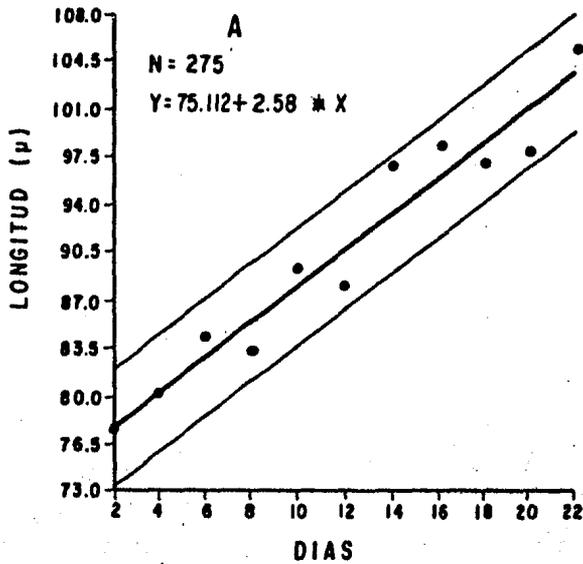


FIG. 7.- Curva de crecimiento de las larvas
 Línea de regresión y cinturón de confianza al 5%
 A).-Dieta 1 , B).-Dieta 2.

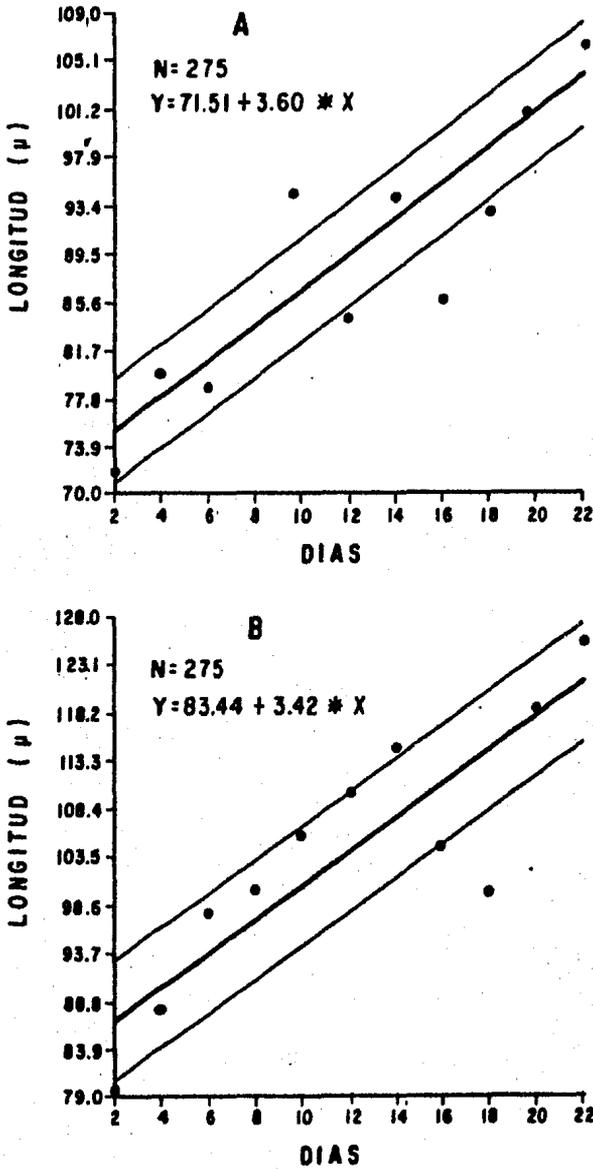


FIG. 8.- Curva de crecimiento de las larvas
 Línea de regresión y cinturón de confianza al 5%
 A).- Dieta 5, B).- Dieta 6.

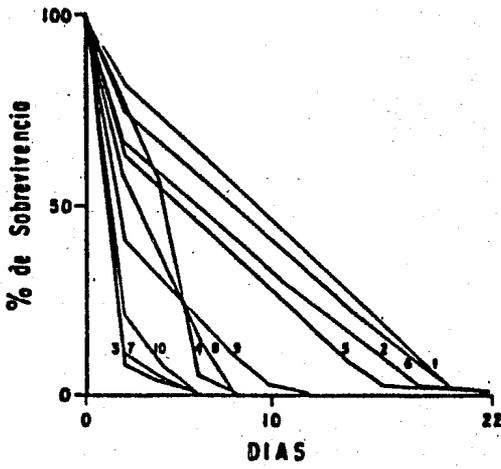


FIG. 9 Curvas de sobrevivencia para cada tratamiento

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

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

4.1 ANALISIS ESTADISTICO.

En la tabla III se presenta el análisis de covarianza para los tratamientos 1,2,5 y 6; en esta prueba, la homogeneidad en la varianza de los datos fue rechazada. Sin embargo, la homogeneidad de pendientes no es rechazada y la relación F para los tratamientos es altamente significativa, lo que indica que a pesar de que las tasas de crecimientos fueron similares, existe una diferencia significativa entre las dietas empleadas.

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

TABLA III. Analisis de covarianza

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	RELACION DE F
Tratamientos ajustados	7	2454.41	350.630	7.0709 ***
Regresión	1	5296.22	5296.223	
Error	79	3917.41	49.587	
Homogeneidad	7	337.58	48.226	0.9699 N.S.
Error Homogeneidad	72	3579.62	49.719	
Total	87	11668.04		

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

De la jerarquización de las medias dada por la prueba Student-Newman-Keuls (SNK) se puede concluir cuales fueron las "mejores dietas".

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

La separación de las dietas en 2 grupos se formó -- con base en las diferencias significativas encontradas entre tratamientos y se representa gráficamente en la figura 10. La conectividad entre las dietas forma el grupo uno incluyendo las dietas 1,2 y 5, las cuales aunque en la tabla IV difieren en el valor de las medias, estas diferencias no son significativas. Se observa en el diagrama de conectividad que la prueba SNK clasifica ambiguamente la dieta 2.

TABLA IV.- Prueba de Student-Newman-Keuls al 5% para el día 22

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

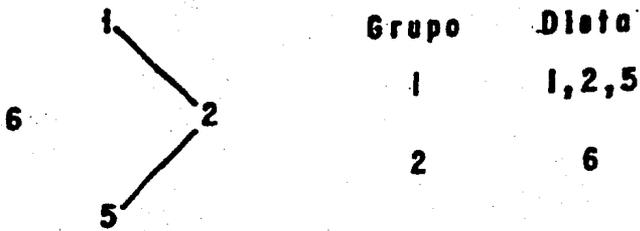


FIG.10 - Diagrama de conectividad entre dietas
Prueba de SNK al 5%.

Los números indican las dietas
Las líneas indican diferencias no significativas.

5 DISCUSION

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

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

Para C. gigas no existen reportes del desarrollo gonadal para cada época del año y en el área de la Bahía de San Quintín, por lo que es difícil señalar con precisión un tiempo de acondicionamiento adecuado previo a la inducción al desove en condiciones de laboratorio.

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

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

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

Dupuy (1975) reporta que se puede influenciar la tasa de crecimiento de las larvas dependiendo del volumen que se utilice, mencionando diferencias entre recipientes de 4 litros y de 250 litros aún manteniendo la misma densidad larval. Esto se constató durante el desarrollo del experimento, pues las larvas que se encontraban en un reservorio de 180 litros y que no se incluyeron dentro del experimento, tuvieron un incremento promedio en su longitud de 20 micras más que las larvas que recibieron la misma dieta dentro del experimento y --

que estaban contenidas en 5 litros de agua y a la misma densidad.

Loosanoff y Davis (1963), mencionan que la aireación es muy difícil de igualar en todos los experimentos razón por la cual Davis (1953) la excluye de sus experimentos. Nascimento-Iracema (1980) encuentra que el crecimiento de las larvas de C. gigas se reduce en cultivos que reciben aireación y que se encuentran alimentados con Chaetoceros calcitrans y Pyramimonas virginica pero que no tiene un efecto significativo cuando se alimentan con Isochrysis galbana y con Pseudoisochrysis paradoxa. Helm y Spencer (1972), señalan que la aireación es nociva para el crecimiento de las larvas en el estadio "D" durante sus primeros días de existencia de natación libre. Sin embargo, Breese y Malouf (1974), dicen que el cultivo de las larvas debe tener bastante aireación para mantener la circulación del agua y asegurar una buena mezcla del alimento y su transporte a la larva. Walne (1966) citado por Windsor (1977), menciona que la aireación del cultivo es un requerimiento para el buen crecimiento de las larvas y que el beneficio es más bien debido a la turbulencia causada por las burbujas que al efecto directo de mantener el oxígeno en el agua. Helm y Spencer (1972), agregan que la acción primaria de la aireación puede ser la de ayudar a las larvas a conservar la energía para la elaboración de reservas y tejidos del cuerpo, que de otra manera gastarían en nadar.

Esta investigación apoya la utilización de aireación en los cultivos larvales, ya que se observó que cuando por alguna razón se detenía la aireación en alguno de los tra

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

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

La forma no ionizada del amoniaco (NH_3) es tóxica para la mayoría de los organismos acuáticos a concentraciones inferiores de 1 ppm. El amonio (NH_4), penetra la membrana celular con facilidad. En una solución acuosa a pH 7 sólo el 1% del amoniaco total se presenta como amonio, mientras que a un pH 8 el 10% se encuentra en esta forma permeable (NH_4) (Warren 1962; Epifanio y Srna, 1975).

Las mediciones de pH 7.4 a 8.1 en promedio son normales en un sistema de agua salada (Wheaton, 1982). Sin embargo, de una manera general se observó que las dietas con altas concentraciones de alimento, tuvieron también las concentra--

ciones más altas de amonio y los valores más bajos de oxígeno y pH.

Los compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos -- coadyuvan al desarrollo de bacterias que a su vez aumentan el contenido de amoniaco en el agua. Además, las bacterias sirven de alimento a los ciliados y promueven su desarrollo. Durante el experimento, se observaron grandes cantidades de protozoarios en los cultivos que contenían altas concentraciones de alimento, no obstante la utilización de un sistema ultravioleta, de filtros de algodón plástico y de un tamiz de 10 micras. Los ciliados liberan cantidades considerables de amoniaco al agua. Por ejemplo, la excreción de amoniaco en Euplotes vannus cultivados con algas y bacterias fue de 0.22×10^{-5} y 0.41×10^{-5} mol N/ciliado/hora (Gast y Horstmann, 1983). Durante los conteos se observaron grandes cantidades de Euplotes sp. Es posible pensar que la excreción de amonio por los ciliados pudo haber tenido un efecto en el registro de las variables fisicoquímicas, puesto que en las dietas con mayor concentración de alimento se detectaron 0.700 mg/l de amonio como máximo valor en comparación con 0.194 mg/l. registrado como máximo para las dietas con una baja concentración de alimento.

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

En los cultivos de microalgas la tasa de crecimiento óptima es decir, el incremento del número de células por unidad de tiempo es función del tamaño del inoculo en condi--

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

La miel y el almidón de maíz provocaron turbidez en los recipientes. Davis y Hidu (1969) sugieren que las larvas de bivalvos, crecen más rápido en bajas concentraciones de -- sustancias que producen turbidez, que en el agua de mar clara. Esto se debe probablemente a que las partículas suspendidas -- quelan o absorben toxinas presentes en los cultivos. Según ésto, la leve turbidez provocada por los suplementos alimenti-- cios en los recipientes, fue benéfica para el crecimiento de -- las larvas.

Aunque al principio de esta investigación se pensó que la miel pudiera ser un buen suplemento alimenticio por -- sus cualidades antibacterianas naturales y su contenido en -- diastasa, las dietas que provocaron un crecimiento y supervivencia bajas, fueron precisamente las que contenían miel en -- alguna combinación (dietas 3,7,4,8,9 y 10; Tabla II). La actividad antibacteriana de la miel diluída se basa en la acción de la oxidasa sobre la dextrosa, provocando la formación de

ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Por otra parte, la presencia de proteínas en la miel hace que ésta tenga una baja tensión superficial, lo que produjo en los tratamientos -- que la contenían una marcada tendencia a formar espuma y nata en la superficie del agua. Esto estimula la formación y retención de pequeñas burbujas de aire (Mc Gregor, 1974), que pueden causar problema al disminuir el espacio requerido para el desplazamiento de las larvas nadadoras más grandes, impidiéndoles así, la búsqueda de su alimento y consecuentemente afectando su tasa de crecimiento.

En la literatura no se encuentran otros trabajos -- que utilicen suplementos alimenticios para los cultivos larvales a excepción del trabajo de Davis (1950) citado por Windsor (1977), en el cual menciona que la adición de almidón de maíz a los cultivos larvales no es adecuada ni aún en bajas -- concentraciones. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la utilización de almidón de maíz es apropiada para la alimentación de las larvas de C. gigas. Como se indica en la tabla II y figura 9, la dieta 6 con una concentración -- de almidón de maíz de 0.9 ppm. en combinación con microalgas tuvo los valores más altos de sobrevivencia y en el incremento del crecimiento. En los resultados de la prueba de SNK (Tabla IV), el valor más elevado de la media indica la "mejor -- dieta" y como se puede observar, esta corresponde a la dieta 6 con una media de 125.18.

Al comparar los rangos de crecimiento y sobrevivencia larval reportados por Breese y Malouf (1974) en C. gigas para condiciones óptimas de cultivo, con los resultados de es-

tos experimentos, se puede notar que los valores reportados - para el incremento promedio en el crecimiento al día 14 se encuentran entre 23 y 33 micras (Tabla II). Breese y Malouf (op. cit.) reportan un incremento promedio de 85 a 95 micras al mismo día, valores superiores a los encontrados en esta investigación. En cuanto a sobrevivencia, estos autores reportan para el día 14 un 45%, mientras que en este trabajo se detectó entre un 90 y 95% para las dietas más satisfactorias.

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

En el experimento se utilizó antibiótico para ayudar a reducir la población bacteriana Brereton et al. (1973) - citado por Le Pennec y Prieur (1977).

La dieta 6 del experimento, constituida por una mezcla de la microalga P. paradoxa con un suplemento de almidón de maíz (0.0045 g/5 l) tuvo un incremento al día 14 de 30 micras. Davis (1953) reporta el crecimiento promedio de las larvas de C. virginica alimentadas con bacterias sulfurosas y con Chlorella sp. en 20 y 65 micras respectivamente. Es probable que la tasa de crecimiento en el experimento haya sido inhibida por colisiones frecuentes de las larvas con los cilia-

dos observados durante los controles.

La alimentación discontinua en las larvas es un tema de discusión. Los trabajos de Langton y McKay (1974), reportan que una alimentación discontinua proporciona un mejor crecimiento, posiblemente como el resultado de una adaptación metabólica al régimen alimenticio. Por otra parte Lucas y Rangel-Dávalos (1983) señalan que la primera alimentación de las larvas de C. gigas detectada a través de un microscopio de epifluorescencia, ocurre 24 horas después de la fertilización a una temperatura de 24°C, y mencionan que las larvas de bivalvos se alimentan después continuamente a diferencia del ritmo digestivo encontrado en los adultos por Morton (1973). Cuando se alimentan las larvas con Pavlova Lutheri e Isochrysis galbana estiman que es necesario un promedio de 800 células/larva/día a 24°C para mantenerles los estómagos llenos. Si en esta investigación se hubiera proporcionado el alimento a las larvas en esa concentración, se hubiera requerido un promedio de 8000 células/ml/día; cantidad menor a la que se ofreció a las larvas durante el experimento (Tabla I). Gerdes (1983) reporta que las larvas de 77 a 120 micras filtran menos activamente que las larvas mayores, y menciona que la tasa de filtración para las larvas de C. gigas mantenidas en una temperatura de 25°C y una salinidad de 25‰, difiere según su tamaño. Así las larvas que miden entre 75 y 120 filtran de 0.5 a 2.7 ml/hora/larva y las que miden de 120 a 310 micras filtran de 7.5 a 99.7 ml/hora/larva. Además Gerdes, (op.cit.) reporta que la larva remueve 50% más alimento a concentraciones menores de 25×10^6 células/litro que a mayores concentraciones.

nes de 100×10^6 células/litro. Loosanoff y Davis (1963) y -- Malouf y Breese (1977) apoyan la teoría de que una sobrealimentación en el cultivo retrasa la tasa de crecimiento de las larvas. Las concentraciones utilizadas en este trabajo, son -- las reportadas como óptimas para el cultivo de larvas por es-- tos autores, pero al añadir suplementos alimenticios, se ele-- va la concentración de la dieta en las cantidades correspon-- dientes a cada tratamiento (Tabla I). En las concentraciones más altas de las dietas se observó una excesiva formación de pseudoheces, como también lo reportan Loosanoff y Davis (1963) de sus experimentos. El problema que generan las largas tiras de moco que arrastran las larvas, es el que atrapan y enredan a otras larvas nadadoras, impidiéndoles probablemente mante-- ner el ritmo alimenticio adecuado al no poderse desplazar li-- bremente en la búsqueda del alimento.

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

La jerarquización de las dietas de acuerdo al valor de sus medias expresado según la prueba SNK (Tabla IV) denota

la secuencia en las dietas 6,5,2 y 1, es decir, que las dietas con suplemento alimenticio de almidón de maíz en alta y baja concentración respectivamente, resultaron en mejor crecimiento que las dietas control (con microalgas y sin alimento). La diferencia en el valor de la media con respecto a la dieta 2 y 5 no es significativa, sin embargo, estos valores difieren significativamente de la dieta 6, razón por la cual se presenta en un grupo independiente.

En cuanto a la sobrevivencia, reportada en la figura 9 se observa una clara separación en dos grupos respecto a las dietas que no contuvieron miel (1,2,5 y 6) de las dietas con miel en diferente combinación (3,4,7,8,9 y 10). La pendiente de las curvas se presenta muy marcada los primeros días del experimento, pero del día 10 en adelante estas curvas se tienden a suavizar terminando con una sobrevivencia de 1%.

Cabe la posibilidad, según la tendencia observada en la pendiente de las curvas, de establecer el hecho de que el "stress" producido por sustancias añadidas al medio y por efectos de manipuleo durante los cambios de agua, pueda ser mejor tolerado por las larvas más grandes y repercuta en una mayor sobrevivencia en los últimos días del experimento.

Es interesante hacer notar que en la dieta 6 con una concentración de almidón de maíz de 0.9 ppm. determinada como la cantidad más baja del experimento haya resultado el mejor crecimiento y sobrevivencia de las larvas de C. gigas. Estos resultados sugieren que el almidón de maíz puede resultar un buen suplemento alimenticio.

El crecimiento y la sobrevivencia de las larvas que

no recibieron alimento (Tabla II) se encuentra dentro de las 4 "mejores dietas". Una explicación que se puede dar a este resultado, se centra en el hecho de que el experimento se llevó a cabo en un sistema cerrado para el cual se presenta la formación de "Gelbstoff", una forma de gel que se acumula en los acuarios cuando prevalecen condiciones eutróficas. El "Gelbstoff" que está formado principalmente por excreciones de algas (fenoles y carbohidratos) y productos de excreciones animales (nitrogenados principalmente) (Spotte, 1979), pueden servir como fuente de alimento para las larvas. Por otra parte, los bajos niveles de excreción de amonio medidos en los cultivos controles en inanición, parecen indicar que las larvas utilizan su reserva de lípidos como fuente de energía (Mayzaud, 1973).

Los ajustes por regresión lineal se realizaron en las curvas de crecimiento, fueron rechazados para todas las dietas excepto para la dieta control 1, sin alimento. Es posible que en este caso no se haya rechazado dicho modelo al reflejar únicamente el crecimiento de las larvas, sin la adición de otros factores como el tipo de alimento agregado.

6 CONCLUSIONES.

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

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

La adición de los suplementos de almidón de maíz y miel de abeja combinadas, no fue adecuada en las altas y bajas concentraciones probadas para el desarrollo de las larvas.

La utilización del antibiótico contribuye a mejorar la calidad del agua, condición indispensable para el buen desarrollo y sobrevivencia de las larvas.

7 RECOMENDACIONES

Sería interesante el repetir el experimento, pero - alimentando las larvas obtenidas de progenitores que hayan te nido un acondicionamiento previo en el laboratorio, para com probar si existe una diferencia notoria con respecto al desa rrollo de las larvas cuyos progenitores fueron traídos direc tamente de su hábitat natural.

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

Puede ser que el empleo de la miel de abeja en con centraciones más bajas de un mejor resultado. También se po dría probar la concentración adecuada de almidón de maíz re- portada en este trabajo, pero en rangos aún más finos y en com binación con otro tipo de microalga como por ejemplo Isochry- sis galbana, la cual tiene propiedades antibacterianas. La - mezcla de dos o más especies de microalgas con el suplemento - alimenticio, podría mejorar la calidad de la dieta.

Se recomienda probar el empleo del cloro para eliminar los protozoarios, aunque se deben considerar los efectos subletales que han sido observados por Thatcher (1977) cuando es añadido directamente al agua de los cultivos, por lo que - probablemente sea mejor utilizarlo únicamente como solución - de enjuague para las larvas retenidas en el tamiz al realizar los cambios de agua en el cultivo.

LITERATURA CITADA.

- Breese, W. y R.E. Malouf., 1974. Hatchery Manual for the -
Pacific Oyster. Oregon State University Sea Grant College
Program. 21 pp.
- Creekman, L. L., 1977. The effects of conditioning the - -
American Oyster (Crassostrea virginica) with Tetraselmis -
suecica and cornstarch on the growth, vigor and survival -
of its larvae. M. S. Thesis. Virginia Institute of Marine
Science. Gloucester Point, Virginia. 57 pp.
- Culliney, J. L., P.J. Boyle y R. D. Turner, 1975. New - -
approaches and techniques for studying bivalve larvae. En:
Culture of Marine Invertebrate Animals. (Smith, W.L. y M.-
H. Chanley, ed.). Plenum press. New York. 338 pp.
- Davis, H. C., 1950. On food requirements of larvae of Ostrea
virginica. Anat. Rec. 108: 132-133.
- Davis, H.C., 1953. On food and feeding of larvae of the - -
American Oyster: Crassostrea virginica. Biol. Bull. 104:
334-350.
- Davis, H. C. y P. E. Chanley, 1956. Effects of some dissolved
substances on bivalve larvae. Proc. Natl. Shellfish Ass. -
46: 59-68.

- Davis, H.C. y R.R. Guillard, 1958. Relative value of ten -- genera of micro-organisms as foods for oyster and clam -- larvae. U.S. and Wildlife Service, Fish. Bull. 58: 293-304.
- Davis, H. C. y H. Hidu, 1969. Effects of turbidity producing substances in sea water on eggs and larvae of three genera of bivalve Mollusks. *Veliger*: 11(4): 316-323.
- Devel, H.J., 1957. The Lipids —their chemistry and bio- - chemistry. Biochemistry Interscience Publishers Inc. New - York. Vol. III. 1065 pp.
- Dupuy, J.L., 1975. Some physical and nutritional factors wich affect the growth and setting of the larvae of the oyster, Crassostrea virginica in the Laboratory. En: *Physiological Ecology of Estuarine Organisms* (F. John Vernberg, ed.). - Univ. South Carolina Press. 319-331 pp.
- Dupuy, J.L. y Rivkin, S., 1972. The development of Laboratory techniques for the production of cultch-free spat of the - oyster, Crassostrea virginica. *Chesapeake Science* 13(1):45-52.
- Dupuy, J.L., N.T. Windsor y Ch.E. Sutton, 1977. Manual for - design and operation of an oyster seed hatchery for the - american oyster Crassostrea viginica. Special report No.-142 in *Applied Science and Oceans Engineering of the* - -

- Virginia Institute of Marine Science. Gloucester Point, -
Virginia, 104 pp.
- Epifanio, C.E. y R.F. Srna, 1975. Toxicity of amonia, - -
nitrite ion, nitrate ion, and orthophosphate to Mercenaria
mercenaria and Crassostrea viginica. Marine Biology 33:
241-246.
- Gallager, S.M. y R. Mann, 1981. Use of Lipid -specific - -
staining techniques for assaying condition in cultured -
bivalve larvae. Journal of Shellfish Research 1(1):69-73.
- Gast, V. y V. Horstman, 1983. N-remineralization of phyto-
and bacterioplankton by the marine ciliate Euplotes vannus
Marine Ecology-Progress Series 13:55-60.
- George, W.C., 1952. The digestion and absorption of fat in
lamellibranch. Biol. Bull. 102:118-127.
- Gerdes, D., 1983. The pacific oyster Crassostrea gigas part.
I. Feeding behavior of larvae and adults. Aquaculture 31:
195-219.
- Haven, D.S., 1965. Supplemental feeding of oysters with - -
starch. Chesapeake Science 6(1):43-51.
- Helm, M.M. y B.E. Spencer, 1972. The importance of the rate -
of aeration in hatchery cultures of the larvae of Ostrea -

- edulis L., J. Const. Int. Explor. Mer. 34(2):244-255.
- Helm, M.M., D.L. Holland y R.R. Stephenson, 1973. The effect of supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of Ostrea edulis L. on Larval vigour. J. Mar. Biol. Ass. - U.K. 53:673-684.
- Hemerick, G., 1973. Mass culture, p. 255-273. En: Handbook of phyiological methods. (J.R. Stein, ed.). Cambridge University Press., New York. 448 pp.
- Hernández, M., A. Chávez y H. Bourges, 1974. Valor Nutritivo de los Alimentos Mexicanos. Publicaciones de la división de nutrición -L- 12, 6ta. ed. Instituto de la Nutrición, - México, 15 pp.
- Hidu, H. y H.S. Tubiash, 1963. A bacterial basis for the - - growth of antibiotic-treated bivalve larvae. Proc. Natl. - Shellfish. Ass. 54:25-39.
- Holland, D.L. y B.E. Spencer. 1973. Biochemical changes in - fed and starved oysters, Ostrea edulis L. during larval - development, metamorphosis and early spat growth. J. Mar.- Biol. Ass. U.K. 53:287-298.
- Islas-Olivares, R., 1975. El ostión japonés (Crassostrea gi- gas) en Baja California. Ciencias Marinas 2(1):58-59.

- Langton, R.W. y G.U. McKay, 1974. The effect of continuous - versus discontinuous feeding on the growth of hatchery - reared spat of Crassostrea gigas (Thunberg). J. Const. Int. Explor. Mer. 35(3):361-363.
- Lannan, J.E., A. Robinson y W.P. Breese, 1980. Broodstock - management of Crassostrea gigas II. Broodstock conditioning to maximize larval survival. Aquaculture 21:337-345.
- Lara-Lara, J.R., S. Alvarez-Borrego, 1975. Distribución superficial de algunos parámetros hidrológicos físicos y químicos en el estero de Punta Banda, B.C. Ciencias Marinas - 2(1):77-99.
- Le Pennec, M. y D. Prieur, 1977. Antibiotics in larval - - rearing of marine bivalves. Aquaculture 12:16-30.
- Loosanoff, V.L. y H.C. Davis, 1963. Rearing of bivalve - - molluscs. Advances in Marine Biology 1:136 pp.
- Lucas, A. y C. Rangel-Dávalos, 1983. Detection of the first - larval feeding in Crassostrea gigas using the epifluorescence microscope. Aquaculture 30:369-374.
- Mackie, G., 1969. Quantitative studies of feeding in the - - oyster Crassostrea virginica. Proc. Natl. Shellfish. Ass.- 59:6-7.

- Malouf, R., R. Keck, D. Maurer y C. Epifanio, 1973. Ocurrence of gas-bubble disease in three species of bivalve molluscs. J. Fish. Res. Bd. Can. 29(5):588-589.
- Malouf, R.E. y W.P. Breese, 1977. Food consumption and growth of larvae of the pacific oyster, Crassostrea gigas (Thunberg) in a constant flow rearing system. Proc. Nat. Shellfish Ass. 67:7-16.
- Matthiessen, G.C. y R.C. Toner, 1966. Possible methods of improving the shellfish industry of Martha's Vineyard. Duke's Country, Massachussets. Mar. Res. Fund. 138 pp.
- Mayzaud, P., 1973. Respiration and nitrogen excretion of zooplankton II. Studies of the metabolic characteristics of starved animals. Marine Biology 21:19-28.
- Mc Gregor, S.E., 1974. La Apicultura en los Estados Unidos. 2da. edición, ed. Limusa, México, 65 pp.
- Millar, R.H. y J.M. Scott, 1967. Bacteria-free culture of oyster larvae. Nature 216:1139-1140.
- Mitchell, P.H., 1915. Nutrition of oyster: glycogen formation and storage. U.S. Bur. Fish. Bull. 35:151-162.
- Norton, B., 1973. A new theory of feeding and digestion in the filter-feeding lamellibranchia. Malacología 14:63-79.

- Nascimento-Iracema, A., 1980. Growth of the larvae of - -
Crassostrea gigas (Thunberg), fed with different algal --
species at high cell concentrations. J. Cons. Int. Explor.
Mer. 39(2):134-139.
- Nishikawa, K.K., 1977. Trace elements in oyster biodeposits.
M.S. Thesis. Oregon State University, U.S.A. 93 pp.
- Paniagua-Michel, J. y C. Granados-Machuca, 1981. Obtención de
dos medios económicos para el cultivo de fitopláncton bajo
condiciones controladas. Tesis profesional. Escuela Supe--
rior de Ciencias Marinas (UABC). 81 pp.
- Parsons, T.R., K. Stephens y J.D.H. Strickland, 1961. On the
chemical composition of eleven species of marine phito- -
plankters. J. Fish. Res. Bd. Can. 18(6):1001-1016.
- Pellet, F.C., 1977. American Honey Plants. 5th. edition, - -
Dadant and Sons ed., U.S.A. 466 pp.
- Sokal, R. y F.J. Rohlf, 1979. Biometría. Principios y métodos
estadísticos en la investigación biológica. H. Blume edi--
ciones, Madrid, 832 pp.
- Spotte, S., 1979. Seawater Aquariums. The captive environment.
John Wiley and Sons, Inc., New York, 413 pp.

- Thatcher, T.D., 1977. An effect of chlorination on the hatching of coon stripe shrimp eggs: so what?. Proc. Nat. Shell fish Ass. 67:71-74.
- Van Weel, P.B., 1961. The comparative physiology of digestion in molluscs. Am. Zoologist 1:245-252.
- Walne, P.R., 1979. Culture of Bivalve Molluscs. Farnham-Suney, England. 188 pp.
- Warren, K.S., 1962. Ammonia toxicity and pH. Nature. 195:47-49.
- Wheaton, F.W., 1982. Acuicultura. Diseño y Construcción de - Sistemas. A.G.T. editor, S.A., México, 704 pp.
- Windsor, N.T., 1977. Effect of various algal diets and larval density in the larviculture of the american oyster Crassostrea virginica (Gmelin). M.S. Thesis. Virginia Institute of Marine Science. Gloucester Point, Virginia. 80 pp.