

**Cultivo larval de *Argopecten nucleus* Born, 1780 (BIVALVIA: PECTINIDAE) en una zona tradicionalmente dedicada a la producción y el levante de postlarvas de camarón**

**ERNESTO ACOSTA ORTIZ**

**UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA  
INSTITUTO DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN ACUACULTURA Y ECOLOGÍA ACUÁTICA TROPICAL  
SANTA MARTA D.T.C.H.  
2011**



**Cultivo larval de *Argopecten nucleus* Born, 1780 (BIVALVIA: PECTINIDAE) en una zona tradicionalmente dedicada a la producción y el levante de postlarvas de camarón**

**ERNESTO ACOSTA ORTIZ**

**Memoria de grado presentada para optar al título de Magíster en acuicultura y ecología acuática tropical**

**Director  
JAVIER GÓMEZ LEÓN  
Ph D En Ciencias Biológicas**

**UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA  
INSTITUTO DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN ACUACULTURA Y ECOLOGÍA ACUÁTICA TROPICAL  
SANTA MARTA D.T.C.H.  
2011**



**Nota de aceptación**

---

---

---

---

**Presidente del jurado**

---

**Jurado**

---

**Jurado**

**SANTA MARTA D.T.C.H.**

## **DEDICATORIA**

**Para todas aquellas personas que nunca perdieron la fe en mi, este trabajo es también para ustedes, gracias.**



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios, quien me ha permitido llegar a donde estoy y culminar con éxito este proyecto.

Al INVEMAR y a los integrantes del grupo de Investigación de Valoración y Aprovechamiento de Recursos Marinos (VAR), quienes directa o indirectamente hicieron posible la realización de este trabajo, en especial a mi director de tesis Javier Gómez León (Jefe), gracias a su invaluable apoyo y por ser más que mi director un gran amigo, quien siempre me apoyo y escucho en aquellos momentos en que nada parecía tener sentido ni solución “Gracias jefe por creer en mí”, también agradezco a Yenia Katherine, mi tesista, amiga y compañera de lucha quien siempre estuvo allí, al momento de trabajar, reír y llorar “kata este triunfo también es tuyo gracias”, a Claudia Castellanos quien me abrió las puertas al INVEMAR con este proyecto y quien tuvo que soportar mi neurosis laboral, “Gracias Clau”.

A mis padres y hermanos quienes siempre me apoyaron dentro de sus posibilidades y de los cuales estoy muy orgulloso. “gracias por estar siempre ahí cuando los necesite”.

Quiero manifestar mi especial agradecimiento a María Fernanda Virgüez y Edgard Arias, propietarios de HIDROCULTIVOS DE LA COSTA, LTDA., por su ayuda ilimitada y por enseñarme muchísimos conocimientos para el manejo del laboratorio, y por aconsejarme y sobretodo por convertirse en unos grandes amigos.

De igual manera a Luis Freitas por su interés y colaboración con el desarrollo de algunas etapas del cultivo.

A CENIACUA por su colaboración con el suministro de microalgas cuando escaseaban en el laboratorio.

A la gente de Punta Canoa (Bolívar), en especial a Omar Gómez, Olivia Aguilar por ser como una mamá mientras estuve allá), Juan, Gleider, Anileidys y a los trabajadores de ACUATEC e HIDROCULTIVOS DE LA COSTA en especial a Marcos, Alex, Jose C., Jose R., Erison, Elkin, Ranci, Ariel, Pacho, Calixto, Alfonso, Silia y Gloria), quienes directa o indirectamente colaboraron con el desarrollo de este proyecto.

Y a todas las personas que de una u otra manera colaboraron con la realización de este trabajo, haciéndolo más ameno y fructífero.



MACT  
00016  
92

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	3
2. OBJETIVOS .....	6
2.1. Objetivo general .....	6
2.2. Objetivos específicos .....	6
3. MARCO TEORICO .....	7
3.1. Antecedentes .....	7
3.2. Generalidades de la especie .....	9
4. MATERIALES Y METODOS .....	13
4.1. Área de Estudio .....	13
4.2. Obtención, transporte y maduración de reproductores en laboratorio .....	13
4.3. Experimentos .....	14
4.3.1. Efecto de la concentración de espermatozoide: ovocito y tiempo de fertilización .....	16
4.3.2. Efectos de la fuente de agua utilizada en el cultivo larval .....	22
4.3.3. Influencia de la densidad larval inicial y la concentración de alimento .....	23
4.3.4. Evaluación de seis dietas para la alimentación larval .....	24
4.3.5. Eficacia de los tratamientos .....	24
4.3.6. Comparación de dos técnicas de cultivo de larvas de <i>A. nucleus</i> .....	25
4.4. Análisis estadístico .....	26
5. RESULTADOS .....	28
5.1. Efectos de la concentración espermatozoide: ovocito y el tiempo de fertilización .....	28
5.1.1. Fertilización .....	28
5.1.2. Porcentaje de larvas D .....	29
5.1.3. Porcentaje de deformidad larval .....	30
5.1.4. Supervivencia larval .....	31
5.1.5. Crecimiento larval .....	32
5.1.6. Estado de condición diaria .....	33
5.1.7. Presencia de mancha ocular .....	37
5.1.8. Deformidad larval durante el cultivo .....	38
5.1.9. Eficacia de los tratamientos .....	38
5.2. Efectos de la fuente de agua utilizada para el cultivo larval .....	40
5.2.1. Supervivencia larval .....	40
5.2.2. Crecimiento larval .....	41
5.2.3. Estado de condición diaria larval .....	42
La presencia de larvas con mancha ocular no fue evidente en ninguna de las fuentes de agua de mar utilizadas. ....	45
5.2.4. Deformidad larval durante el cultivo .....	45
5.2.5. Eficacia del tratamiento .....	45
5.3. Influencia de la densidad larval inicial y la concentración de alimento .....	46



5.3.1.	Supervivencia larval .....	46
5.3.2.	Crecimiento larval .....	47
5.3.3.	Estado de condición diaria larval.....	48
5.3.4.	Deformidad larval durante el cultivo.....	52
5.3.5.	Eficacia del tratamiento .....	52
5.4.	Evaluación de seis dietas para la alimentación larval .....	53
5.4.1.	Supervivencia larval .....	53
5.4.2.	Crecimiento larval .....	54
5.4.3.	Estado de condición diaria larval.....	55
5.4.4.	Presencia de mancha ocular.....	56
5.4.5.	Deformidad durante el cultivo.....	58
5.4.6.	Eficacia del tratamiento .....	59
6.	DISCUSIÓN.....	61
6.1.	Concentración de esperma y tiempo de fertilización.....	61
6.2.	Efectos de la fuente de agua utilizada en el cultivo larval .....	65
6.3.	Densidad inicial y concentración de alimento .....	67
6.4.	Evaluación de seis dietas para la alimentación larval .....	70
7.	CONCLUSIONES.....	74
8.	REFERENCIAS .....	76
9.	ANEXO .....	84



## FIGURAS

Figura 1. (A). Morfología externa de <i>A. nucleus</i> (tomado de Bill, 2009) y (B) Morfología interna de un pectínido: (t) Testículo; (o) Ovario; (b) Branquias; (ma) Músculo Aductor; (m) Manto (tomado de Helm <i>et al.</i> , 2006).....	10
Figura 2. Expulsión de gametos femeninos por el nefridio (A y B) y Masculinos (C y D). Obsérvese la diferencia de color del agua del recipiente (B y D). N: Nefridio. La barra indica 1 cm .....	11
Figura 3. Alimentación mediante goteo (A) y Reproductores acondicionados en canaletas de 250 L (B).....	14
Figura 4. Limpieza de reproductores de <i>A. nucleus</i> . Concha sin limpiar (A); Limpieza manual con un cuchillo (B) y conchas limpias (C) .....	15
Figura 5. Acuario de inducción al desove de <i>A. nucleus</i> .....	15
Figura 6. Colecta de gametos y fertilización de <i>A. nucleus</i> .....	16
Figura 7. Tamizado de ovocitos de <i>A. nucleus</i> por una malla de 23 $\mu\text{m}$ (A); Placa Sedgewick Rafter para el conteo de ovocitos (B) y Observación de ovocitos al microscopio (C) .....	17
Figura 8. Cámara de Neubauer para conteo de espermatozoides (A) y Espermatozoides de <i>A. nucleus</i> (B) .....	17
Figura 9. Experimento de fertilización en <i>A. nucleus</i> .....	18
Figura 10. Ovocitos fertilizados. Con presencia de cuerpo polar (A) y ovocito en división o clivaje (B). CP. Cuerpo polar. . La barra indica 20 $\mu\text{m}$ .....	19
Figura 11. Tanques utilizados durante el desarrollo embrionario y la larvicultura de <i>A. nucleus</i> (A) y proceso de recambio y toma de muestras de larvas (B).....	20
Figura 12. Larvas deformes. Larva con ondulaciones (A, L); Charnela deprimida en forma de media luna (B); Concha deformada (C, D, K), Con muescas (E, F, G) y Valvas plegadas (I, J, M). La barra indica 20 $\mu\text{m}$ .....	21
Figura 13. Toma y proceso de filtración del agua de mar en HIDROCULTIVOS DE LA COSTA LTDA. Toma (A); Puesto de bombeo (B); Filtro de arena (C); Tanque de recepción del agua bombeada (D); Sistema de filtración (E) y Reservorios de agua de mar filtrada y clorada (F) .....	22
Figura 14. Experimento de diferentes fuentes de agua para cultivo larval de <i>A. nucleus</i> ....	23
Figura 15. Tanque para el cultivo masivo de larvas de <i>A. nucleus</i> .....	26
Figura 16. Proceso de recambio de larvas de <i>A. nucleus</i> . Drenado de tanques de larvas (A); Colecta de larvas para conteo (B) y Larvas al microscopio (C). La barra indica 30 $\mu\text{m}$ .....	26
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de fertilización de ovocitos de <i>A. nucleus</i> en diferentes concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización. (La barra indica el error estándar).....	28
Figura 18. Porcentaje de larvas D de <i>A. nucleus</i> en diferentes concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización. (La barra indica el error estándar).....	29
Figura 19. Porcentaje de larvas deformes de <i>A. nucleus</i> en diferentes concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización. (la barra indica el error estándar). .....	30
<b>Figura 20.</b> Supervivencia larval de <i>A. nucleus</i> bajo diferentes concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización. (La barra indica el error estándar). .....	32



Figura 21. Crecimiento larval de <i>A. nucleus</i> en diferentes concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización. (La barra indica el error estándar).....	33
<b>Figura 22.</b> Porcentaje del estado de condición diario de larvas de <i>A. nucleus</i> en el tiempo de fertilización de 15 minutos y tres concentraciones de espermatozoides. (La barra indica el error estándar).....	34
<b>Figura 23.</b> Porcentaje del estado de condición diario de larvas de <i>A. nucleus</i> en el tiempo de fertilización de 30 minutos y tres concentraciones de espermatozoides. (La barra indica el error estándar).....	35
Figura 24. Porcentaje del estado de condición diario de larvas de <i>A. nucleus</i> en el tiempo de fertilización de 45 minutos y tres concentraciones de espermatozoides. (La barra indica el error estándar).....	36
Figura 25. Larva de <i>A. nucleus</i> de once días de nacida con presencia de mancha ocular. La barra indica 30 $\mu$ m.....	37
Figura 26. Porcentaje de mancha ocular en larval de <i>A. nucleus</i> en diferentes concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización. (La barra indica el error estándar).....	37
Figura 27. Porcentaje de deformidad larval de <i>A. nucleus</i> bajo diferentes concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización. (La barra indica el error estándar).....	38
Figura 28. Supervivencia larval de <i>A. nucleus</i> sometida a cuatro fuentes de agua. (La barra indica el error estándar).....	41
Figura 29. Crecimiento larval de <i>A. nucleus</i> sometida a cuatro fuentes de agua. (La barra indica el error estándar).....	42
Figura 30. Porcentaje del estado de condición diario de larvas de <i>A. nucleus</i> sometida a diferentes fuentes de agua. (La barra indica el error estándar).....	44
Figura 31. Porcentaje de deformidad larval de <i>A. nucleus</i> sometidas a diferentes fuentes de agua. (La barra indica el error estándar).....	45
Figura 32. Supervivencia larval de <i>A. nucleus</i> sometidas a diferentes densidades larvales y concentraciones de alimento. (La barra indica el error estándar).....	47
Figura 33. Crecimiento larval de <i>A. nucleus</i> sometidas a diferentes densidades larvales y concentraciones de alimento. (La barra indica el error estándar).....	48
Figura 34. Porcentaje del estado de condición diario de larvas de <i>A. nucleus</i> sometida a diferentes densidades larvales y concentración de alimento. (La barra indica el error estándar).....	50
Figura 35. Deformidad larval de <i>A. nucleus</i> sometidas a diferentes densidades larvales y concentraciones de alimento. (La barra indica el error estándar).....	52
<b>Figura 36.</b> Supervivencia larvas D de <i>A. nucleus</i> sometidas a diferentes dietas microalgales. (La barra indica el error estándar).....	54
Figura 37. Crecimiento larval de <i>A. nucleus</i> sometidas a diferentes dietas microalgales. (La barra indica el error estándar).....	55
<b>Figura 38.</b> Estado de condición diario de las larvas de <i>A. nucleus</i> sometidas a diferentes dietas microalgales. (La barra indica el error estándar).....	57
Figura 39. Porcentaje de mancha ocular en larvas de <i>A. nucleus</i> sometidas a diferentes dietas microalgales (La barra indica el error estándar).....	58
Figura 40. Porcentaje de deformidad en larval de <i>A. nucleus</i> sometidas a diferentes dietas microalgales (La barra indica el error estándar).....	59

## TABLAS

Tabla 1. Estadíos de madurez sexual en pectínidos (modificado de Sastry, 1963 y Cochard y Devauchelle, 1993).....	14
<b>Tabla 2.</b> Estados de condición larval .....	21
Tabla 3 . Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje de ovocitos fertilizados en <i>A. nucleus</i> bajo los diferentes tiempos evaluados. ....	29
Tabla 4. Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje de larvas D por tiempo de fertilización en <i>A. nucleus</i> .....	30
Tabla 5. Prueba de múltiples comparaciones de la concentración de espermatozoides y tiempo de fertilización en <i>A. nucleus</i> .....	31
Tabla 6. Prueba de múltiples comparaciones de la supervivencia larval bajo diferentes tiempo de fertilización en <i>A. nucleus</i> .....	31
<b>Tabla 7.</b> Eficacia de las concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización utilizados.....	39
Tabla 8. Eficacia de las combinaciones de concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización utilizados. El * indica los mejores valores .....	39
Tabla 9. Prueba de múltiples comparaciones del porcentaje de supervivencia larval de <i>A. nucleus</i> vs fuente de agua para el día 12 de cultivo.....	41
<b>Tabla 10.</b> Prueba de múltiples comparaciones para el crecimiento larval de <i>A. nucleus</i> vs la fuente de agua.....	42
Tabla 11. Eficacia de las fuentes de agua. El * indica los mejores valores.....	46
Tabla 12. Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje del crecimiento larval de <i>A. nucleus</i> vs densidad larval y concentración de alimento .....	48
Tabla 13. Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje del estado de condición de larvas llenas de <i>A. nucleus</i> vs densidad larval y concentración de alimento .....	51
Tabla 14. Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje de estado de condición de larvas semillenas de <i>A. nucleus</i> vs densidad larval y concentración de alimento .....	51
Tabla 15. Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje del estado de condición de larvas vacías de <i>A. nucleus</i> vs densidad larval y concentración de alimento .....	51
Tabla 16. Eficacia de la densidad larval y la concentración de alimento utilizados .....	53
<b>Tabla 17.</b> Eficacia de las combinaciones de densidad larval y concentración de alimento. El * indica los mejores valores .....	53
Tabla 18. Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje de supervivencia larval de <i>A. nucleus</i> vs dieta microalgal .....	54
Tabla 19. Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje del crecimiento larval de <i>A. nucleus</i> vs dieta microalgal .....	55
Tabla 20. Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje de larvas de llenas de <i>A. nucleus</i> vs dieta microalgal.....	56
Tabla 21. Prueba de múltiples comparaciones del porcentaje de larvas semillenas de <i>A. nucleus</i> vs dieta microalgal.....	56
Tabla 22. Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje de larvas de <i>A. nucleus</i> con mancha ocular vs dieta microalgal .....	58



Tabla 23. Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje de larvas deformes de *A. nucleus* durante el cultivo vs dieta microalgal..... 59

Tabla 24. Eficacia de las dietas microalgales. El \* indica los mejores valores..... 60



## ANEXOS

Anexo 1. Relación de las raciones utilizadas en número de células/mL y en peso seco de las microalgas utilizadas equivalente a <i>I. galbana</i> (Modificado de Helm <i>et al.</i> , 2006).....	84
Anexo 2. Comparación de dos técnicas de cultivo de larvas de <i>A. nucleus</i> .....	84

## RESUMEN

Con el propósito de mejorar la tecnología de producción de postlarvas del pectínido *Argopecten nucleus* en condiciones controladas y contribuir a la diversificación del sector acuícola y el perfilamiento del cultivo de esta especie hacia una actividad productiva autosostenible, se llevaron a cabo cuatro experimentos en los que se evaluaron: 1) la mezcla de tres proporciones de espermatozoide:ovocito (C) 10:1, 50:1, 100:1 y tres tiempos de fertilización (T) 15, 30 y 45 minutos, 2) Cuatro diferentes fuentes de agua de mar (Artificial, oceánica, sin tratar y clorinada), 3) Tres densidades iniciales de cultivo 5, 10 y 15 larvas mL<sup>-1</sup> combinadas con tres concentraciones de alimento: 20.000, 40.000 y 70.000 cél mL<sup>-1</sup> y 4) Seis dietas microalgales a) *Isochrysis galbana* (ISO), b) *Chaetoceros calcitrans* (CHA), c) *I. galbana* y *C. calcitrans* (ISO+CHA), d) *I. galbana* y *Tetraselmis suecica* (ISO+TETRA), e) *C. calcitrans* y *T. suecica* (CHA+TETRA) y f) *I. galbana*, *C. calcitrans* y *T. suecica* (ISO+CHA+TETRA), midiendo la respuesta en porcentajes de: ovocitos fertilizados, larvas D obtenidas y larvas deformes, supervivencia, crecimiento y estado de condición de las larvas. Encontrándose que no existe interacción entre la concentración de espermatozoides y el tiempo de fertilización. El tiempo es el factor más importante en el proceso de fertilización. El mayor porcentaje de fertilización y supervivencia se presentó en el tiempo de 45 minutos (T45), el mayor valor de larvas D en T15 y T30 y la menor deformidad en T30. La concentración de espermatozoides influyó solo en el porcentaje de larvas deformes, siendo mayor con 10:1 y 100:1. La supervivencia larval se vio afectada negativamente por la utilización del agua de mar artificial. No se presentó diferencias en el desarrollo de las larvas cultivadas en las fuentes de agua de mar oceánica, clorinada y sin tratar, estas dos últimas presentaron los mayores valores de supervivencia y crecimiento. La supervivencia larval, no varió significativamente bajo ninguna de las densidades y/o concentraciones de alimento probadas. La densidad inicial de cultivo es el factor de mayor influencia sobre el crecimiento y el estado de condición larval y de estas las de 10 y 15 larvas mL<sup>-1</sup> registraron los mayores valores. Las dietas microalgales ISO+CHA (48,6%), ISO+TETRA (30,8%) e ISO+CHA+TETRA (30,6%), presentaron la mayor supervivencia y ISO+CHA e ISO+CHA+TETRA el mayor crecimiento, al igual que los mayores porcentajes de larvas llenas y de mancha ocular. Se comparo la técnica desarrollada a partir de los mejores resultados obtenidos en cada experimento (Técnica modificada) con la técnica descrita para esta misma especie por Velasco y Barros (2008) (llamada Técnica tradicional en este trabajo), en ambas se alcanzó el estado de larva con mancha ocular, sin presentar diferencias significativas en el crecimiento. La técnica “tradicional” presentó un mayor porcentaje de supervivencia al



final del experimento con un 43.6%, sin embargo la “modificada” produce un mayor número de larvas optimas para fijarse por unidad de producción, equivalentes a 338 larvas/L<sup>-1</sup>, contra 98 larvas/L<sup>-1</sup> de la técnica tradicional, generando una reducción en los costos de producción hasta en un 40%. En conclusión, para optimizar la etapa de larvicultura en aras de obtener mayores cantidades de semilla a un menor costo se recomienda la implementación de la técnica de cultivo modificada.

Palabras claves: *Argopecten nucleus*, larva, Fertilización, estado de condición y densidad inicial.

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, sectores de la producción acuícola como la industria camaronera, en especial los pequeños y medianos laboratorios productores de postlarvas de camarón enfrentan serios problemas al tratar de mantenerse en el mercado, debido a los altos costos de producción, la fluctuación en el valor del producto por la inestabilidad en el precio del dólar en los últimos años (Guzmán *et al.*, 2004) y problemas de mortalidades causadas por microorganismos patógenos (Alderman y Hastings, 1998; Guzmán *et al.*, 2004). Esta situación ha generado el cierre de muchas empresas y a la vez, una tendencia por parte de las que aún permanecen en buscar nuevas alternativas de producción que les permitan el mayor aprovechamiento de la infraestructura ya existente.

Dentro de las alternativas propuestas está el cultivo de bivalvos pectínidos, una actividad ampliamente trabajada en países como Noruega, Inglaterra, China, Japón y países vecinos como México, Chile y Perú (Akaboshi y Illanes, 1983; Lobos, 1992; Illanes, 1995; Maeda-Martínez *et al.*, 1996) y que depende en gran medida de la semilla producida en laboratorio. Según Sturla y Velasco (2008), cerca del 64% del desembarque mundial de bivalvos pectínidos en el año 2005 se originaron en la acuicultura.

Dentro de los géneros de pectínidos los más representativos y mejor posicionados comercialmente son *Placopecten*, *Argopecten*, *Patinopecten*, *Chlamys* y *Pecten* (Dore, 1991).

Dado que son organismos filtradores que se alimentan del fitoplancton y del material microparticulado suspendido en la columna de agua se eliminan los costos por alimentación, además ocupan un nivel bajo en la cadena trófica, tienen una alta tasa reproductiva y el gasto de personal en su cultivo intermedio y final es relativamente bajo; así mismo, son una valiosa fuente de alimento, con un alto valor comercial que oscila entre los US\$ 11.3 Kg<sup>-1</sup> congelados y los US\$ 12.7 Kg<sup>-1</sup> fresco y refrigerado (Maeda-Martínez, 2001).

En la región norte de Colombia entre los años de 1994 y 1999 el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR) realizó una serie de investigaciones tendientes a evaluar el potencial de varias especies de bivalvos marinos para ser cultivados con fines comerciales. En estos estudios se identificó, entre otros, al pectínido *Argopecten*

*nucleus* como una de las especies nativas con potencial para la acuicultura por su rápido crecimiento, producción de carne y por tener un cultivo intermedio y final relativamente económico (Urban, 1999); sin embargo, la baja oferta de semilla de esta especie en el medio natural no permitiría garantizar una actividad de cultivo rentable para las comunidades pesqueras y empresas dedicadas a la maricultura, siendo necesario fortalecerla con la producción masiva de postlarvas en criadero.

A pesar de ser un pectínido nativo del Caribe colombiano su abundancia en colectores es baja, variable y poco predecible (De la Roche y Vélez 1997; Valero *et al.*, 2000), con un máximo de 3 a 50 postlarvas/colector (Castellanos y Campos 2007), panorama que deja como única fuente de abastecimiento confiable de semilla a la producción en laboratorio. Este proceso implica las etapas de selección, aclimatación, maduración e inducción al desove de los reproductores, pasando por la fertilización, desarrollo embrionario, larvicultura, fijación de las larvas a un sustrato y finalmente, su transporte al mar (Labarta *et al.*, 1997; Helm *et al.*, 2006). El éxito de cada una de estas etapas radica en la identificación de las condiciones óptimas de laboratorio que mejor simulen las condiciones medioambientales donde se encuentre naturalmente la especie (Utting y Millican, 1998).

Sin embargo, a pesar del gran avance que ha tenido Colombia en las técnicas que involucran la producción de postlarvas de pectínidos en laboratorio en los últimos años, gracias a los trabajos de Urban (1999), Acosta (2004), Barros (2004), Velasco *et al.* (2007), Velasco y Barros (2008) y Velasco (2008), aun es necesario investigar y mejorar en aspectos de la producción como: la fertilización y su impacto sobre el desarrollo y la supervivencia larval, el manejo y la calidad de las fuentes de agua utilizada en el cultivo larval, las dietas microalgales recomendadas, al igual que las densidades larvales y concentraciones de alimento suministradas. Todos estos son factores cruciales y responsables en mayor grado de la obtención de larvas competentes capaces de fijarse y hacer metamorfosis.

La mejora en estos factores relacionados al cultivo larval elevaría la supervivencia y el crecimiento de las larvas y a la vez reduciría los costos de producción aumentando la rentabilidad de esta actividad, mostrándose como una alternativa mucho más atractiva para sectores de la industria con deseos de innovar como el sector dedicado a la larvicultura del camarón. Por tal motivo, este trabajo pretende resolver las siguientes preguntas: ¿Las diferentes fuentes de agua de mar utilizadas y el tratamiento aplicado a esta, para el cultivo y levante larval de camarón es apropiada para el cultivo larval de *A. nucleus*? y ¿Cuál es la relación de fertilización, densidad de siembra, concentración de alimento y dieta microalgal más adecuada para maximizar el crecimiento y supervivencia de las larvas de *A. nucleus* en una zona dedicada tradicionalmente a la producción de postlarvas de camarón?



Adicional a esto se realizo una comparación entre la técnica desarrolladas por Velasco y Barros (2008) en Colombia para el cultivo larval de *A. nucleus* y las modificaciones propuestas en este trabajo.

El presente estudio estuvo enmarcado dentro del proyecto “Optimización de la producción de postlarvas del ostión *Nodipecten nodosus* y de la conchuela *Argopecten nucleus* en el Caribe colombiano” (código 2105-09-17982) realizado por INVEMAR y financiado por COLCIENCIAS, HIDROCULTIVOS DE LA COSTA LTDA y la Asociación de Pescadores de Playa del Muerto -ASOPLAM.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Evaluar el cultivo larval de *A. nucleus* en una zona dedicada tradicionalmente a la producción de postlarvas de camarón en laboratorio.

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar la influencia de 4 diferentes fuentes de agua de mar (agua de mar artificial, agua de mar colectada a 3 millas de la costa, agua de mar de la estación de bombeo del laboratorio de postlarvas de camarón y agua de mar de los reservorios del laboratorio de postlarvas de camarón clorinada y neutralizada) sobre el porcentaje de supervivencia, estado de condición y crecimiento de las larvas de *A. nucleus*.
- Evaluar la influencia que ejerce la concentración espermatozoide:ovocito y el tiempo de fertilización sobre porcentajes de: fertilización, larvas D obtenidas y larvas deformes, al igual que sobre los porcentajes de supervivencia, estado de condición y crecimiento de las larvas de *A. nucleus*.
- Comparar el efecto de tres densidades iniciales de cultivo y tres concentraciones de alimento sobre los porcentajes de supervivencia, estado de condición y crecimiento de las larvas de *A. nucleus*.
- Estimar el efecto de seis dietas microalgales sobre los porcentajes de supervivencia, estado de condición y crecimiento de las larvas de *A. nucleus*.



### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1. Antecedentes

La escasa oferta de semilla de *A. nucleus* en el medio natural, motivo a instituciones como el INVEMAR en el año 1999 y la Universidad Del Magdalena en el año 2003 al desarrollo de proyectos enfocados a la producción de postlarvas de esta especie bajo condiciones controladas logrando el acondicionamiento de los reproductores en laboratorio, la inducción al desove, la fertilización de los ovocitos obtenidos y la descripción de su desarrollo larval, posteriormente se logro el cultivo larval y fijación de en condiciones controladas, obteniendo de manera experimental las primeras postlarvas producidas en laboratorio pero con costos de producción aun demasiado altos (Urban, 1999, Velasco *et al.*, 2007; Velasco, 2008; Velasco y Barros, 2008). Consecuencia de esta serie de investigaciones se instalaron estaciones de cultivo experimentales en diferentes bahías de la costa Caribe colombiana: Neguanje, Parque Nacional Natural Tayrona (PNNT), Taganga (departamento del Magdalena y Bahía Portete (departamento de la Guajira)) (INVEMAR, 2005; 2009; Gutiérrez, 2009).

Con relación a la obtención de larvas, varios autores afirman que la calidad de los gametos y su correcta fertilización son variables determinantes en la obtención de larvas competentes (Padilla 1979; Paulet, 1990; Salaun *et al.*, 1991; Soudant, 1995; Helm *et al.*, 2006). Además, Salaun *et al.* (1991) y Avendaño *et al.* (2001) sostienen que la aparición de larvas anormales, caracterizadas por presentar valvas desiguales, ondulaciones en su contorno y una baja supervivencia están relacionadas directamente con problemas de poliespermia durante la fertilización.

Pese a la importancia que tiene la fertilización, es uno de los procesos menos estudiados en pectínidos, la información es escasa, incompleta y poco homogénea aún para una misma especie; por ejemplo, Urban (1999) recomienda para *A. nucleus* una proporción de 10 L de esperma por 1 L de ovocitos (10:1); por su parte, Velasco *et al.* (2007), utilizaron para la misma especie una concentración espermatozoide por ovocito de 50:1. Uriarte *et al.* (2001) sugieren una proporción de 10-15:1 para pectínidos en general; por el contrario, Winkler y Estévez (2003) recomiendan 7 espermatozoides por ovocito para la especie *A. purpuratus* y Narvarte y Pascual (2003) de 30:1 para *Aequipecten tehuelchus*. Ninguno de los autores mencionados indica el tiempo de fertilización empleado.



En cuanto a las fuentes de agua de mar y su calidad para el cultivo de las larvas, Pérez y Román (1987), Uriarte *et al.* (2001) y Helm *et al.* (2006), afirmaron que este es un factor de primer orden, ya que en algunas zonas pueden existir toxinas o sustancias disueltas en el agua, las cuales son difíciles de eliminar y serían responsables de bajas en la supervivencia, mortalidades y hasta la inhabilidad del funcionamiento de un laboratorio. Esta temática es importante de tratar, al tenerse en cuenta que el agua de las zonas donde tradicionalmente se ha realizado larvicultura y cultivo de camarón han sido expuestas al uso de antibióticos y en algunos periodos se realizó de manera indiscriminada motivado por la aparición de nuevos agentes patógenos, conducta que por lo general, crea una presión de selección hacia microorganismos resistentes a los antibióticos en uso y la posible inducción o selección de cepas bacterianas resistentes, las cuales eventualmente pueden causar problemas en la salud humana y/o animal (Gómez-Gil *et al.*, 2001). Autores como Riquelme *et al.* (1997), Luna-González *et al.* (2002), Maeda-Martínez, (2001), Saíenz-Hernández (2005) y Balcázar *et al.*, 2006 afirman que las comunidades bacterianas afectan en gran medida la calidad del agua los criaderos de larvas de bivalvos ya sean patógenas como los *vibrios* o *seudomonas* o beneficiosas como algunos bacilos, lactobacilos o levaduras marinas.

En lo referente a nutrición en las larvas de pectínidos, los trabajos realizados apuntan a la búsqueda de dietas y concentraciones microalgales que generen, dependiendo de la especie, los mejores resultados sobre el crecimiento y la supervivencia; según Velasco (2008) las microalgas utilizadas en la larvicultura de estos bivalvos deben cumplir las siguientes condiciones: 1) Ser unicelulares con tamaños entre 1 y 8  $\mu\text{m}$ ; 2) Estar vivas; 3) tener una pared celular fina y ausencia de espinas; 4) Ser preferiblemente móviles; 5) No tener componentes de difícil digestión; 6) Poseer altos contenidos de ácidos grasos esenciales poliinsaturados y proteínas y 7) Producir una alta biomasa empleando técnicas sencillas y económicas.

En la literatura no existe un consenso para la alimentación de larvas de pectínidos, las cuales según autores como Valdivieso *et al.* (1988), Martínez (1991), Aviles-Quevedo (1990), Ortíz (1994), Villavicencio (1997), Lora-Vilchis y Maeda-Martínez (1997), Blacio y Álvarez (2001); Farías-Molina (2001) y Winkler y Estévez (2003) van desde 4.000 hasta 50.000 células/ $\text{mL}^{-1}$ , para especies como *A. purpuratus*, *A. circularis* y *N. nodosus*; las especies de microalgas más utilizadas son *Isochrysis galbana*, *I. aff galbana* (T-Iso), *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros gracilis* y *C. calcitrans* (Farías-Molina, 2001; Velasco *et al.*, 2007). En larvas de *A. nucleus*, Urban (1999) recomienda una ración de *I. galbana* de 30.000 a 40.000 células/ $\text{mL}^{-1}$ , mientras que Velasco y Barros (2008) sugiere 20.000 células/ $\text{mL}^{-1}$  de *I. galbana* y *C. calcitrans* relación 1:1, usando una densidad de cultivo de 1 larva/ $\text{mL}^{-1}$ . Generalmente, se utiliza la mezcla de dos microalgas en las fases iniciales, una flagelada y una diatomea y cuando las larvas alcanzan tallas mayores, se



recomienda adicionar especies de mayor tamaño como *Tetraselmis suecica* (Helm *et al.*, 2006).

Otro factor de importancia en la larvicultura de pectínidos corresponde a la densidad de siembra larval, factor que en algunas etapas del cultivo puede aumentar o disminuir los costos de producción y tiene una influencia directa sobre el crecimiento y la supervivencia de las larvas. Según Helm *et al.* (2006), las densidades larvales recomendadas al inicio del cultivo para pectínidos están entre 5 y 10 larvas mL<sup>-1</sup>, aunque en algunos casos estas cantidades pueden aumentar con la implementación de técnicas para el cultivo a altas densidades, como la alimentación continua de las larvas teniendo en cuenta la velocidad de ingestión de las mismas con respecto al número de células alimenticias o su peso seco y modificaciones en los sistemas de recambio del agua. Sin embargo, el crecimiento larvario disminuye cuando la densidad excede cierto valor, a una talla dada (McDonald, 1988; Ortiz, 1994; Uriarte *et al.*, 2001). Esto posiblemente se deba a la competencia por el alimento o el choque frecuente entre larvas que produce una alimentación discontinua (Cragg y Crisp, 1991). También, al incremento en las concentraciones de productos de excreción, principalmente amonio, el cual es altamente tóxico (Pérez y Román, 1987; Uriarte *et al.*, 2001).

En trabajos realizados con *A. ventricosus* se presentaron mayores tasas de crecimiento a densidades entre 10 y 20 mL<sup>-1</sup> que a 5 larvas mL<sup>-1</sup>, mientras que la supervivencia no fue diferente (Ibarra *et al.*, 1997). En *A. nucleus* y en *N. nodosus* la tasa de crecimiento y supervivencia fueron mayores o iguales a una densidad de 1 que a 5 larvas mL<sup>-1</sup> (Velasco, 2008).

### 3.2. Generalidades de la especie

*A. nucleus* es un pectínido nativo del Caribe colombiano, el cual se distribuye desde el sureste de Florida, el Golfo de México y el Mar Caribe hasta Surinam, en Colombia se ha reportado en las ecorregiones del Darién, Morrosquillo, Archipiélagos coralinos, Magdalena, Tayrona, Palomino y Guajira (Díaz y Puyana, 1994). Habita fondos arenosos y con presencia de pastos marinos, especialmente en zonas arrecifales desde aguas someras hasta 50 m de profundidad (Lodeiros *et al.*, 1993; Díaz y Puyana, 1994).

Se caracteriza por tener una concha abultada siendo las dos valvas iguales y muy convexas, ornamentadas con 20 a 23 fuertes costillas radiales lisas (Figura 1A), su coloración varía usualmente entre blanco con manchas rojizas, pasando por marrón, anaranjado, púrpura y/o gris. Los adultos de esta especie por lo general no sobrepasan los 50 mm de longitud (Díaz y Puyana, 1994). Es una especie de vida corta que no supera los dos años, de rápido

crecimiento gracias a su alta eficiencia para adquirir energía del alimento y minimizar los costos metabólicos y las pérdidas de energía (Velasco 2006; 2007).

En el medio natural el fitoplancton constituye la principal dieta de los pectínidos, aunque pueden ser importantes otras fuentes de alimentación, como las finas partículas de materia orgánica muerta (detritus) con bacterias asociadas, materia orgánica disuelta, virus, hongos y larvas de invertebrados, pero en laboratorio la alimentación de estos organismos en todos los estadios de desarrollo depende solamente de microalgas (Maeda-Martínez, 2001; Helm *et al.*, 2006).

Su clasificación taxonómica según Díaz y Puyana (1994) y Peña (2001) es la siguiente:

Phylum Mollusca

Clase Bivalvia

Subclase Pteriomorpha

Superorden Eupteriomorpha

Orden Ostreoida

Suborden Pectinina

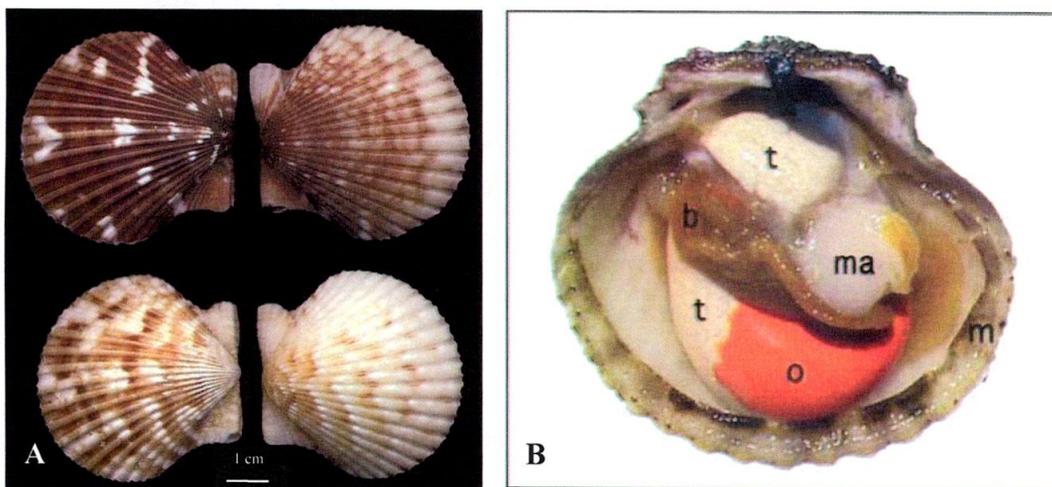
Superfamilia Pectinacea (Rafinesque, 1815)

Familia Pectinidae (Rafinesque, 1815)

Género *Argopecten* (Monterosato, 1889)

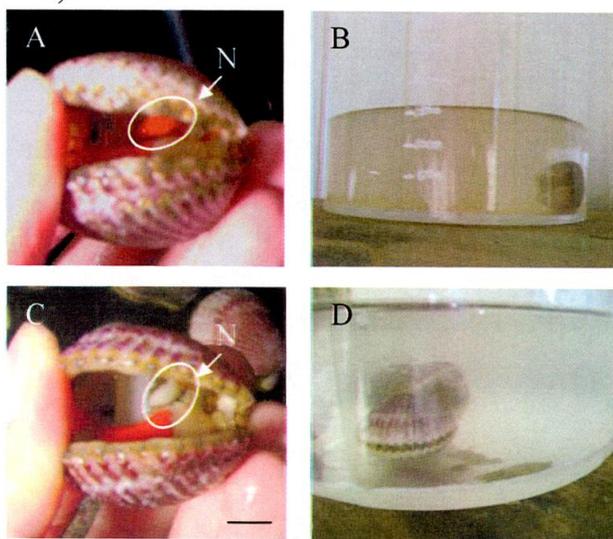
Especie *Argopecten nucleus* (Born, 1778)

Nombres comunes: Conchuela, ostión, vieira, scallop.



**Figura 1.** (A). Morfología externa de *A. nucleus* (tomado de Bill, 2009) y (B) Morfología interna de un pectínido: (t) Testículo; (o) Ovario; (b) Branquias; (ma) Músculo Aductor; (m) Manto (tomado de Helm *et al.*, 2006)

Estos organismos poseen fecundación externa y presentan hermafroditismo funcional es decir, tiene gametos masculinos y femeninos que maduran al mismo tiempo, pero su expulsión no es simultánea (Urban, 1999). La gónada es un órgano totalmente diferenciado, unido al cuerpo del animal en las proximidades del músculo aductor. En ella se distingue una porción anterior testicular de color blanco-lechoso y otra posterior ovárica de color rojo-naranja que ocupa la mayor parte de la gónada (Figura 1B) (Fernández, 1991; Román *et al.*, 2001). Esta última rodea parte del tubo digestivo y la forman numerosos canales terminados en una fina trama de folículos. Estos animales no poseen papila genital diferenciada, y los gonoductos se abren en la parte superior del saco renal, evacuándose los productos genitales a través del riñón (Figura 2), saliendo a la cavidad paleal por el poro urogenital. Los ovocitos presentan una talla de aproximadamente 65  $\mu\text{m}$  (Sastry, 1979; Fernández, 1991; Román *et al.*, 2001). Esta especie tiene una actividad reproductiva continua con desoves durante todo el año que no están sincronizados con las condiciones oceanográficas, sino con los otros individuos de una misma población (Lodeiros *et al.*, 1993; Valero *et al.*, 2000).



**Figura 2.** Expulsión de gametos femeninos por el nefridio (A y B) y Masculinos (C y D). Obsérvese la diferencia de color del agua del recipiente (B y D). N: Nefridio. La barra indica 1 cm

Los procesos de desarrollo embrionario y formación del primer y segundo estadio larval, llamados larva trocófora y larva veliger (o larva D o de charnela recta) respectivamente, ocurren dentro de las 24 a 48 horas después de la fecundación dependiendo de la temperatura y a partir de este punto inicia el desarrollo larvario y luego de 8 días se obtiene una larva umbonada y a los 13 o 15 días después de la fertilización se alcanza el estado de pediveliger, apareciendo la mancha ocular y posteriormente el pie, estructuras que anuncian la proximidad a la fijación. En este punto la larva se adhiere a un sustrato y realiza la metamorfosis, proceso en la cual se forman todas las estructuras necesarias para su vida

*Desarrollo del cultivo larval de *Argopecten nucleus* en una zona tradicionalmente dedicada al levante de postlarvas de camarón*

---



adulta e iniciando la fase de vida bentónica (Padilla, 1979; Fernández, 1991; Román *et al.*, 2001; Velasco, 2008).

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. Área de Estudio

Los reproductores se obtuvieron de la estación experimental de cultivo de bivalvos del INVEMAR, ubicada en la Bahía de Neguanje (Playa del Muerto) (Lat. 11°20' N, Long. 74°05' W.), (PNNT) Santa Marta, en donde la temperatura del agua de mar oscila de 22 a 30°C según la época del año, la salinidad varía de 33 a 37, las concentraciones de seston total es de 0,2 a 4,7 mg/l y el porcentaje orgánico en el agua se encuentra entre 15 y 60% (Urban, 1999).

Los diferentes experimentos de fertilización y cultivo larval se realizaron en las instalaciones de un laboratorio en desuso propiedad de la empresa productora de postlarvas de camarón HIDROCULTIVOS DE LA COSTA LTDA, que fue adaptado para la larvicultura de bivalvos, ubicado a 4 km de Punta Canoa Bolívar, corregimiento de Cartagena (Lat. 10°23' N., Long. 75.32' W), a 100 m de estas instalaciones se encontraban los laboratorios dedicado a la producción de postlarvas de camarón propiedad de la empresa, la cual proveyó al laboratorio de bivalvos de agua de mar prefiltrada, agua dulce y energía eléctrica.

### 4.2. Obtención, transporte y maduración de reproductores en laboratorio

Se realizó una selección de los reproductores por el método directo de observación de la apariencia morfofocromática de la gónada, y se escogieron entre 20 y 30 organismos en estado de madurez III (Tabla 1), transportándolos dentro de una cava térmica entre esponjas húmedas, mantenidas a una temperatura aproximada de 21°C durante un tiempo no mayor a 6 horas, hasta el laboratorio. Una vez allí, los organismos se aclimataron lentamente (1°C cada 20 min) hasta llegar a 25°C; posteriormente se completo el proceso de maduración gonadal, colocándolos en una canaleta rectangular de fibra de vidrio, provista de 250 L de agua de mar microfiltrada a 5 µm, aireación suave, una concentración medianamente constante de 40.000 cél mL<sup>-1</sup> de la mezcla de las microalgas *I. galbana*, *C. calcitrans* y *T. suecica*, en una relación 1:1:1, con recambios de agua diarios del 200% en el transcurso de 24 horas, temperatura de 25±1°C, y una salinidad entre 31.5 y 35.5 (Figura 3). Bajo estas condiciones, los reproductores se mantuvieron durante 10 días, tiempo en el cual concluyeron su desarrollo gonadal, alcanzando el estadio de madurez IV (según los estadios de madurez descritos en la tabla 1). El día previo al desove se suspendió el alimento para reducir la producción de fecas y el recambio se incrementó a un 300% diario.

**Tabla 1.** Estadios de madurez sexual en pectínidos (modificado de Sastry, 1963 y Cochard y Devauchelle, 1993).

ESTADÍO	DESCRIPCIÓN
I	Gónada sin coloración, totalmente transparente y vacía. Es indistinguible la porción testicular de la ovárica
II	Gónada incrementa de tamaño, con coloración tenue, empieza a diferenciarse la porción gonadal femenina (naranja pálido) de la masculina (blanquecina). Los folículos son pequeños y dispersos. Todo el intestino que está recubierto por la gónada es visible
III	Gónada incrementa de volumen y toma una coloración más acentuada. Los folículos son más grandes y densos pero persiste espacio entre ellos. El intestino es visible en algunas partes de la gónada, especialmente en la parte distal
IV	Gónada de mayor volumen, redondeada, completamente llena, los folículos están densamente empaquetados y prácticamente no se distingue el intestino. Coloración brillante en ambas porciones gonadales, crema oscuro para la parte masculina y rojo-anaranjado para la femenina
V	Gónada parcialmente desocupada. Las porciones ovárica y testicular se distinguen por los restos del producto genital

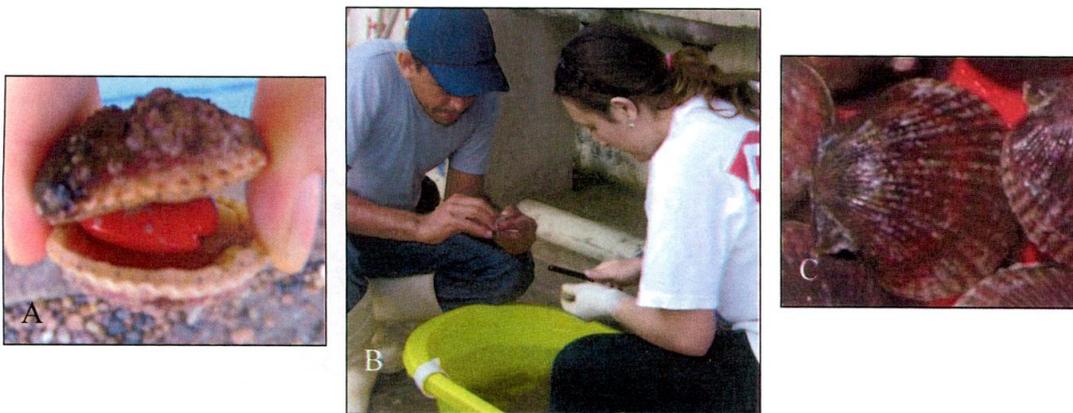


**Figura 3.** Alimentación mediante goteo (A) y Reproductores acondicionados en canaletas de 250 L (B)

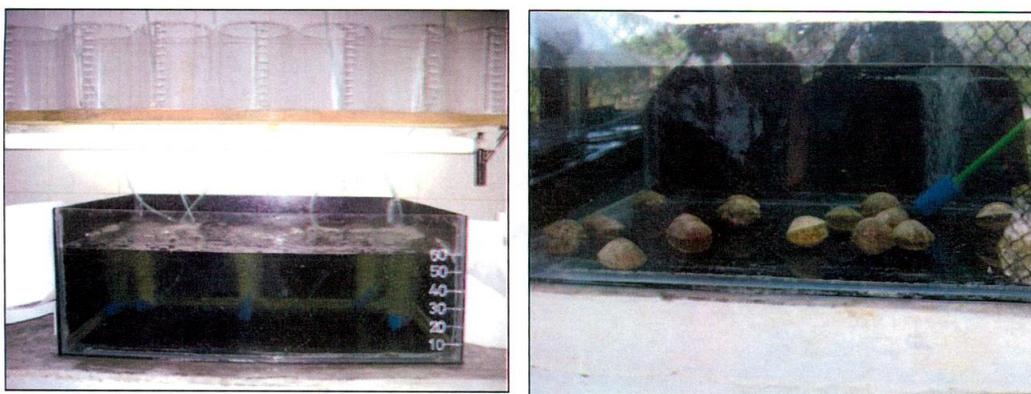
### 4.3. Experimentos

Para la realización de los diferentes experimentos se usaron entre 10 y 15 reproductores de *A. nucleus*, los cuales, una vez que alcanzaron el estadio de madurez IV, se limpiaron con cuchillo y cepillo retirando todos los epibiontes que se encontraban adheridos a la concha,

para evitar contaminar los productos gaméticos que se liberan en el desove (Figura 4). Posteriormente, en un acuario de fondo negro de 50 L de capacidad los organismos se indujeron al desove por medio de choques térmicos subiendo y bajando la temperatura del agua de 23 a 28°C durante 30 min, sumado a un proceso de irradiación constante con luz ultra violeta (UV) del agua utilizada (Figura 5). Los gametos producidos se colectaron en forma individual en recipientes con agua de mar de 2 L de capacidad para su posterior fertilización cruzada (Figura 6) y 24 horas después las larvas obtenidas se mezclaron, homogenizaron y redistribuyeron según cada tratamiento.



**Figura 4.** Limpieza de reproductores de *A. nucleus*. Concha sin limpiar (A); Limpieza manual con un cuchillo (B) y conchas limpias (C)



**Figura 5.** Acuario de inducción al desove de *A. nucleus*

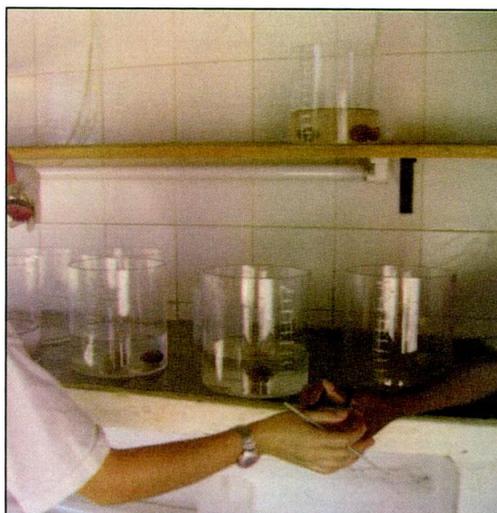


Figura 6. Colecta de gametos y fertilización de *A. nucleus*

#### 4.3.1. Efecto de la concentración de espermatozoide:ovocito y tiempo de fertilización

Con los gametos provenientes de uno de los desoves se realizó un experimento factorial de fertilización, evaluando tres concentraciones de esperma: 1) 10 (C10) espermatozoides por ovocito; 2) 50 (C50) espermatozoides por ovocito y 3) 100 (C100) espermatozoides por ovocito y tres tiempos de fertilización: a) 15 minutos (T15); b) 30 minutos (T30) y c) 45 (T45) minutos, mediante las siguientes combinaciones: C10T15, C10T30, C10T45, C50T15, C50T30, C50T45, C100T15, C100T30 y C100T45.

En este experimento se procuró coleccionar los ovocitos provenientes de la segunda expulsión de cada una de las hembras, independientemente si habían iniciado el desove como hembra o macho, para evitar coleccionar huevos autofecundados, dado que ambos productos gaméticos son expulsados por el mismo orificio.

Tanto los espermatozoides como los ovocitos obtenidos de cada organismo se tamizaron de forma individual por una malla de 90  $\mu\text{m}$  para retirar posibles heces producidas por los reproductores; posteriormente, los espermatozoides se coleccionaron en recipientes plásticos de 2 L, mientras que los ovocitos se lavaron con abundante agua de mar con ayuda de un tamiz de 23  $\mu\text{m}$  para eliminar el exceso de tejido conectivo. A continuación, los ovocitos producidos por al menos 5 hembras se mezclaron en un balde plástico de 12 L de capacidad y se estimó su cantidad por medio de la toma de 3 muestras de 1 mL, colocándola en una placa Sedgewick Rafter para conteo al microscopio (Figura 7). La estimación se logró aplicando la siguiente fórmula:

$$NT = NO * V$$

En donde,

$NT$  = Número total de ovocitos

$NO$  = Número de ovocitos presentes en 1 mL

$V$  = Volumen total (mL) de agua en el que se encuentran los ovocitos.



**Figura 7.** Tamizado de ovocitos de *A. nucleus* por una malla de 23 µm (A); Placa Sedgewick Rafter para el conteo de ovocitos (B) y Observación de ovocitos al microscopio (C)

De igual manera, los espermatozoides de al menos 5 individuos diferentes a los que produjeron los ovocitos con un tiempo de expulsión menor a 30 minutos, se mezclaron y resuspendieron en un recipiente transparente de 2 L y colectando 3 muestras de 1 mL para estimar su concentración (espermatozoides/mL) utilizando una cámara de Neubauer (Figura 8). Para determinar la concentración se empleó la siguiente fórmula:

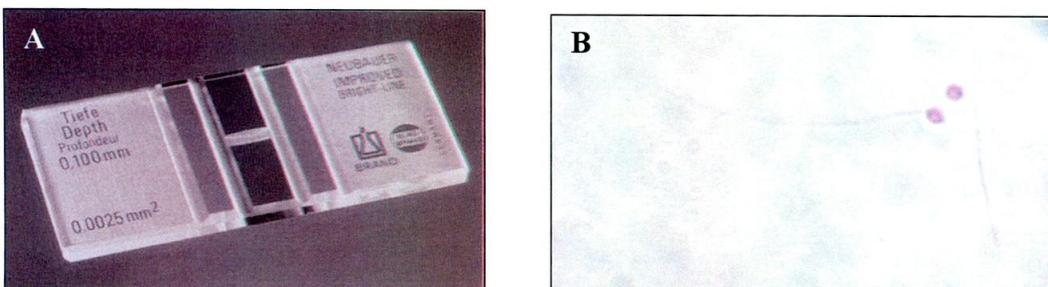
$$NT = NE * 50.000$$

En donde,

$NT$  = Número de espermatozoides/mL

$NE$  = Número de espermatozoides presentes en la placa

50.000 = Factor de conversión a mL



**Figura 8.** Cámara de Neubauer para conteo de espermatozoides (A) y Espermatozoides de *A. nucleus* (B)

Para las diferentes combinaciones de esperma y tiempo de fertilización, los ovocitos contados se colocaron en frascos de vidrio aforados a 2 L a una densidad de 75 ovocitos/mL; dos réplicas por cada tratamiento fueron realizadas (Figura 9). Pasado el tiempo de fertilización correspondiente a cada tratamiento se tomaron tres muestras de 1 mL de cada réplica y se colocaron sobre una cámara Sedgewick Rafter, para observación al microscopio, evaluando el porcentaje de fertilización, considerando fertilizado todo ovocito que presente cuerpos polares o clivaje (división) (Figura 10); para esto se aplicó la siguiente fórmula:

$$F = \frac{NF * 100}{NO}$$

En donde,

$F$  = % fertilización

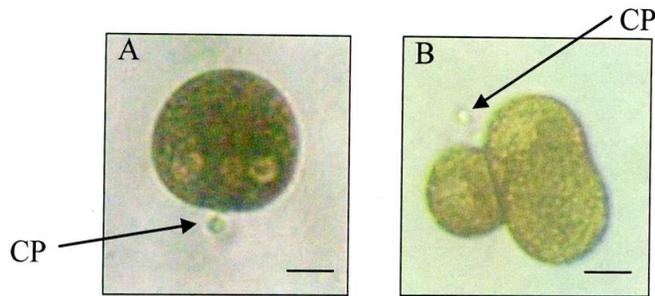
$NF$  = Número de ovocitos fertilizados

$NO$  = Número de ovocitos totales



**Figura 9.** Experimento de fertilización en *A. nucleus*

Después de la fertilización, los cigotos contenidos en cada uno de los frascos de vidrio se tamizaron de forma individual por 23  $\mu$ m para retirar el exceso de espermatozoides. Los cigotos retenidos fueron nuevamente suspendidos en botellones de policarbonato aforados a 15 L, provistos de agua de mar filtrada a 1  $\mu$ m, irradiada con luz UV, aireación suave y termoregulada a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  para que continuarán el desarrollo larvario (Figura 11A).



**Figura 10.** Ovocitos fertilizados. Con presencia de cuerpo polar (A) y ovocito en división o clivaje (B). CP. Cuerpo polar. . La barra indica 20  $\mu\text{m}$ .

Cada botellón correspondió a una réplica de cada tratamiento y manejó una densidad inicial promedio de 10 cigotos/mL. Después de 24 horas de la fertilización, se estimó el porcentaje de larvas D obtenidas y el de deformidad presente en cada uno de los tratamientos mediante las siguientes fórmulas:

Estimación larvas D:

$$D = \frac{NL * 100}{NF}$$

En donde,

$D$  = Porcentaje de larvas

$NL$  = Número de larvas D presentes

$NF$  = Número de ovocitos fertilizados

Estimación larvas deformes:

$$LF = \frac{LF * 100}{NF}$$

En donde,

$LF$  = Porcentaje de larvas deformes

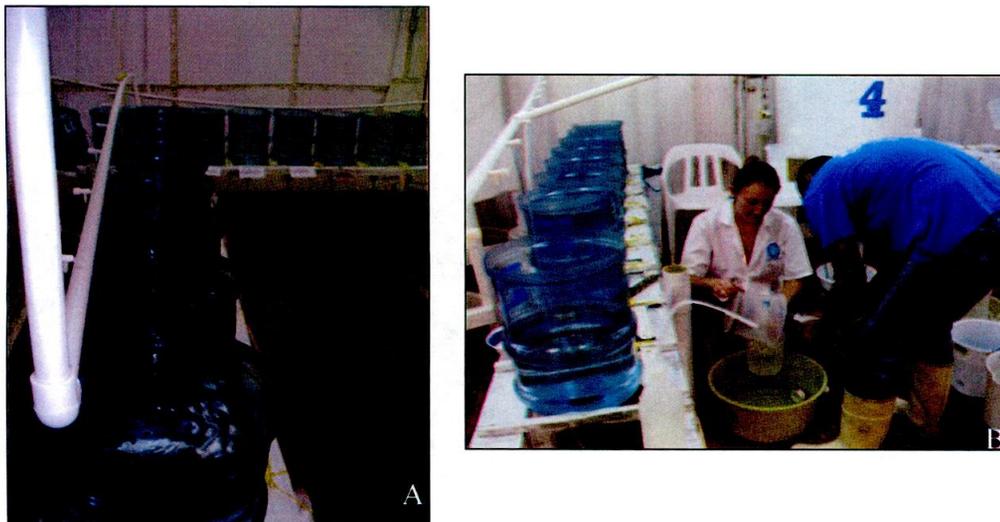
$LF$  = Número de larvas deformes

$NF$  = Número de ovocitos fertilizados

El cultivo larvario se llevó a cabo en botellones con las mismas características descritas en el desarrollo embrionario. Se utilizaron 40.000 cél  $\text{mL}^{-1}$  diarias de *I. galbana* como alimento, cada 24 horas se drenaban los tanques de larvicultura reteniendo las larvas en un tamiz de 40  $\mu\text{m}$  y resuspendiéndolas en un nuevo tanque provisto de agua limpia, aireación

y alimento (Figura 11B). Para la determinación del crecimiento, el estado de condición diaria y la supervivencia de las larvas se tomaron diariamente tres muestras de agua de 1 mL de cada una de las réplicas de los diferentes tratamientos; posteriormente, se estimó el número de larvas presentes aplicando la metodología utilizada para el conteo de los ovocitos. Para las observaciones del estado de condición diaria de las larvas se empleó una escala de medición subjetiva basada en la coloración de la glándula digestiva (Tabla 2) y se estimó el porcentaje de larvas deformes, considerando aquellas que presentarían irregularidades en el contorno de la concha (Figura 12), sumado a esto se midió en cada réplica la longitud de 30 larvas seleccionadas al azar. Por último, diariamente se registraron los parámetros fisicoquímicos de temperatura y salinidad.

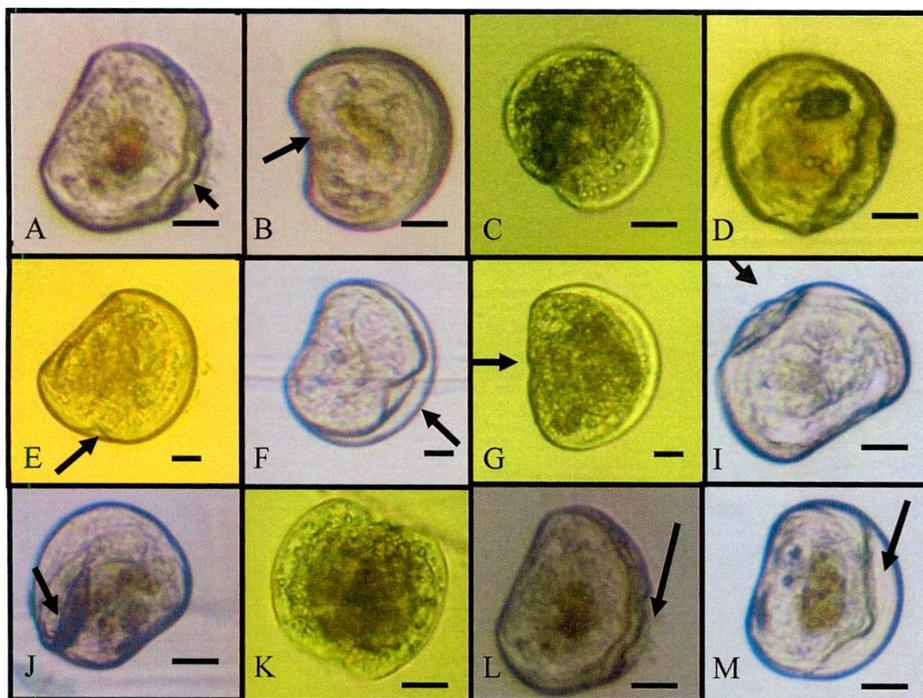
Este experimento concluyó al momento de alcanzar el estado de larva con ojo o mancha ocular, estado que antecede a la aparición del pie que indica la proximidad de la fijación a un sustrato y posterior metamorfosis de la larva o hasta que se presentara el 100% de mortalidad en los tratamientos.



**Figura 11.** Tanques utilizados durante el desarrollo embrionario y la larvicultura de *A. nucleus* (A) y proceso de recambio y toma de muestras de larvas (B)

**Tabla 2.** Estados de condición larval

ESTADO DE CONDICIÓN LARVAL	ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN	FIGURA
GLÁNDULA DIGESTIVA LLENA	LLENAS	Glándula digestiva fácilmente distinguible, de color café oscuro hasta amarillo oscuro.	
GLÁNDULA DIGESTIVA SEMILLENA	SEMILLENAS	Glándula digestiva distinguible, de color café claro hasta amarillo claro.	
GLÁNDULA DIGESTIVA TRASLÚCIDA	VACIAS	Glándula digestiva transparente, difícil de diferenciar del resto de los órganos.	



**Figura 12.** Larvas deformes. Larva con ondulaciones (A, L); Charnela deprimida en forma de media luna (B); Concha deformada (C, D, K), Con muescas (E, F, G) y Valvas plegadas (I, J, M). La barra indica 20 µm

#### 4.3.2. Efectos de la fuente de agua utilizada en el cultivo larval

Con larvas recién formadas provenientes de un desove fertilizado bajos los parámetros que presentaron mejores resultados en el experimento de fertilización, se evaluaron cuatro diferentes fuentes de agua de mar para el cultivo de larvas de *A. nucleus*: 1) Agua de mar artificial comercial (marca súper sal concentrado proline) (ARTIFICIAL); 2) Agua de mar oceánica colectada a 3 millas de la costa (OCEANICA); 3) Agua de mar proveniente de la estación de bombeo del laboratorio de postlarvas de camarón (SIN TRATAR) (Figura 13D) y 4) Agua de mar proveniente de los reservorios del laboratorio de postlarvas de camarón sometida a filtración, clorinada a 1.5 ppm y neutralizada (CLORINADA) (Figura 13F). Las diferentes fuentes de agua utilizadas fueron filtradas a 1  $\mu\text{m}$  utilizando un juego de filtros distinto para cada una y posteriormente se irradiaron con luz UV.



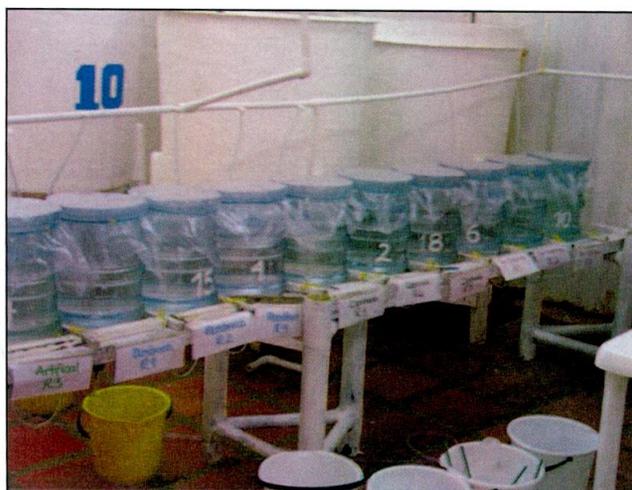
**Figura 13.** Toma y proceso de filtración del agua de mar en HIDROCULTIVOS DE LA COSTA LTDA. Toma (A); Puesto de bombeo (B); Filtro de arena (C); Tanque de recepción del agua bombeada (D); Sistema de filtración (E) y Reservorios de agua de mar filtrada y clorada (F)

Cada tratamiento estuvo constituido por tres réplicas conformadas por botellones de policarbonato aforados a 15 L, con una densidad inicial de 10 larvas  $\text{mL}^{-1}$ , equivalente a 150.000 larvas por réplica, alimentadas diariamente con 40.000 cél  $\text{mL}^{-1}$  de *I. galbana*, provistos de aireación constante, termoregulada a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , con salinidades entre 30 a 35 y pH 8. Cada 24 horas se drenaban los tanques de larvicultura reteniendo las larvas en un

tamiz de 40  $\mu\text{m}$  y resuspendiéndolas en un nuevo tanque provisto de agua limpia, aireación y alimento (Figura 14).

Para la determinación del crecimiento, el estado de condición, estimación de larvas deformes y supervivencia de las larvas se trabajó utilizando la metodología descrita en el experimento anterior.

Este experimento concluyó al momento de alcanzar el estado de larva con ojo o mancha ocular o hasta obtener el 100% de mortalidad en los tratamientos.



**Figura 14.** Experimento de diferentes fuentes de agua para cultivo larval de *A. nucleus*

#### **4.3.3. Influencia de la densidad larval inicial y la concentración de alimento**

Con larvas recién formadas provenientes de un desove manejado bajos los parámetros que presentaron mejores resultados en el experimento de fertilización y fuentes de agua, se desarrolló un experimento factorial que involucró tres densidades iniciales de cultivo (entendiéndose por densidad inicial aquella que no es manipulada ni reajustada de manera controlada durante el cultivo, salvo el día que inicio el experimento): 1) 5 larvas  $\text{mL}^{-1}$  (L5); 2) 10 larvas  $\text{mL}^{-1}$  (L10); 3) 15 larvas  $\text{mL}^{-1}$  (L15) y tres diferentes concentraciones de alimento utilizando la microalga *I. galbana*: a) 20.000 cél  $\text{mL}^{-1}$  (20C); b) 40.000 cél  $\text{mL}^{-1}$  (40C) y c) 70.000 cél  $\text{mL}^{-1}$  (70C), evaluando la influencia de cada uno de estos factores por medio de las siguientes combinaciones: L5-20C; L10-20C; L15-20C; L5-40C; L10-40C; L15-40C; L5-70C; L10-70C y L15-70C.

Cada tratamiento estuvo constituido por dos réplicas, conformada cada una por un botellón de policarbonato aforado a 15 L, provisto de agua de mar filtrada a 1  $\mu\text{m}$  e irradiada con luz



UV y condiciones de temperatura, salinidad y pH iguales a las descritas en los bioensayos anteriores y una densidad de siembra y concentración de alimento correspondiente a cada uno de los tratamientos. Cada 24 horas se drenaban los tanques de larvicultura reteniendo las larvas en un tamiz de 40  $\mu\text{m}$  y resuspendiéndolas en un nuevo tanque provisto de agua de mar limpia, aireación y alimento.

Para la determinación del crecimiento, el estado de condición diaria, estimación de larvas deformes y supervivencia se trabajó utilizando la metodología descrita en los experimentos anteriores. Este experimento concluyó al momento de alcanzar el estado de larva con ojo o mancha ocular o hasta obtener el 100% de mortalidad en los tratamientos.

#### 4.3.4. Evaluación de seis dietas para la alimentación larval

Con larvas recién formadas provenientes de un desove fecundado y cultivado bajo los mejores resultados obtenidos en la fertilización, fuentes de agua, densidad larval y concentración microalgal, se desarrolló un experimento en el que se evaluaron seis dietas microalgales para la alimentación de larvas de esta especie: 1) 100% *I. galbana* (ISO); 2) 100% *Chaetoceros calcitrans* (CHA); 3) *I. galbana* y *C. calcitrans* (ISO+CHA) en relación 1:1; 4) *I. galbana* y *Tetraselmis suecica* (ISO+TETRA) en relación 1:1; 5) *C. calcitrans* y *T. suecica* (CHA+TETRA) en relación 1:1 y 6) *I. galbana*, *C. calcitrans* y *T. suecica* (ISO+CHA+TETRA) en relación 1:1:1. Para el establecimiento de las relaciones microalgales (1:1) se tomó como patrón el peso seco de la microalga *I. galbana* y se realizó la equivalencia para *C. calcitrans* y *T. suecica* según Helm *et al*, (2006) (anexo 1).

Cada tratamiento estuvo constituido por tres réplicas, conformada cada una por un botellón de policarbonato aforado a 15 L, provisto de agua de mar filtrada a 1  $\mu\text{m}$  e irradiada con luz UV, mantenida con aireación suave, termoregulada a  $24\pm 1^\circ\text{C}$ , con salinidad entre 30 a 35, pH 8 y una dieta microalgal correspondiente a cada uno de los tratamientos. Cada 24 horas se drenaban los tanques de larvicultura reteniendo las larvas en un tamiz de 40  $\mu\text{m}$  y resuspendiéndolas en un nuevo tanque provisto de agua limpia, aireación y alimento. Para la determinación del crecimiento, el estado de condición diario, estimación de larvas deformes y supervivencia se trabajó utilizando la metodología descrita en los experimentos anteriores. Este experimento concluyó al momento de alcanzar el estado de larva con ojo o mancha ocular o hasta obtener el 100% de mortalidad en los tratamientos.

#### 4.3.5. Eficacia de los tratamientos

Para la determinación de cual es el mejor tratamiento en cada uno de los diferentes experimentos realizados, se elaboró para cada experimento una tabla agrupando los mejores

resultados obtenidos para cada variable medida, basados en las tablas de ANOVA y en los grupos homogéneos provenientes de los análisis estadísticos de comparaciones múltiples que presentaron los mayores valores en cada una de los diferentes experimentos.

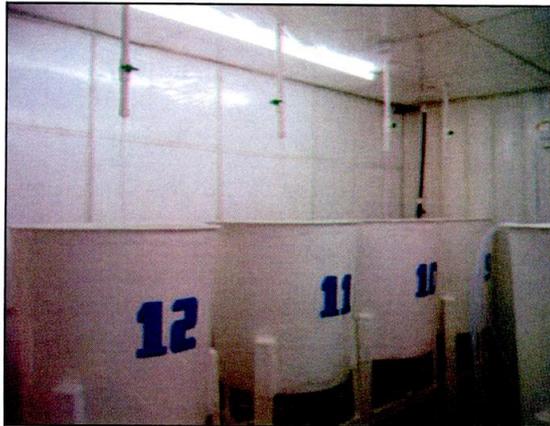
#### **4.3.6. Comparación de dos técnicas de cultivo de larvas de *A. nucleus***

Al finalizar los experimentos propuestos para evaluar la fuentes de agua utilizada, la fertilización, la densidad larval, la concentración de alimento y la dieta suministrada, se realizó un cultivo larval a nivel masivo, en el cual se aplicaron todos los conocimientos adquiridos durante estos experimentos (Técnica modificada) y se comparó con la técnica de cultivo utilizada por Velasco y Barros (2008) (Técnica tradicional) para esta misma especie, consistente en una densidad de siembra de 1 larva mL<sup>-1</sup>, alimentadas con la mezcla de las microalgas *I. galbana* y *C. calcitrans* en relación 1:1 con respecto al número de células y una concentración de alimento de 20.000 cél mL<sup>-1</sup>.

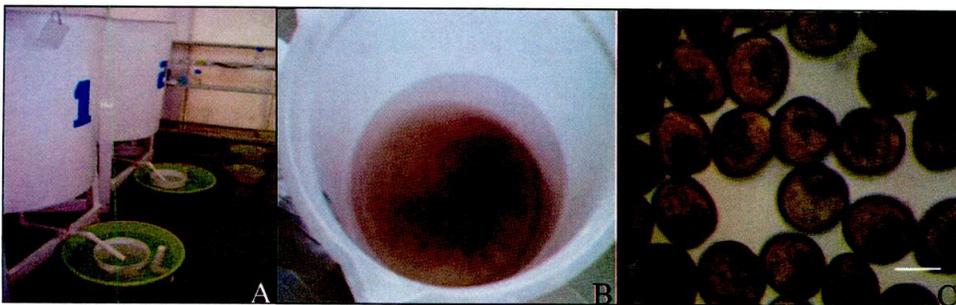
Para este experimento se colectaron, transportaron, aclimataron e indujeron al desove 50 organismos de *A. nucleus*, según la metodología que se trabajó anteriormente. Los gametos producidos y las larvas generadas se dividieron en dos grupos, el primero fue manejado y mantenido bajo las condiciones descritas por Velasco y Barros (2008) y el segundo bajo las condiciones de fuente de agua, fertilización, densidad, dieta y concentración de alimento que mostraron los mejores resultados durante el desarrollo de cada uno de los experimentos realizados en este trabajo.

Estos cultivos se desarrolló en tanques de fibra de vidrio de 500 L de capacidad (Figura 15), con tres réplicas por tratamiento, provistos de agua de mar filtrada a 1 µm e irradiada con luz UV y con aireación suave.

Diariamente se drenaban los tanques de larvicultura reteniendo las larvas en un tamiz de 40 µm, resuspendiéndolas en un nuevo tanque provisto de agua de mar limpia, aireación y alimento. Durante este proceso se tomaron tres muestras de 1 mL de cada tanque en las cuales se contaron las larvas, se midió la longitud de 30 de ellas seleccionadas al azar y se realizaron observaciones al microscopio sobre su estado de condición diaria y deformidad larval, con la metodología descrita anteriormente (Figura 16).



**Figura 15.** Tanque para el cultivo masivo de larvas de *A. nucleus*



**Figura 16.** Proceso de recambio de larvas de *A. nucleus*. Drenado de tanques de larvas (A); Colecta de larvas para conteo (B) y Larvas al microscopio (C). La barra indica 30  $\mu$ m

Esta comparación concluyó al momento de alcanzar el estado de larva con ojo o mancha ocular o hasta obtener el 100% de mortalidad en los tratamientos.

Los resultados obtenidos en esta sección son presentados en el Anexo 2 por tratarse más de una comparación entre métodos de cultivos y sus implicaciones económicas que de la evaluación específica de alguna variable biológica del cultivo.

#### 4.4. Análisis estadístico

En el caso de los experimentos de evaluación de diferentes fuentes de agua utilizada en el cultivo larval y en el de evaluación de seis dietas para la alimentación larval, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía y en los experimentos de Influencia de la densidad larval inicial y la concentración de alimento y efecto de la concentración espermatozoide:ovocito y tiempo de fertilización se hicieron ANOVA de dos vías. Estos análisis se realizaron siempre y cuando las variables cumplieran con los supuestos de



normalidad evaluados con el estadístico de Shapiro-Wilks y homocedasticidad mediante la prueba de Cochran. Posteriormente, seguido de las ANOVAS se realizó una prueba de comparaciones múltiples (prueba Tukey HSD).

En los casos que no se cumplieron los supuestos se aplicaron transformaciones a los datos como logaritmo natural (Log), logaritmo en base 10 (Log 10), Ranqueado (Rank) y cuando no fue posible aplicar la transformación se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis.

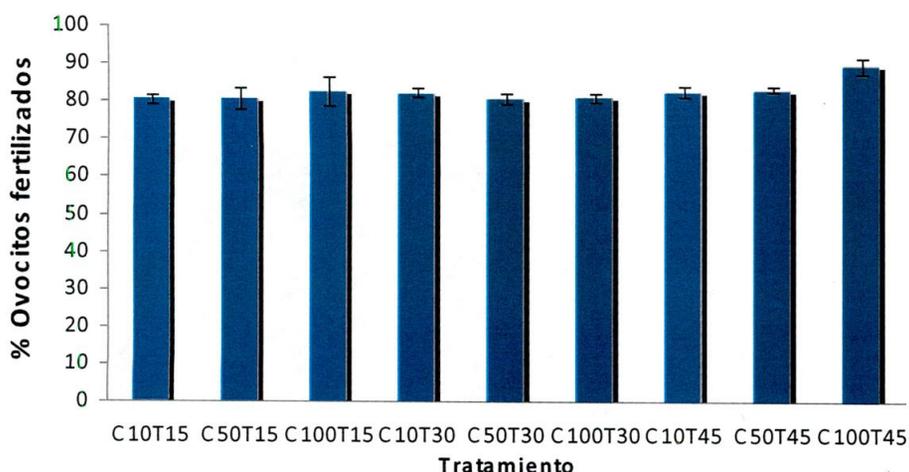
Los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa Statgraphics plus 4.0 y para las decisiones se tomaron teniendo en cuenta un alfa ( $\alpha$ ) de 0.05.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Efectos de la concentración espermatozoide: ovocito y el tiempo de fertilización

#### 5.1.1. Fertilización

En la Figura 17 se observa que en la mayoría de los tratamientos, el porcentaje de ovocitos fertilizados estuvo entre el 80.5 y 83%, excepto C100T45 que presentó un 89.4%. El ANOVA realizado con los porcentajes de ovocitos fertilizados estableció primero: que no hay una diferencia significativa entre la concentración de espermatozoides y los ovocitos fertilizados con un valor  $P=0.0544$  y un  $F=4.09$ , segundo: el tiempo de fertilización con un  $P=0.0096$  y un  $F=8.13$  es el factor más influyente sobre la tasa de ovocitos que se fertilizan, tercero: no se presentó una interacción significativa entre el tiempo de fertilización y la concentración de espermatozoides con un  $P=0.0803$  y un  $F=2.98$ . Posteriormente, la prueba de múltiples comparaciones realizada a los diferentes tiempos demostró que el porcentaje de ovocitos fertilizados en el tiempo de 45 min es significativamente mayor que los demás tiempos de fertilización (Tabla 3).



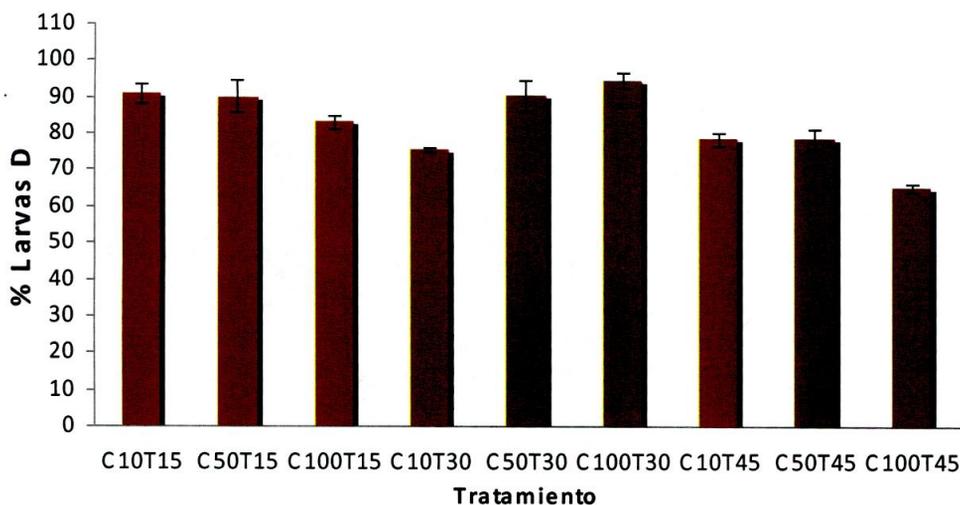
**Figura 17.** Porcentaje de fertilización de ovocitos de *A. nucleus* en diferentes concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización. (La barra indica el error estándar)

**Tabla 3** . Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje de ovocitos fertilizados en *A. nucleus* bajo los diferentes tiempos evaluados.

Tiempo de fertilización	Conteo	LS media	Grupos homogéneos
15	6	81.1167	X
30	6	81.2833	X
45	6	84.95	X

### 5.1.2. Porcentaje de larvas D

Los mayores porcentajes de larvas D se presentaron en los tratamientos C100T30 y C10T15 con un 94.4 y 91% respectivamente y los menores en C10T30 (75.3%) y C100T45 (65.1%) (Figura 18). El ANOVA mostró que la concentración de espermia utilizada no influye significativamente en el porcentaje de larvas D obtenidas con un  $P=0.4751$  y  $F=0.81$ , por el contrario el tiempo de fertilización con un  $P=0.0256$  y un  $F=5.66$  es determinante al momento de obtener larvas D. No se presentó una interacción significativa en la obtención de larvas D, entre el tiempo de fertilización y la concentración de espermatozoides con  $P=0.1135$  y  $F=2.53$  El análisis de múltiples comparaciones realizado a la variable tiempo de fertilización, indico que el grupo homogéneo conformado por los tratamientos de T15 y T30 fueron significativamente superiores (Tabla 4).



**Figura 18.** Porcentaje de larvas D de *A. nucleus* en diferentes concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización. (La barra indica el error estándar)



**Tabla 4.** Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje de larvas D por tiempo de fertilización en *A. nucleus*

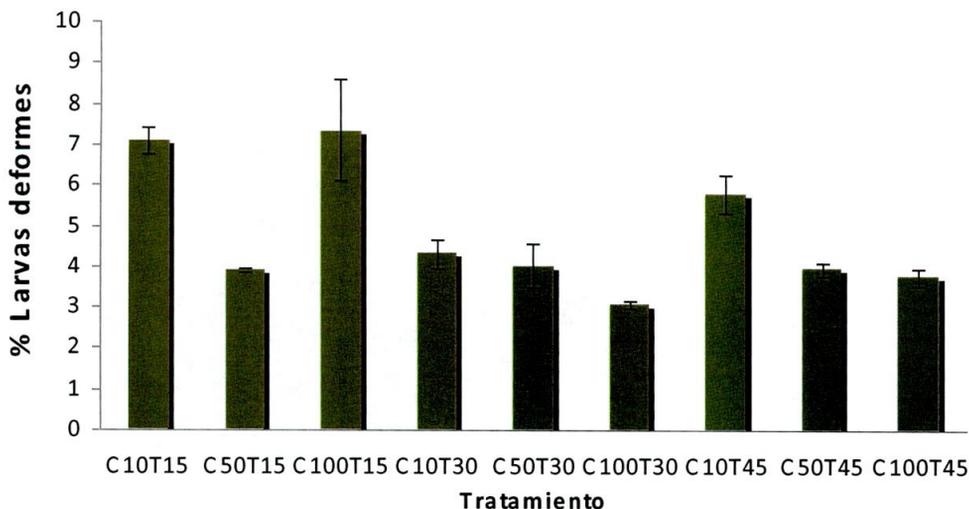
Tiempo de fertilización	Conteo	LS media	Grupos homogéneos
45	6	74	X
30	6	86.5	XX
15	6	88	X

### 5.1.3. Porcentaje de deformidad larval

Los mayores porcentajes de deformidad larval se observaron en C100T15 (7.3%) y C10T15 (7.1%) y los menores en C100T30 y C100T45 con 3 y 3.7% respectivamente (Figura 19). El ANOVA mostró que tanto la concentración de espermatozoides ( $P=0.0360$ ,  $F=4.94$ ) como el tiempo de fertilización ( $P=0.0153$  y  $F=6.89$ ) influyen significativamente en la formación de larvas deformes, sin que se presente interacción entre estos dos factores con un  $P=0.127$  y un  $F=2.40$ .

La prueba de múltiples comparaciones determinó que las menores tasas de larvas deformes se presentaron en el grupo homogéneo conformado por las concentraciones de espermatozoides C50 y C100 y los tiempos de fertilización T45 y T30, (

Tabla 5).



**Figura 19.** Porcentaje de larvas deformes de *A. nucleus* en diferentes concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización. (la barra indica el error estándar).



**Tabla 5.** Prueba de múltiples comparaciones de la concentración de espermatozoides y tiempo de fertilización en *A. nucleus*

CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES			
Concentración	Conteo	LS medias	Grupos homogéneos
50	6	0.58866	X
100	6	0.634256	XX
10	6	0.747424	X
TIEMPO DE FERTILIZACIÓN			
Tiempo	Conteo	LS medias	Grupos homogéneos
30	6	0.570235	X
45	6	0.639283	XX
15	6	0.760822	X

#### 5.1.4. Supervivencia larval

Los mayores promedios se presentaron en los tratamientos sometidos a un tiempo de fertilización de 45 minutos, representados por C10T45, C50T45 y C100T45, mostrando en comparación con los demás tratamientos, el menor ritmo de descenso en su supervivencia con un 5.3, 4.9 y 5.4 %/día respectivamente (Figura 20). El análisis estadístico demostró que la concentración de espermatozoides no ejerce una influencia significativa sobre la supervivencia de las larvas D con un  $P=0.246$  y  $F=1.41$ , por el contrario el tiempo de fertilización si fue determinante con un  $P=0.009$  y  $F=4.84$ , pero no se presentó interacción entre estas dos variables con un  $P=0.931$  y  $F=0.21$ . La prueba de múltiples comparaciones aplicada en los tiempos de fertilización estableció que las mayores tasas se presentaron con T45 (Tabla 6).

**Tabla 6.** Prueba de múltiples comparaciones de la supervivencia larval bajo diferentes tiempo de fertilización en *A. nucleus*

Tiempo de fertilización	Conteo	LS medias	Grupos homogéneos
15	90	49.978	X
30	90	51.644	X
45	90	61.256	X

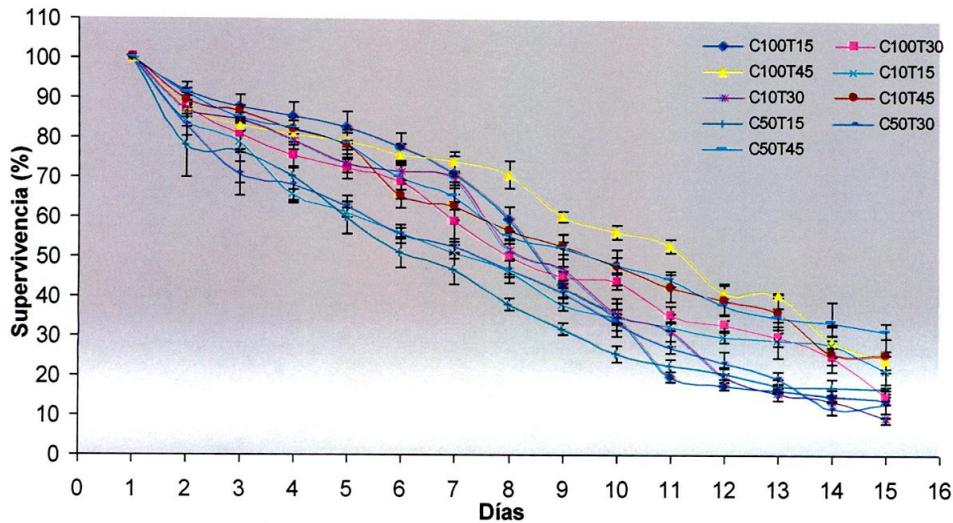
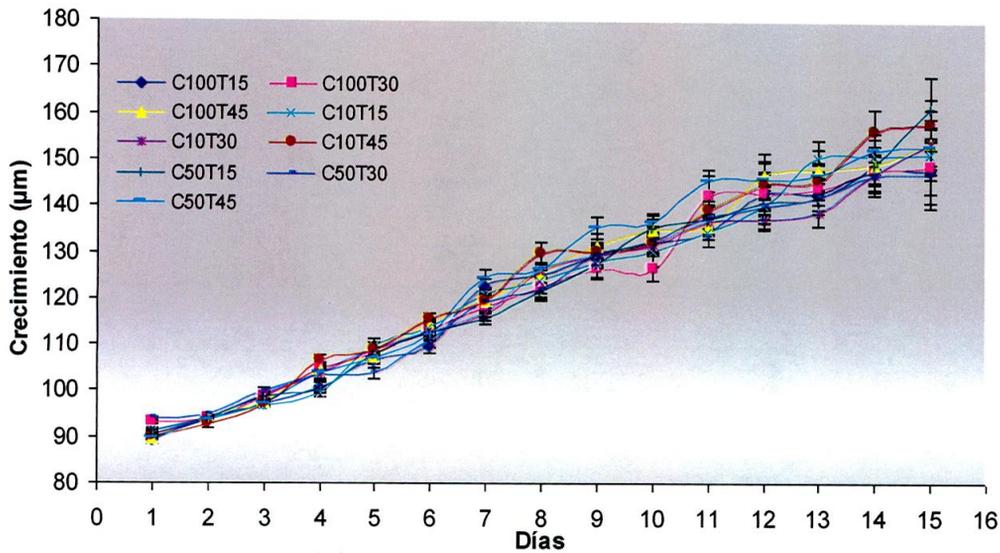


Figura 20. Supervivencia larval de *A. nucleus* bajo diferentes concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización. (La barra indica el error estándar).

### 5.1.5. Crecimiento larval

No se observó diferencias significativas en el crecimiento de las larvas entre los distintos tratamientos; sin embargo, el mayor crecimiento diario se presentó en C50T15, C10T45 y C100T45 con 5, 4.8 y 4.6  $\mu\text{m}/\text{día}$  respectivamente. En contraste los de menor crecimiento fueron C50T30 (3.8  $\mu\text{m}/\text{día}$ ) y C100T30 (4.0  $\mu\text{m}/\text{día}$ ) y C100T15 (4.2  $\mu\text{m}/\text{día}$ ). Al final del experimento las mayores tallas se observaron en C50T15 (161.5  $\mu\text{m}$ ), C10T45 (157.9  $\mu\text{m}$ ) y C100T45 (154.1  $\mu\text{m}$ ) y las menores en C50T30 (147.1  $\mu\text{m}$ ), C100T15 (147.9  $\mu\text{m}$ ) y C100T30 (148.2  $\mu\text{m}$ ) (Figura 21).

El ANOVA estableció que no existe una relación directa entre la concentración de espermatozoides y/o el tiempo de fertilización empleado sobre el ritmo de crecimiento de las larvas en ninguno de los tratamientos con  $P=0.974$  y  $0.723$  y un  $F=0.03$  y  $0.33$  respectivamente; así mismo se observó que no existe interacción entre estas variables  $P=0.999$  y un  $F=0.02$ .



**Figura 21.** Crecimiento larval de *A. nucleus* en diferentes concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización. (La barra indica el error estándar).

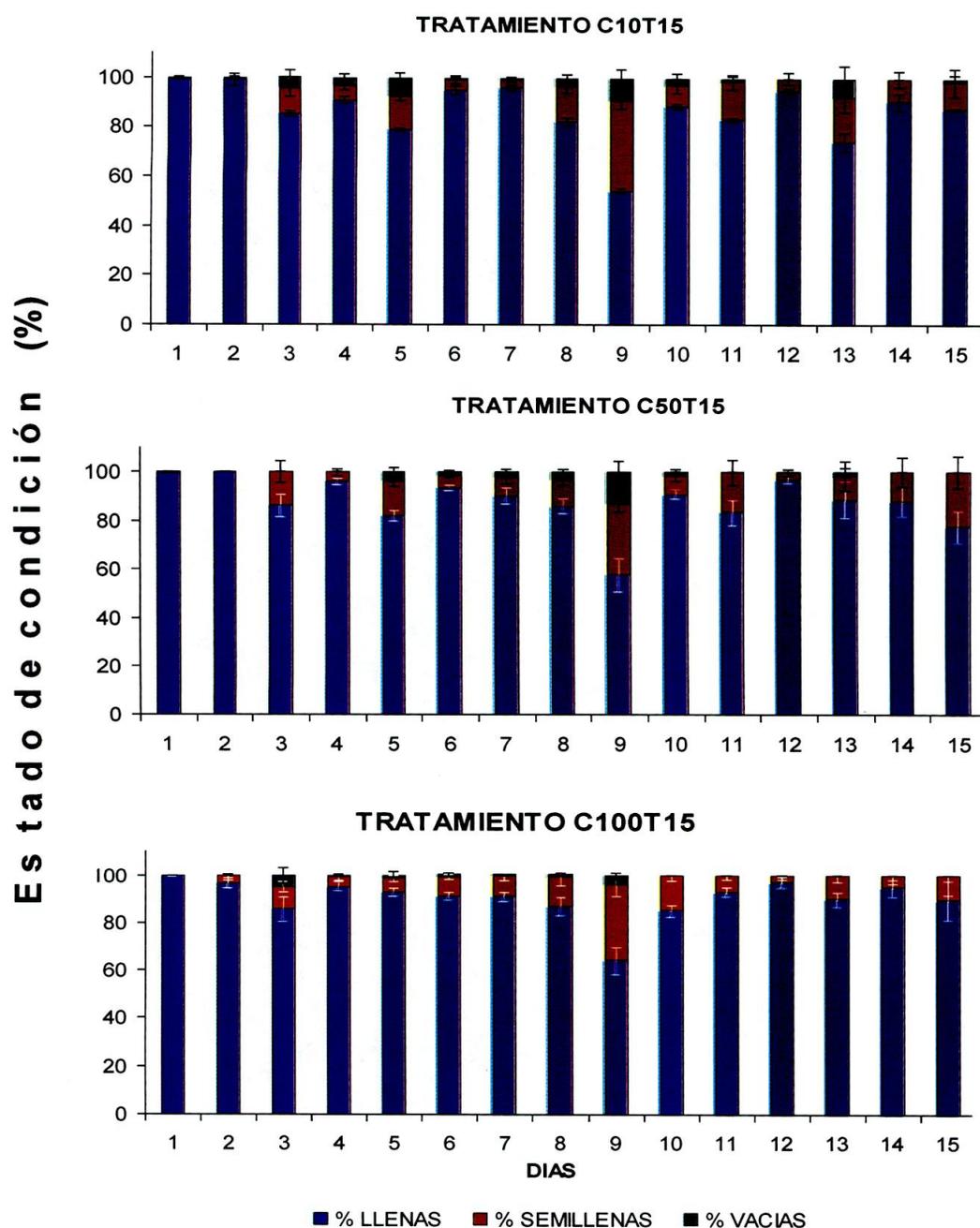
### 5.1.6. Estado de condición diaria

La presencia de larvas llenas fue el estado de condición predominante en todos los tratamientos (Figura 22, Figura 23 y Figura 24), siendo C100T15, C10T30 y C10T45 los tratamientos con mayores valores, con 90.2, 89.8 y 89.4% respectivamente, y C50T30 (85.5%), C10T15 (86.8%) y C100T30 (87.1%) los menores.

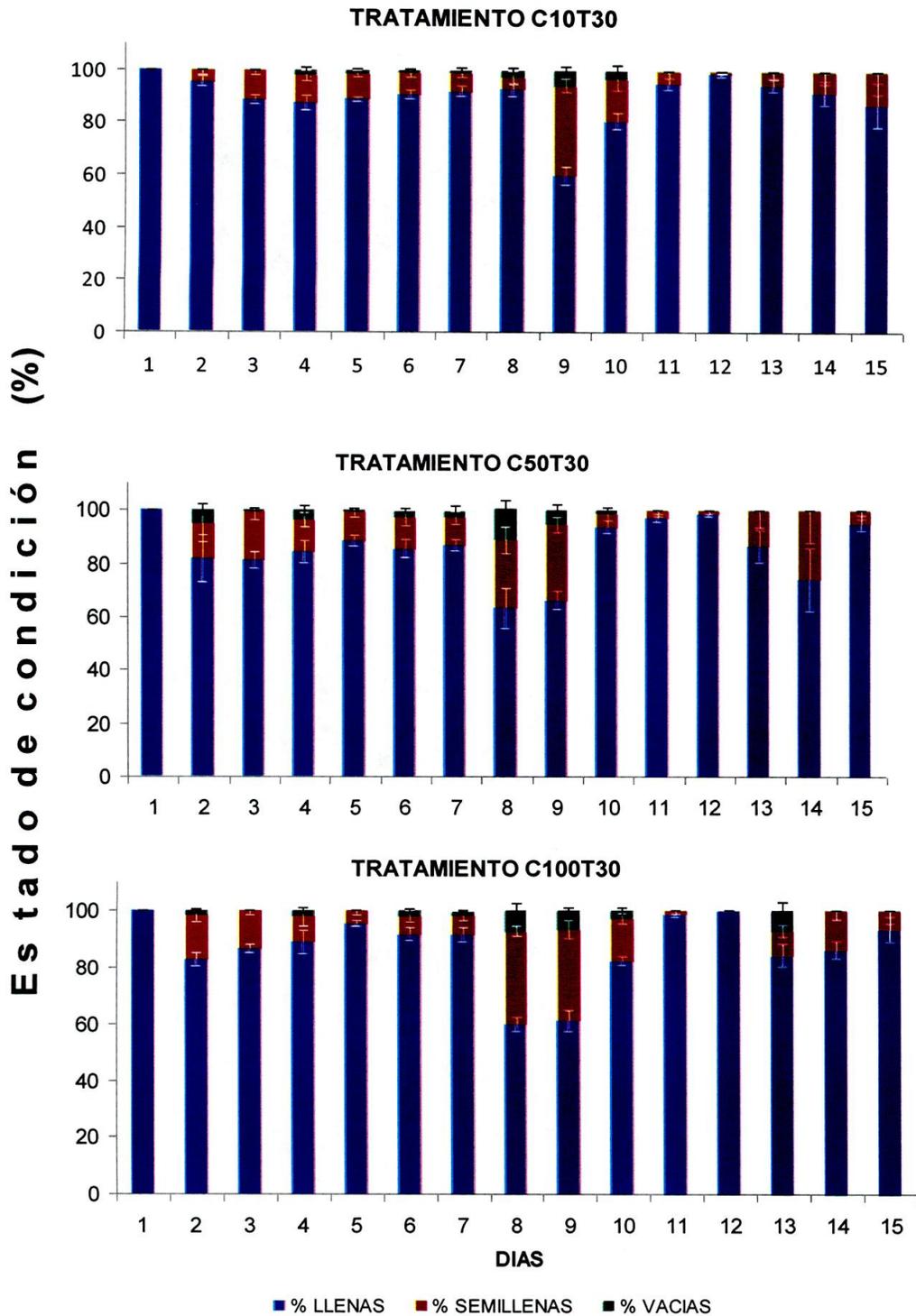
Con relación a las larvas semillenas, su presencia fue constante en todos los tratamientos a partir del segundo día de cultivo con el mayor incremento en los días ocho y nueve, para C10T45, C10T15 y C50T45 con 40.4, 36.3 y 36%; mientras que C50T30 (28.3%), C50T15 (29.1%) y C100T45 (30.5%) registraron los menores valores. Finalmente, la presencia de larvas vacías durante el cultivo larval fue escasa, con un promedio general durante el cultivo que no superó el 3% en ninguno de los tratamientos evaluados.

El análisis estadístico en cada estado de condición permitió establecer que no existe una diferencia significativa que permita afirmar que los estados de condición de larvas llenas, semillenas o vacías estén influenciados por la concentración de espermatozoides con  $P=0.4877$ ,  $0.4723$  y  $0.3256$  y un  $F=0.72$ ,  $0.75$  y  $1.13$  respectivamente. Así mismo, no se presentó diferencias significativas por parte del tiempo de fertilización en ninguno de los estados de condición mencionados con  $P=0.810$ ,  $0.706$  y  $0.281$  y un  $F=0.21$ ,  $0.35$  y  $1.28$ . En lo concerniente a la interacción entre la concentración de espermatozoides y el tiempo de

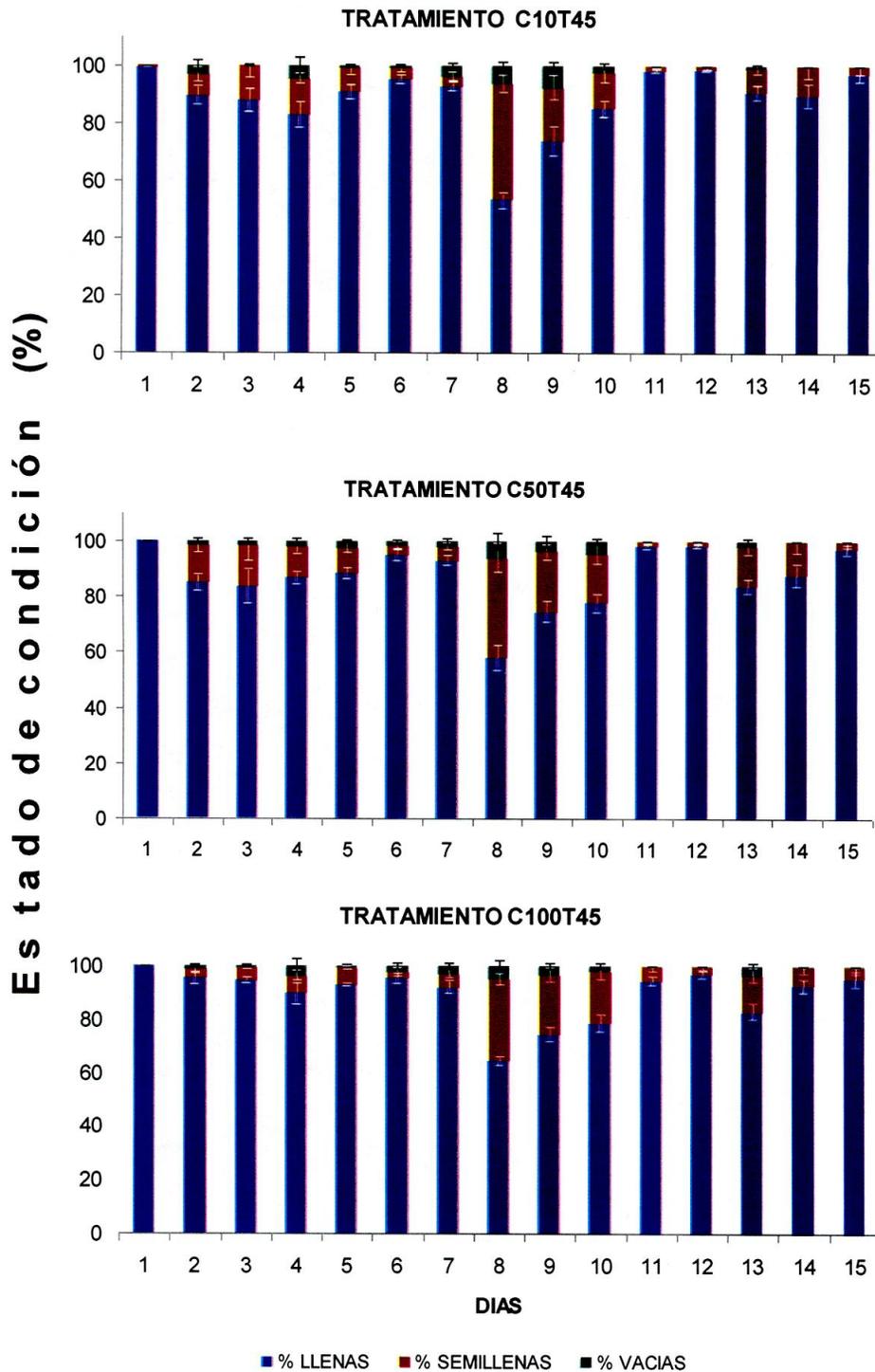
fertilización, esta fue inexistente para los tres estados de condición presentando un valor  $P=0.625, 0.885$  y  $0.122$  y un  $F=0.65, 0.29$  y  $1.86$ , para llenas, semillenas y vacías.



**Figura 22.** Porcentaje del estado de condición diario de larvas de *A. nucleus* en el tiempo de fertilización de 15 minutos y tres concentraciones de espermatozoides. (La barra indica el error estándar)



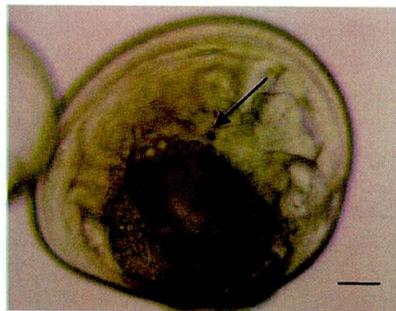
**Figura 23.** Porcentaje del estado de condición diario de larvas de *A. nucleus* en el tiempo de fertilización de 30 minutos y tres concentraciones de espermatozoides. (La barra indica el error estándar).



**Figura 24.** Porcentaje del estado de condición diario de larvas de *A. nucleus* en el tiempo de fertilización de 45 minutos y tres concentraciones de espermatozoides. (La barra indica el error estándar).

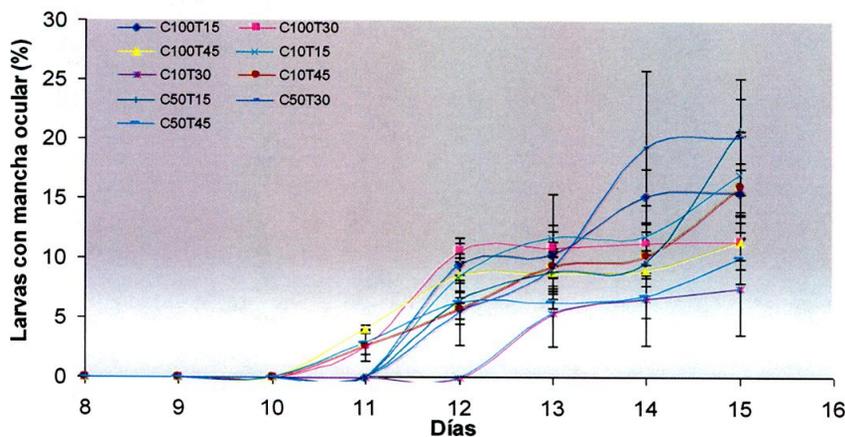
### 5.1.7. Presencia de mancha ocular

La presencia de larvas con mancha ocular (Figura 25), se observó al día 11 de cultivo en el tratamiento C100T30 y también en el tiempo de fertilización de 45 min (Figura 26). A partir del día 12 todos los tratamientos registraron en mayor o menor grado la presencia de larvas con mancha ocular; al final del experimento (día 15), los mayores porcentajes se observaron en C50T15, C50T30 y C10T15 con un 20.7, 20.2 y 17.1%, mientras que los menores se presentaron en C10T30 (7.6%), C50T45 (10.1%) y C100T45 (11.5%).



**Figura 25.** Larva de *A. nucleus* de once días de nacida con presencia de mancha ocular. La barra indica 30  $\mu$ m

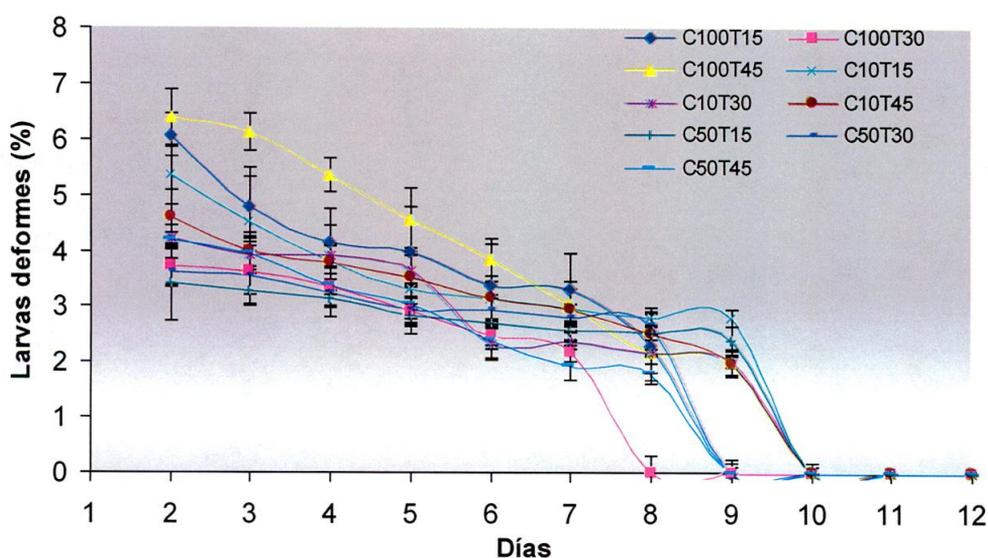
El ANOVA confirmó que no existe una influencia significativa de la concentración de espermatozoides y/o el tiempo de fertilización sobre los porcentajes obtenidos de larvas con presencia de mancha ocular  $P=0.431$  y  $0.177$  y un  $F=0.93$  y  $2.12$ , de igual forma se estableció que no existe interacción entre estas dos variables  $P=0.282$  y un  $F=1.50$ .



**Figura 26.** Porcentaje de mancha ocular en larval de *A. nucleus* en diferentes concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización. (La barra indica el error estándar)

### 5.1.8. Deformidad larval durante el cultivo

En todos los tratamientos se presentó deformidad larval cuyo porcentaje fué disminuyendo a lo largo del experimento, registrándose larvas deformes hasta el decimo día, coincidiendo con la formación del umbo en las larvas sanas. En la Figura 27 se observa que al inicio del cultivo se presentaron los mayores promedios de larvas deformes, pero en ninguno de los tratamientos evaluados esta deformidad superó el 7%, siendo C100T45 (6.9%), C10T15 (6.8%) y C100T15 (6.4%) los que presentaron los mayores promedios y a la vez el mayor ritmo de descenso a lo largo del cultivo con una pérdida de larvas deformes del 0.6, 0.6 y 0.5% diario respectivamente. Por otro lado los menores valores de larvas deformes se presentaron C100T30 (3.7%), C50T30 (3.8%) y C50T15 (4.1%). El ANOVA reveló que no hay diferencias significativas de la concentración de espermatozoides utilizada, y/o el tiempo de fertilización empleado sobre la permanencia de las larvas deformes en el cultivo larval  $P=0.0931$  y  $0.0957$  y un  $F=2.42$  y  $2.39$ , además no existe interacción entre estas dos variables  $P=0.2198$  y  $F=1.45$ .



**Figura 27.** Porcentaje de deformidad larval de *A. nucleus* bajo diferentes concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización. (La barra indica el error estándar)

### 5.1.9. Eficacia de los tratamientos

Para determinar primero la efectividad de las diferentes concentraciones de espermatozoides y los tiempos de fertilización se elaboró una tabla agrupando los mejores

resultados obtenidos para estos dos factores, basados en los grupos homogéneos provenientes de los análisis de comparaciones múltiples que presentaron los mayores porcentajes de ovocitos fertilizados, larvas D obtenidas y aquellos con los menores porcentajes de larvas deformes (Tabla 7).

Posteriormente, se procedió a identificar en cuál de las nueve combinaciones evaluadas había la presencia de por lo menos una de las concentraciones de espermatozoides y/o uno de los tiempos de fertilización registrados en la Tabla 7, tanto para ovocitos fertilizados como para larvas D y larvas deformes, indicando en cada combinación la frecuencia de aparición de los mejores grupos homogéneos y el porcentaje alcanzado, considerando la mejor combinación la que presentara la mayor frecuencia de aparición y el porcentaje más alto en cada variable. Con este criterio el tratamiento C100T30 estuvo siempre presente en los mejores grupos homogéneos de porcentaje de ovocitos fertilizados, porcentajes Larvas D obtenidas y porcentaje de larvas deformes (Tabla 8).

**Tabla 7.** Eficacia de las concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización utilizados

Variables	Ovocitos fertilizado	larvas D obtenidas	larvas deformes
Concentración de espermatozoides	100	Indiferente	50-100
Tiempo de fertilización	45	45-30	45-30

**Tabla 8.** Eficacia de las combinaciones de concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización utilizados. El \* indica los mejores valores

Combinaciones	% Ovocitos fertilizado	% Larvas D obtenidas	% Larvas deformes	Frecuencia de aparición en el mejor grupo homogéneo
C10T15	-----	-----	-----	0
C10T30	-----	75	4.3	2
C10T45	82	78	4.3	3
C50T15	-----	-----	3.9	1
C50T30	-----	90	4.0	2
C50T45	83	79	3.9	3
C100T15	83	-----	7.3	2
C100T30	81	94*	3.0*	3
C100T45	89*	65	3.7	3

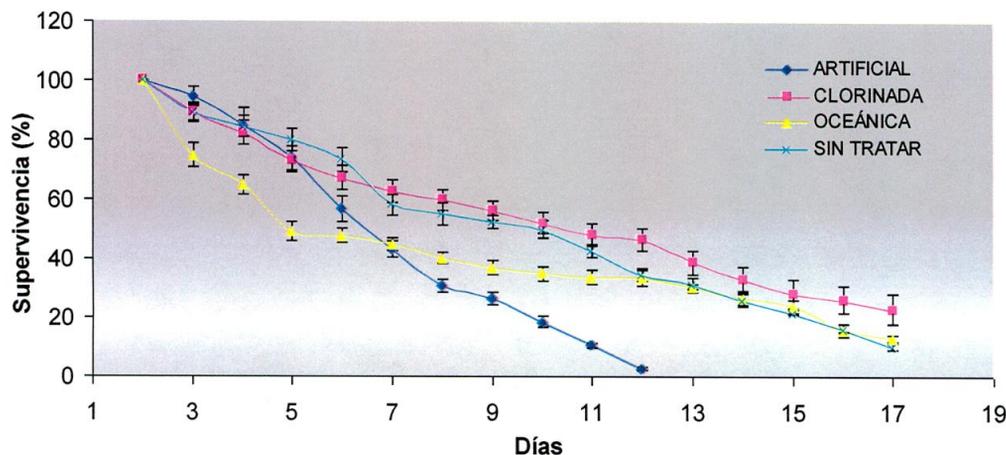


## **5.2. Efectos de la fuente de agua utilizada para el cultivo larval**

### **5.2.1. Supervivencia larval**

El tratamiento agua de mar artificial, presentó a partir del quinto día una fuerte disminución en la supervivencia, registrando para el día 12 de cultivo una supervivencia del 2.7%. Para el agua de mar colectada a tres millas de la costa (oceánica), se observó entre el segundo y quinto día un descenso de la supervivencia a razón de un 17%/día y a partir del sexto día este ritmo de descenso se redujo a un 3%/día hasta el final del experimento, registrando el último día de cultivo una supervivencia del 12% (Figura 28). Las fuentes de agua de mar proveniente de la estación de bombeo del laboratorio de postlarvas de camarón (sin tratar) y el agua de mar de los reservorios del laboratorio de postlarvas de camarón clorinada a 1.5 ppm y neutralizada (clorinada), no registraron descensos fuertes en la supervivencia, con un comportamiento muy similar entre sí a lo largo de todo el experimento, con disminuciones diarias de 5.9 y 5.1% respectivamente y supervivencia al final del experimento de 10 y 23%.

El análisis ANOVA de la supervivencia de las cuatro fuentes de agua a lo largo del tiempo, se dividió en dos etapas: **1)** El desempeño de todos los tratamientos al día de cultivo 12 por ser el último día en el cual se presentaron larvas en las cuatro fuentes de agua, observándose una diferencia altamente significativa con  $P=0.0002$  y un  $F=30.42$ . La prueba de múltiples comparaciones, comprobó que el grupo homogéneo conformado por las fuentes de agua oceánica, clorinada y sin tratar presentaron los mayores supervivencias (Tabla 9); **2)** El ANOVA de la supervivencia a lo largo del experimento de las fuentes de agua: oceánica, sin tratar y clorinada (por ser estas las únicas que permanecieron hasta el final del experimento), mostró que no existe una diferencia significativa con  $F= 0.68$  y  $P=0.508$ .



**Figura 28.** Supervivencia larval de *A. nucleus* sometida a cuatro fuentes de agua. (La barra indica el error estándar)

**Tabla 9.** Prueba de múltiples comparaciones del porcentaje de supervivencia larval de *A. nucleus* vs fuente de agua para el día 12 de cultivo

fuentes de agua	Conteo	LS media	Grupos homogéneos
Artificial	3	10.6667	X
Oceánica	2	33.0	X
Clorinada	3	41.6667	X
Sin tratar	3	42.0	X

### 5.2.2. Crecimiento larval

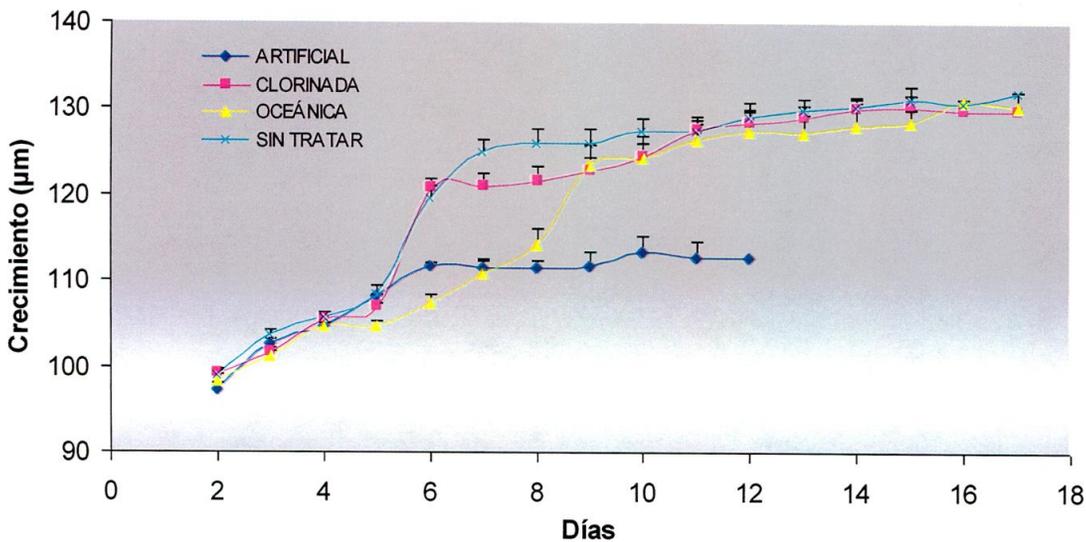
En la Figura 29 se observa que todas las fuentes de agua presentaron un comportamiento muy similar hasta el día 5 de cultivo, con una talla promedio que osciló en 105 y los 108  $\mu\text{m}$ . Entre el día 6 y 12 de cultivo se presentó un rápido crecimiento en el agua sin tratar, clorinada y oceánica equivalente a 3.0, 3.1 y 2.8  $\mu\text{m}/\text{día}$  respectivamente, alcanzando al día 12 una talla de 129.1, 128.4 y 127.4  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, las larvas mantenidas en agua artificial presentaron un retraso en su crecimiento manteniendo una talla promedio de 112.2  $\mu\text{m}$ . Finalmente entre el día 13 y el 17 de cultivo las larvas disminuyeron su ritmo de crecimiento en los tratamientos con agua clorinada, sin tratar y oceánica, a razón de 0.2, 0.6 y 0.5  $\mu\text{m}$  respectivamente, alcanzando al día 17 tallas de 129.9, 132.0 y 130.2  $\mu\text{m}$ .

El ANOVA, mostró una diferencia altamente significativa, confirmado que existe una influencia por parte de al menos una fuente de agua sobre el crecimiento de las larvas con  $P=0.0$  y un  $F = 13.9$ . La prueba de múltiples comparaciones reflejó que el grupo homogéneo conformado por las fuentes de agua oceánica, clorinada y sin tratar presentaron los mayores valores promedio (Tabla 10).



**Tabla 10.** Prueba de múltiples comparaciones para el crecimiento larval de *A. nucleus* vs la fuente de agua

Fuente de agua	Conteo	LS medias	Grupos homogéneos
Artificial	33	98.6606	X
Oceánica	39	115.815	X
Clorinada	48	120.525	X
Sin tratar	48	121.919	X



**Figura 29.** Crecimiento larval de *A. nucleus* sometida a cuatro fuentes de agua. (La barra indica el error estándar)

### 5.2.3. Estado de condición diaria larval

En la mayoría de las fuentes de agua evaluadas predominó la presencia de larvas en estado de condición llenas, con excepción del agua artificial que presentó a partir de séptimo día una disminución en el número de estas larvas, comportamiento que aumentó con el paso del tiempo (Figura 30), observando en el día 12 de cultivo un 10% de larvas llenas, 19% de larvas semillenas y 71% de larvas vacías. Para el agua oceánica los porcentajes promedio de larvas llenas, semillenas y vacías fueron de 80.4, 15.5 y 4.0%; presentando en el día 14 de cultivo los menores valores de larvas llenas con 35.8% y los mayores en semillenas y vacías con 46.7% y 17.5%. El agua sin tratar y la clorinada, registraron un comportamiento muy similar, presentándose en la primera de estas porcentajes promedio de larvas llenas,

semillenas y vacías del 86.0, 11.1 y 2.8%, mientras que la clorinada registró 82.2, 13.9 y 3.8% respectivamente. Igualmente en ambos tratamientos disminuyó los porcentajes de larvas llenas, aumento el de semillenas y vacías al día 10 de cultivo, que en el caso del agua sin tratar fue de 69.9% de larvas llenas, 21.9% de semillenas y 8.2% de vacías, mientras que el agua clorinada presento un 52.8, 32.4, y 14.7%.

El análisis estadístico de Krukall Wallis de los estados de condición larvas llenas y larvas vacías, al igual que el ANOVA para larvas semillenas, mostró que no hay diferencia significativa que permita afirmar que los porcentajes de larvas llenas con un valor  $P=0.483$  y un estadístico  $H= 2.45$ , semillenas con un valor  $P=0.323$  y estadístico  $F=1.17$  y vacías con un valor  $P=0.709$  y un estadístico  $H= 1.38$  estén influenciadas por la fuente de agua utilizada.

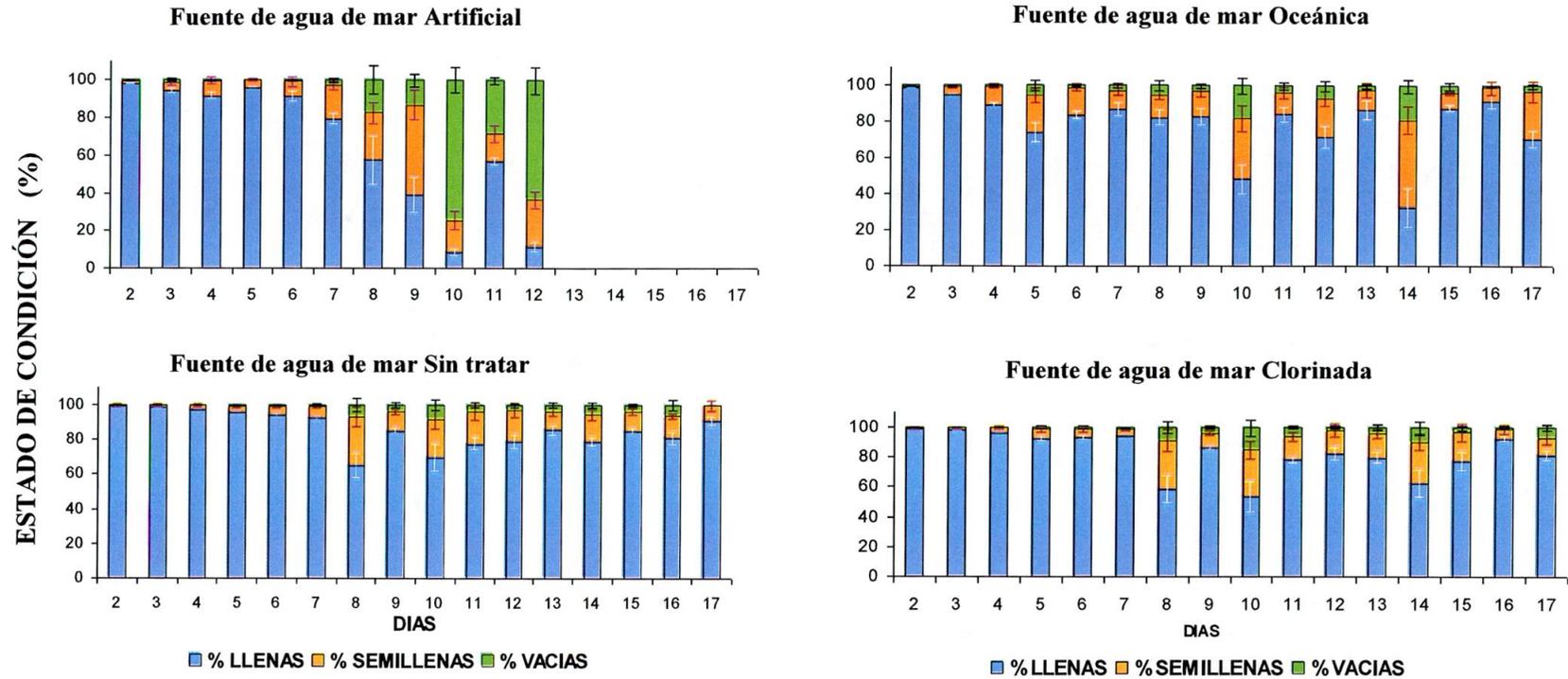


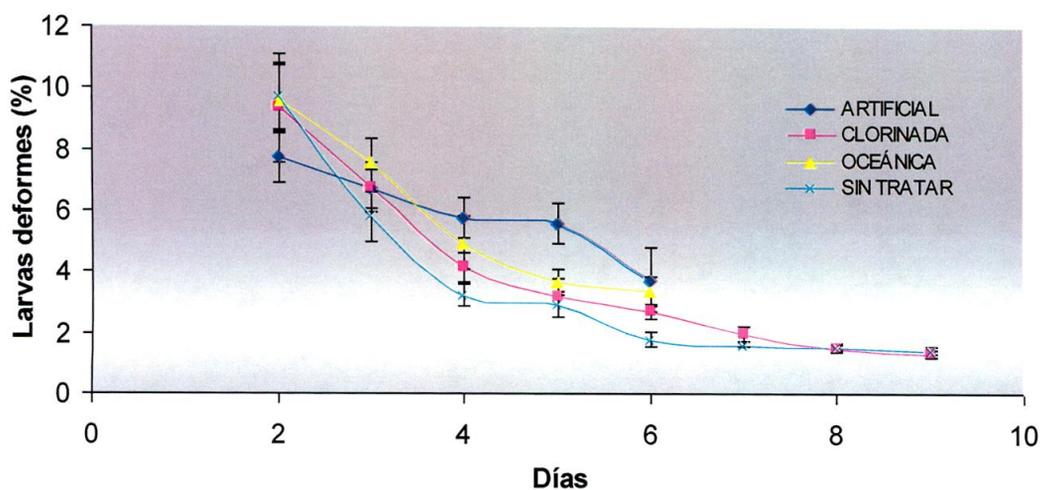
Figura 30. Porcentaje del estado de condición diario de larvas de *A. nucleus* sometida a diferentes fuentes de agua. (La barra indica el error estándar)

La presencia de larvas con mancha ocular no fue evidente en ninguna de las fuentes de agua de mar utilizadas.

#### 5.2.4. Deformidad larval durante el cultivo

La presencia de larvas deformes no se prolongó más allá del noveno día cultivo (Figura 31), siendo más notoria su presencia al inicio con 7.7, 9.6, 9.7 y 9.3% para el agua artificial, oceánica, sin tratar y clorinada. Adicionalmente, se observó que los porcentajes de larvas deformes para las cuatro fuentes de agua presentaron un comportamiento similar hasta el sexto día de cultivo, día en el cual el agua artificial y oceánica registraron la presencia de larvas deformes con un 3.7 y 3.4%, mientras que en el agua sin tratar y clorinada fue hasta el noveno día con un 1.4 y 1.3% respectivamente.

El ANOVA reveló que no existe una diferencia significativa que permita afirmar que la permanencia o no de las larvas deformes este influenciada por la fuente de agua utilizada con  $F= 0.06$  y  $P=0.9808$ .



**Figura 31.** Porcentaje de deformidad larval de *A. nucleus* sometidas a diferentes fuentes de agua. (La barra indica el error estándar)

#### 5.2.5. Eficacia del tratamiento

Se determinó la eficacia del tratamiento teniendo en cuenta la frecuencia en la que aparecía los mejores grupos homogéneos de las variables medidas y el porcentaje que había alcanzado considerando como la mejor, aquella que presentara la mayor frecuencia de aparición y el porcentaje más alto en cada variable medida; bajo este criterio el agua sin tratar y clorinada estuvieron siempre presentes en los mejores grupos homogéneos de supervivencia larval y crecimiento, registrando los mejores valores (Tabla 11).

**Tabla 11.** Eficacia de las fuentes de agua. El \* indica los mejores valores.

Tratamiento	Supervivencia %	Crecimiento	Larvas deformes %	larvas llenas %	larvas semillenas %	larvas vacías %	Frecuencia aparición
Artificial	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
Oceánica	12.0	130.2	-----	-----	-----	-----	2
Clorinada	23.0*	129.9	-----	-----	-----	-----	2
Sin tratar	10.0	132.0*	-----	-----	-----	-----	2

### 5.3. Influencia de la densidad larval inicial y la concentración de alimento

#### 5.3.1. Supervivencia larval

La supervivencia larval durante los 14 días que duro este experimento, mostró un comportamiento muy similar para los 9 tratamientos evaluados (Figura 32); a pesar que el grupo conformado por los tratamientos L10-70C (3.4%), L5-40C (6.9%) y L5-70C (5.2%), al igual que L10-40C (5.3%), L15-40C (1.6%) y L15-70C (1.6%) mantuvieran larvas vivas solo hasta los días 12 y 13 de cultivo respectivamente. Sin embargo, fue posible destacar 3 periodos de tiempo a lo largo del experimento: *Periodo 1*, comprendido entre el segundo y el quinto día de cultivo, tiempo en el cual la supervivencia en los nueve tratamientos evaluados descendió a un ritmo de 5.3% diario; *Periodo 2*, entre el sexto y el décimo día de cultivo caracterizado por una fuerte disminución en la supervivencia de todos los tratamientos con un 11% diario y un *Periodo 3*, entre el día 11 y 14 de cultivo con un disminución promedio en la supervivencia de 7.5% diario. Cabe resaltar que solo permanecieron hasta el final del experimento (Día 14) los tratamientos alimentados a una concentración de 20.000 cél mL<sup>-1</sup>, representados por L5-20C, L10-20C y L15-20C con una supervivencia 5.8, 4.5 y 3.4%.

El ANOVA de la supervivencia en los 9 tratamientos estableció que no existen diferencias significativas que permitan suponer que hay una relación entre la densidades larvales o las concentraciones de alimento utilizadas con la supervivencia alcanzada por las larvas con  $P=0.9730$  y  $0.732$  y un  $F=0.03$  y  $0.31$  respectivamente; de igual manera se determinó que no existe interacción entre la densidad larval y la concentración de alimento con la supervivencia larval con  $P=0.944$  y un  $F=0.19$ .

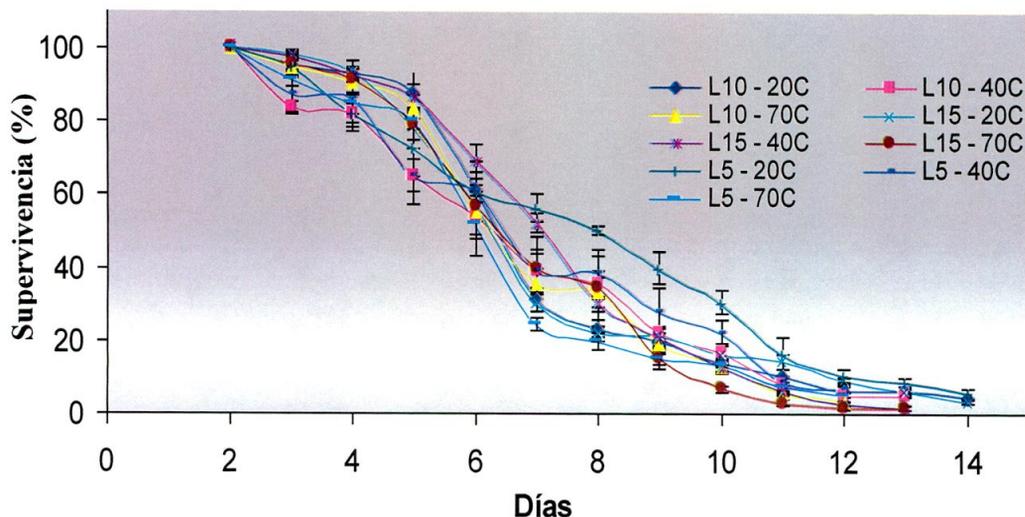


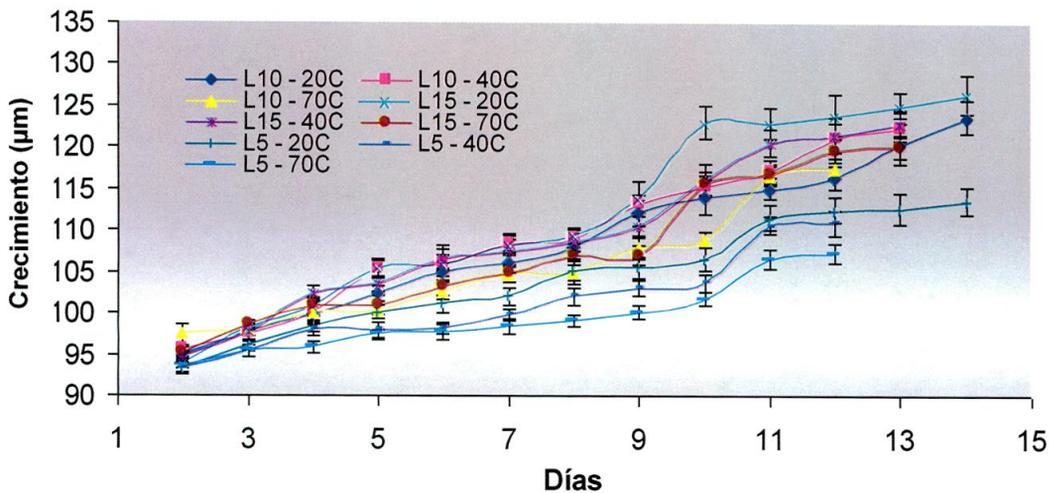
Figura 32. Supervivencia larval de *A. nucleus* sometidas a diferentes densidades larvales y concentraciones de alimento. (La barra indica el error estándar)

### 5.3.2. Crecimiento larval

En la Figura 33 se observa, que en la mayoría de los días de cultivo los tratamientos que registraron las tallas promedio más altas fueron L15-20C, L15-40C y L10-40C, con un crecimiento de 2.8, 2.5 y 2.4  $\mu\text{m}/\text{día}$ . En contraste, los menores valores se presentaron en los tratamientos mantenidos a una densidad de 5 larvas  $\text{mL}^{-1}$ , representados por L5-20C (1.7  $\mu\text{m}/\text{día}$ ), L5-40C (1.8  $\mu\text{m}/\text{día}$ ) y L5-70C (1.4  $\mu\text{m}/\text{día}$ ).

Al evaluar las tallas para el día 12 de cultivo por ser este el último día en el cual se registraron valores para los nueve tratamientos, se mantuvo la tendencia por parte de L15-20C, L15-40C y L10-40C de conservar los mayores valores con 123.9, 121.8 y 121.1  $\mu\text{m}$  y de igual manera los menores valores fueron L5-20C (112.5  $\mu\text{m}$ ), L5-40C (110.9  $\mu\text{m}$ ) y L5-70C (107.2  $\mu\text{m}$ ). El ANOVA de dos vías mostró que existe una influencia altamente significativa entre la densidad larval inicial utilizada y el crecimiento alcanzado por las larvas, con  $P=0.000$  y un  $F=18.06$ ; mientras que con la concentración de alimento, no mostró una influencia de esta variable con el crecimiento alcanzado por las larvas con  $P=0.1585$  y un  $F=1.86$ ; de igual modo no se observó interacción entre la densidad larval y la concentración de alimento utilizada en lo que respecta al crecimiento larval  $P=0.5962$  y un  $F=0.70$ .

La prueba de múltiples comparaciones, mostró que el grupo homogéneo con mejor crecimiento promedio lo conformaron los tratamientos mantenidos a una densidad larval de 10 y 15 larvas  $\text{mL}^{-1}$  (Tabla 12).



**Figura 33.** Crecimiento larval de *A. nucleus* sometidas a diferentes densidades larvales y concentraciones de alimento. (La barra indica el error estándar)

**Tabla 12.** Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje del crecimiento larval de *A. nucleus* vs densidad larval y concentración de alimento

Densidad larval	Conteo	LS medias	Grupos homogéneos
5	70	101.638	X
10	72	107.86	X
15	74	109.654	X

### 5.3.3. Estado de condición diaria larval

El promedio general de los 14 días de cultivo en los 9 tratamientos, reveló que las larvas en mejor estado de condición (larvas llenas), se encontraron en aquellos tratamientos mantenidos a 10 larvas  $\text{mL}^{-1}$  representados por L10-40C, L10-20C y L10-70C, con un porcentaje del 98.5, 92.3 y 91.6% respectivamente. Este mismo grupo presentó el menor promedio de larvas semillenas con 1.3, 7.4 y 6.2% y larvas vacías con 0.0, 0.57 y 1.7%; el segundo mejor comportamiento fué la densidad de 15 larvas  $\text{mL}^{-1}$  representados por L15-20C (91%), L15-70C (89.3%) y L15-40C (88.1%) y finalmente, los valores más bajos de larvas llenas correspondió a los tratamientos mantenidos a una densidad de 5 larvas  $\text{mL}^{-1}$  representados por L5-20C (87.7%), L5-40C (88.1%) y L5-70C (81.4%) (Figura 34).

Cabe anotar que entre el séptimo y el noveno día de cultivo los tratamientos presentaron la mayor disminución en el porcentaje de larvas llenas, coincidiendo este comportamiento con un descenso en la supervivencia de las larvas. Resalta, que para este periodo de tiempo en particular, los tratamientos que presentaron los valores más altos de larvas en mejor estado de condición (larvas llenas) fueron L10-40C (96%), L10-20C (88.5) y L15-20C (86.5%),



mientras que los más bajos fueron registrados en L5-70C (68%), L5-40C (80.7%) y L10-70C (81%).

La densidad influyó sobre los porcentajes de larvas llenas, semillenas y vacías presentes, con  $P=0.0014$ ,  $0.0033$  y  $0.0004$  y  $F= 6.82$ ,  $5.87$  y  $8.03$ ; sin embargo, no se detectó una influencia significativa por parte de la concentración de alimento sobre los porcentajes de larvas llenas, semillenas y vacías presentes, con  $P=0.749$ ,  $0.1852$  y  $0.0546$  y  $F=6.62$ ,  $1.70$  y  $2.95$ . De igual manera, este análisis permitió determinar que existe una interacción significativa entre la densidad larval y la concentración de alimento, tanto para las larvas llenas como para las semillenas y vacías  $P=0.0215$ ,  $0.0158$  y  $0.0095$  y  $F=2.94$ ,  $3.13$  y  $3.44$ . Las pruebas de múltiples comparaciones en cada estado de condición para los 9 tratamientos, mostró que en el caso de larvas llenas el tratamiento L10-40C presentó el valor promedio más altos (Tabla 13), de igual manera este tratamiento tuvo el menor valor de larvas semillenas (Tabla 14) y por último los menores valores de larvas vacías se observaron en el grupo homogéneo constituido por L10-40C y L5-40C (Tabla 15).

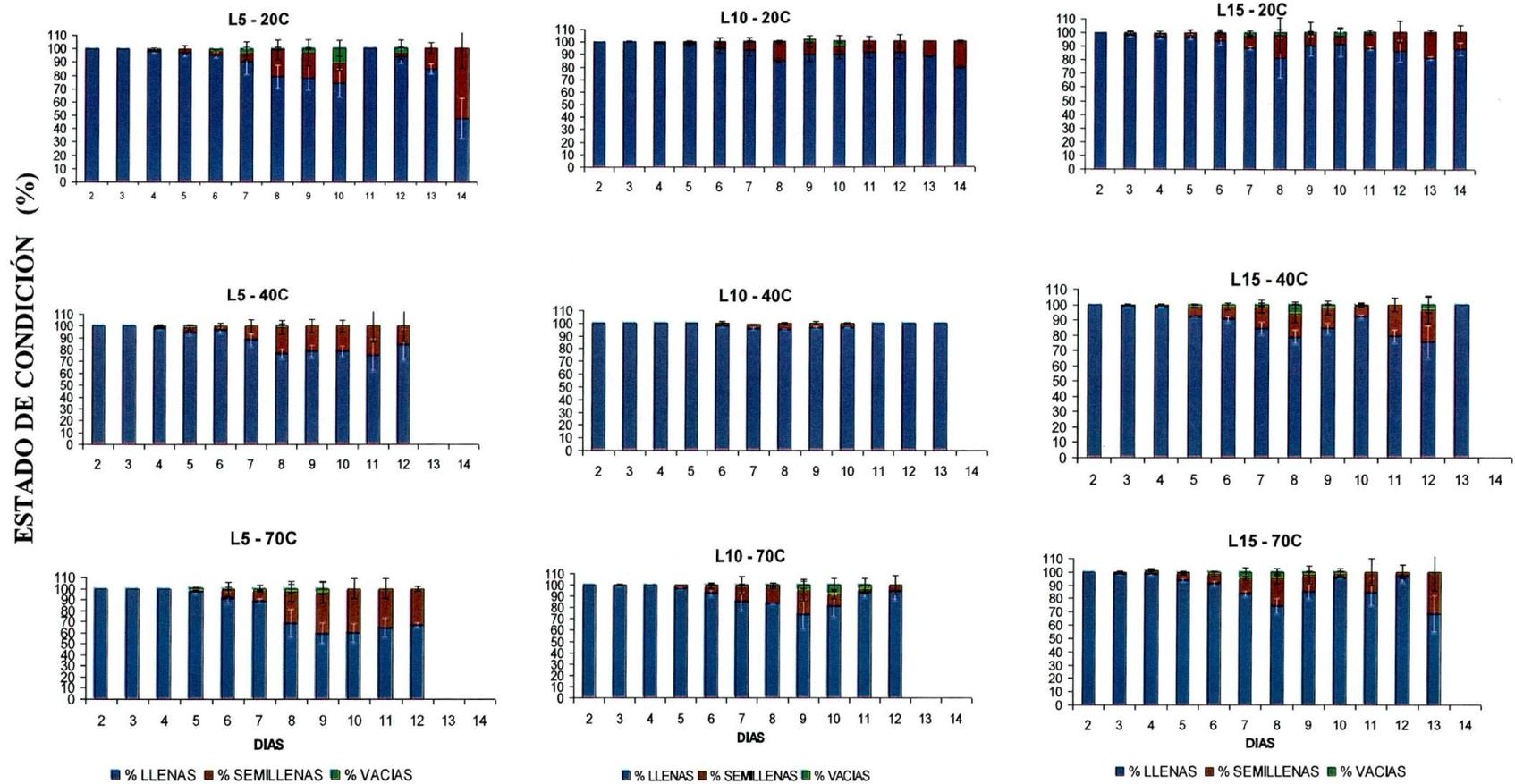


Figura 34. Porcentaje del estado de condición diario de larvas de *A. nucleus* sometida a diferentes densidades larvales y concentración de alimento. (La barra indica el error estándar)

**Tabla 13.** Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje del estado de condición de larvas llenas de *A. nucleus* vs densidad larval y concentración de alimento

Combinación densidad-concentración de alimento	Conteo	Media	Grupos homogéneos
L5-70C	22	83.0909	X
L5-40C	22	94.3864	X
L15-70C	24	98.3333	X
L15-40C	24	98.9792	X
L15-20C	26	104.096	X
L5-20C	26	106.923	X
L10-20C	26	109.654	X
L10-70C	22	111.023	X
L10-40C	24	167.333	X

**Tabla 14.** Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje de estado de condición de larvas semillenas de *A. nucleus* vs densidad larval y concentración de alimento

Combinación densidad-concentración de alimento	Conteo	Media	Grupos homogéneos
L10-40C	24	53.4167	X
L10-70C	22	102.886	X
L5-20C	26	105.115	X
L10-20C	26	110.212	X
L15-20C	26	115.135	X
L15-70C	24	116.625	X
L15-40C	24	117.104	X
L5-40C	22	126.477	X
L5 -70C	22	132.114	X

**Tabla 15.** Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje del estado de condición de larvas vacías de *A. nucleus* vs densidad larval y concentración de alimento

Combinación densidad-concentración de alimento	Conteo	Media	Grupos homogéneos
L10-40C	24	67.0	X
L5- 40C	22	85.9773	XX
L10-20C	26	97.2692	XX
L5-70C	22	100.932	XXX
L15-20C	26	116.865	XXX
L5-20C	26	119.0	XXX
L10-70C	22	121.273	XXX
L15-70C	24	129.917	XX
L15-40C	24	136.188	X



### 5.3.4. Deformidad larval durante el cultivo

La presencia de larvas deformes no se prolongó más allá del noveno día de cultivo siendo más notoria al inicio, presentando en ese día los porcentajes más altos en L10-40C, L10-70C y L5-20C con un 12.3, 8.9 y 8.4%, mientras que los menores porcentajes se obtuvieron en L10-20C (4.5%), L15-70C (5.3 %) y L5-40C (6.1%) (Figura 35). Cabe resaltar que L10-40C con 12.3% obtuvo el mayor porcentaje de larvas deformes al inicio del cultivo y fué también junto con L5-70C los que registraron por menos tiempo la presencia de larvas deformes, solo hasta el cuarto día de cultivo. El ANOVA mostró que no existen influencias de parte de la densidad larval ni de la concentración de alimento sobre la permanencia de larvas deformes durante el cultivo con  $P=0.7960$  y  $0.9655$  y un  $F=0.23$  y  $0.04$  respectivamente. De igual manera no se observó interacción entre estos dos factores  $P=0.8143$  y  $F=0.81$ .

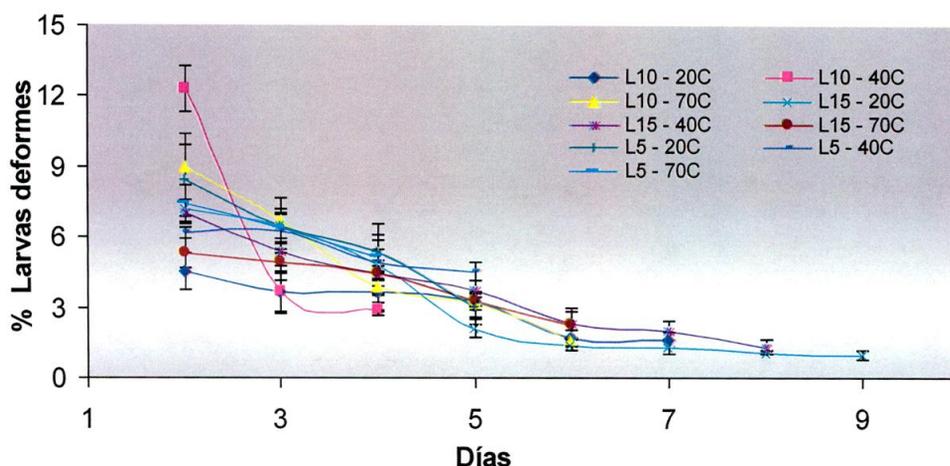


Figura 35. Deformidad larval de *A. nucleus* sometidas a diferentes densidades larvales y concentraciones de alimento. (La barra indica el error estándar)

### 5.3.5. Eficacia del tratamiento

Para determinar la efectividad de las diferentes densidades larvales y las concentraciones de alimento utilizadas, primero se creó una tabla, agrupando los mejores resultados basados en los grupos homogéneos obtenidos en supervivencia, crecimiento y larvas deformes (Tabla 16). Posteriormente, se procedió a identificar en cuales de las nueve combinaciones evaluadas había la presencia de por lo menos una de las densidades larvales y/o una de las concentraciones de alimento registradas en la Tabla 16 tanto para supervivencia, como para el crecimiento y las larvas deformes, observando en cada combinación la frecuencia de aparición en los mejores grupos homogéneos y el porcentaje que había alcanzado; considerando como la mejor combinación aquella que presentará la mayor frecuencia y el porcentaje más altos en cada variable medida. En el caso del estado de condición diario por existir interacción entre la densidad larval y la concentración de alimento la selección se realizó

directamente sobre las combinaciones, teniendo en cuenta los grupos homogéneos que presentaron mayores porcentajes de larvas llenas y menores de larvas semillenas y vacías; bajo este criterio el tratamiento L10-40C estuvo siempre presente en la mayoría de los mejores grupos homogéneos, registrando los principales valores (Tabla 17).

**Tabla 16.** Eficacia de la densidad larval y la concentración de alimento utilizados

Variables	Supervivencia	Crecimiento	Larvas deformes
Densidad larval	Indiferente	10 - 15	Indiferente
Concentración de alimento	Indiferente	Indiferente	Indiferente

**Tabla 17.** Eficacia de las combinaciones de densidad larval y concentración de alimento. El \* indica los mejores valores

Combinaciones	Supervivencia %	Crecimiento	Larvas deformes %	larvas llenas %	larvas semillenas %	Larvas vacías %	Frecuencia en grupos homogéneo
L5-20C	-----	-----	-----	-----	10.4	-----	1
L5-40C	-----	-----	-----	-----	-----	0.2	1
L5-70C	-----	-----	-----	73.5	9.9	1.2	3
L10-20C	-----	116.4	-----	-----	-----	0.6	2
L10-40C	-----	121.2	-----	90.98*	1.3*	0.0*	4
L10-70C	-----	117.5	-----	-----	6.2	-----	2
L15-20C	-----	123.9*	-----	-----	-----	-----	1
L15-40C	-----	121.4	-----	-----	-----	-----	1
L15-70C	-----	119.6	-----	-----	-----	-----	1

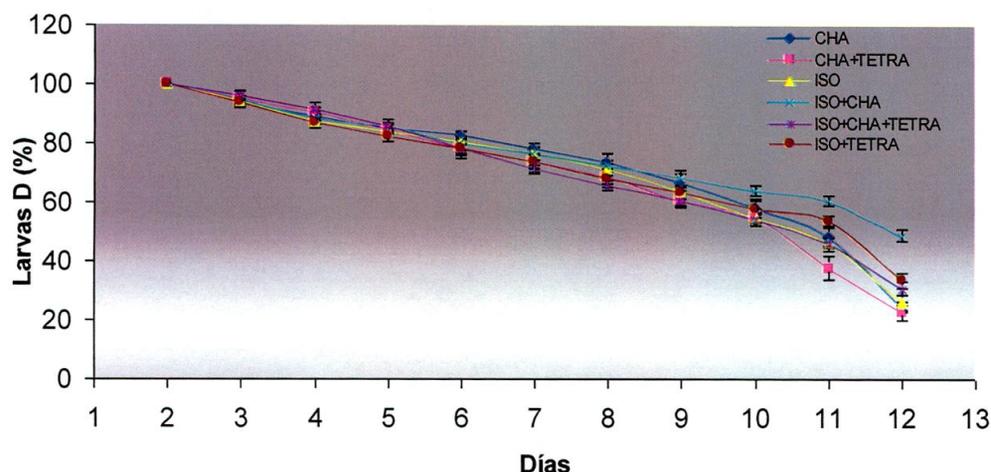
#### 5.4. Evaluación de seis dietas para la alimentación larval

##### 5.4.1. Supervivencia larval

La supervivencia presentó un comportamiento muy similar para todas las dietas hasta el día 9 de cultivo; sin embargo, a partir de este día se observó que el tratamiento ISO+CHA mostró una mayor supervivencia en comparación con las otras dietas, diferencia que se hizo más evidente a medida que pasaron los días. Para el final del cultivo esta dieta registró una supervivencia del 48.9%, en comparación con ISO+TETRA, ISO+CHA+TETRA, ISO, CHA y CHA+TETRA que presentaron una supervivencia del 33.5, 30.9, 26.0, 24.5 y 22.6 % respectivamente (Figura 36).

Con relación a la disminución de la supervivencia en las diferentes dietas, se observó que los tratamientos que presentaron el mayor ritmo promedio de descenso diario fueron CHA+TETRA (7.7%), CHA (7.5%) e ISO (7.4%). Por el contrario los de menor descenso fueron ISO+CHA (5.1%), ISO+TETRA (6.6%) e ISO+CHA+TETRA (6.9%). El ANOVA de la supervivencia final mostró que existe un efecto de la dieta utilizada sobre a la supervivencia alcanzada por las larvas con un  $P=0.0049$  y  $F=6.11$ . La prueba de múltiples comparaciones reveló la formación de dos grupos homogéneos, siendo el

conformado por las dietas ISO+CHA, ISO+TETRA e ISO+CHA+TETRA los que presentaron los mayores valores promedios (Tabla 18), caracterizándose por utilizar en todas sus combinaciones la microalga *I. galbana*.



**Figura 36.** Supervivencia larvas D de *A. nucleus* sometidas a diferentes dietas microalgales. (La barra indica el error estándar)

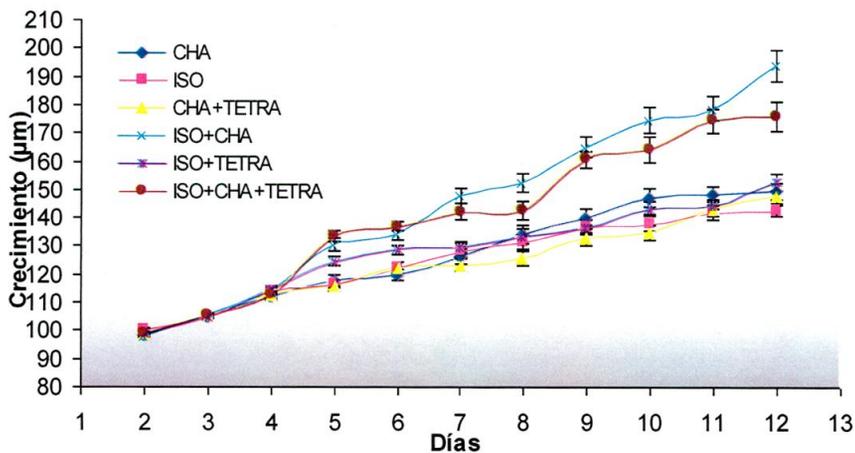
**Tabla 18.** Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje de supervivencia larval de *A. nucleus* vs dieta microalgal

Dieta	Conteo	LS medias	Grupos homogéneos
CHA+TETRA	3	22.6667	X
CHA	3	24.6667	X
ISO	3	26.3333	X
ISO+CHA+TETRA	3	31.0	XX
ISO+TETRA	3	33.3333	XX
ISO+CHA	3	48.3333	X

#### 5.4.2. Crecimiento larval

A partir del cuarto día de cultivo se empiezan a presentar marcadas discrepancias en el crecimiento de los tratamientos siendo mayor en las larvas alimentadas con ISO+CHA e ISO+CHA+TETRA alcanzando un crecimiento promedio a lo largo del cultivo equivalente a 9.6 y 7.7  $\mu\text{m}/\text{día}$ , con una talla final para el día 12 de cultivo de 194.3 y 176.2  $\mu\text{m}$ . El crecimiento menor fué presentado por ISO (4.2  $\mu\text{m}/\text{día}$ ) y CHA+TETRA (4.9  $\mu\text{m}/\text{día}$ ), alcanzando para el final del cultivo 142.8 y 147.7  $\mu\text{m}$  respectivamente (Figura 37). El ANOVA mostró que existe una diferencia altamente significativa que permite afirmar que la dieta utilizada influye directamente en el crecimiento alcanzado por las larvas con un  $P=0.0$  y  $F=32.6$ . Posteriormente, la prueba de múltiples comparaciones, determinó la formación de tres grupos homogéneos, siendo el grupo

conformado por las dietas ISO+CHA el que registro el mayor promedio, seguido del tratamiento ISO+CHA+TETRA (Tabla 19).



**Figura 37.** Crecimiento larval de *A. nucleus* sometidas a diferentes dietas microalgales. (La barra indica el error estándar)

**Tabla 19.** Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje del crecimiento larval de *A. nucleus* vs dieta microalgal

Dieta	Conteo	LS media	Grupos homogéneos
ISSO	3	142,8	X
CHA+TETRA	3	148,8	X
CHA	3	149,6	X
ISO+TETRA	3	153,0	X
ISO+CHA+TETRA	3	176,2	X
ISO+CHA	3	196,3	X

### 5.4.3. Estado de condición diaria larval

Durante los 12 días de cultivo, el estado de condición que predominó en todas las dietas fue el de larvas llenas; al promediar los porcentajes diarios en cada uno de los experimentos, se observó que los mayores valores se obtuvieron en los tratamientos ISO+CHA (89.3%) e ISO+CHA+TETRA (89.1%), por el contrario los más bajos se registraron en CHA+TETRA (82.6%) y CHA (82.8%); mientras que en las larvas semillenas los mayores porcentajes fueron en CHA (13.4%) y CHA+TETRA (13.1%). Con relación al estado de condición de larvas vacías los mayores valores fueron en CHA+TETRA (4.2%) y CHA (3.7%) y los menores en ISO+CHA+TETRA (2.5%) e ISO (2.6%), (Figura 38).

El ANOVA encontró que las larvas llenas y semillenas presentaron diferencias estadísticamente significativas, lo que permite afirmar que estos dos estados de condición se encuentran influenciados por el tipo de dieta suministrada con  $P=0.0212$ ;  $F=2.72$  y  $P=0.0079$ ;  $F=3.24$  respectivamente; de igual manera este análisis permitió



determinar que no existe una influencia de la dieta utilizada sobre los porcentajes de larvas vacías con un  $P=0.5411$  y  $F=0.81$ . Los análisis de múltiples comparaciones del estado de condición de larvas llenas mostró la formación de dos grupos homogéneos, presentando los mayores valores el grupo ISO+CHA, ISO+CHA+TETRA, ISO e ISO+TETRA, de igual manera en el estado de condición de larvas semillenas se presentaron dos grupos siendo menor los valores en ISO+CHA, ISO, ISO+TETRA e ISO+CHA+TETRA (Tabla 20 y Tabla 21).

**Tabla 20.** Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje de larvas de llenas de *A. nucleus* vs dieta microalgal

Dieta	Conteo	LS medias	Grupos homogéneos
CHA+TETRA	33	82.6788	X
CHA	33	82.8545	X
ISO+TETRA	33	86.5091	XX
ISO	33	86.5758	XX
ISO+CHA+TETRA	33	89.1212	X
ISO+CHA	33	89.3394	X

**Tabla 21.** Prueba de múltiples comparaciones del porcentaje de larvas semillenas de *A. nucleus* vs dieta microalgal

Dieta	Conteo	LS medias	Grupos homogéneos
ISO+CHA	33	7.64545	X
ISO+CHA+TETRA	33	8.49394	XX
ISO+TETRA	33	10.3273	XX
ISO	33	10.8152	XX
CHA+TETRA	33	13.1364	X
CHA	33	13.4354	X

#### 5.4.4. Presencia de mancha ocular

La presencia de larvas con mancha ocular fue observada a partir del noveno día de cultivo con las dietas ISO+CHA e ISO+CHA+TETRA, obteniendo al final del experimento 60.4 y 42.7% respectivamente. Las dietas que registraron la presencia de larvas con mancha ocular en el último día de cultivo fueron ISO+TETRA (1.3%) y CHA+TETRA (1.7%). En las demás no se registró la presencia de larvas con mancha (Figura 39). El análisis estadístico de los datos para el final del cultivo demostró que existe una influencia significativa entre las dietas microalgales y los porcentajes de larvas con mancha ocular obtenidos con un  $P=0.0$  y un  $F=329.12$ . Posteriormente, el análisis de múltiples comparaciones realizado con los tratamientos que presentaron mancha ocular, registró la presencia de dos grupos homogéneos, siendo mayor los valores en el constituidos por las dietas ISO+CHA e ISO+CHA+TETRA (tabla 22).

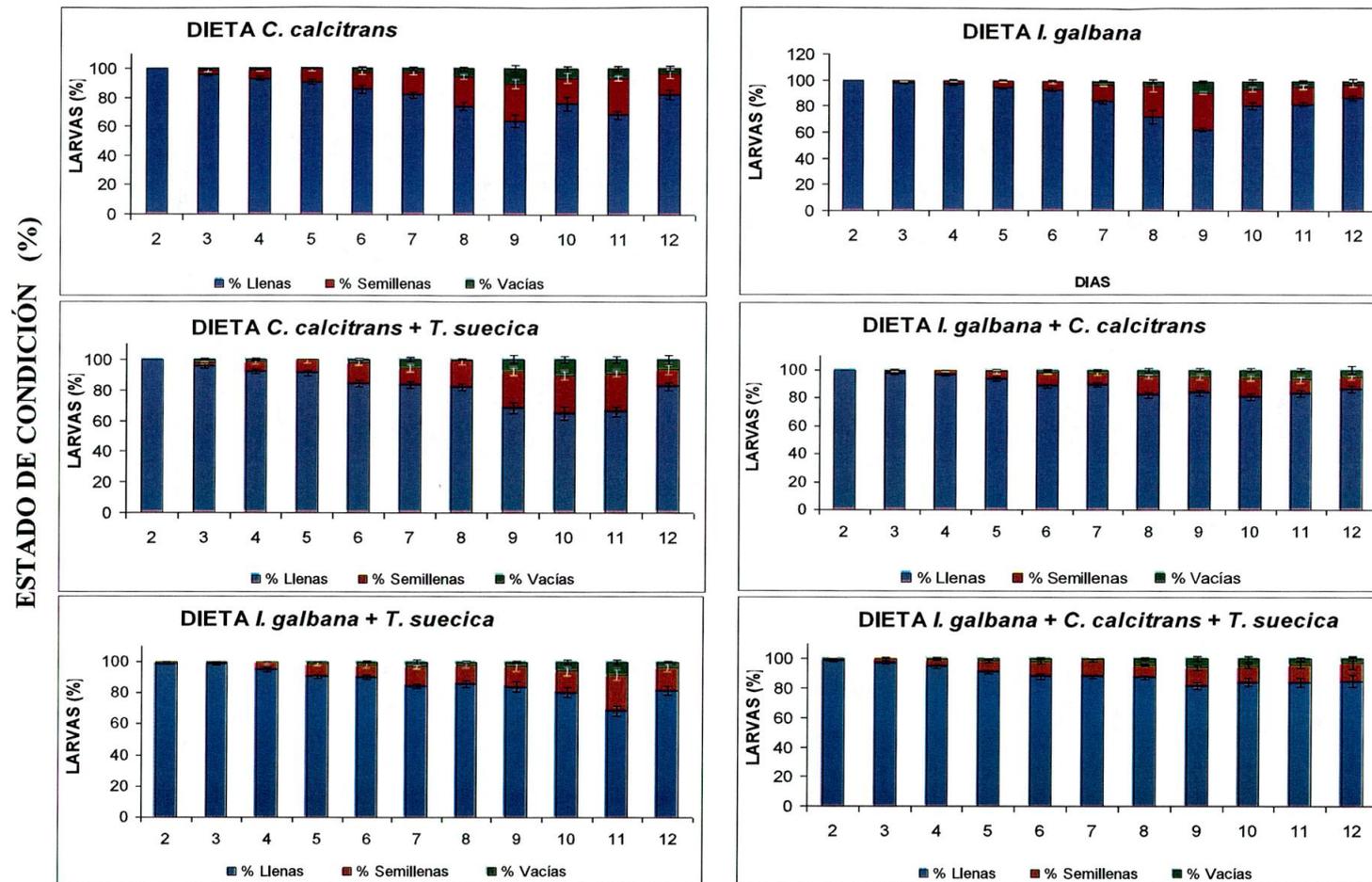
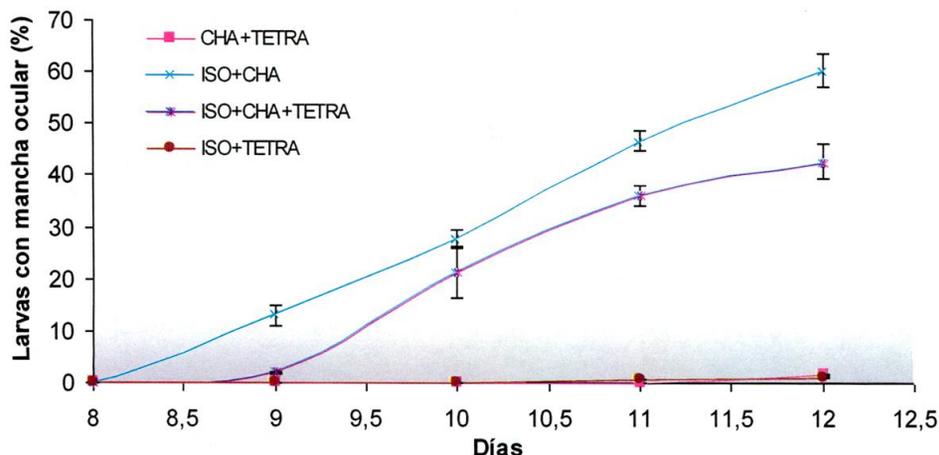


Figura 38. Estado de condición diario de las larvas de *A. nucleus* sometidas a diferentes dietas microalgales. (La barra indica el error estándar)



**Figura 39.** Porcentaje de mancha ocular en larvas de *A. nucleus* sometidas a diferentes dietas microalgales (La barra indica el error estándar)

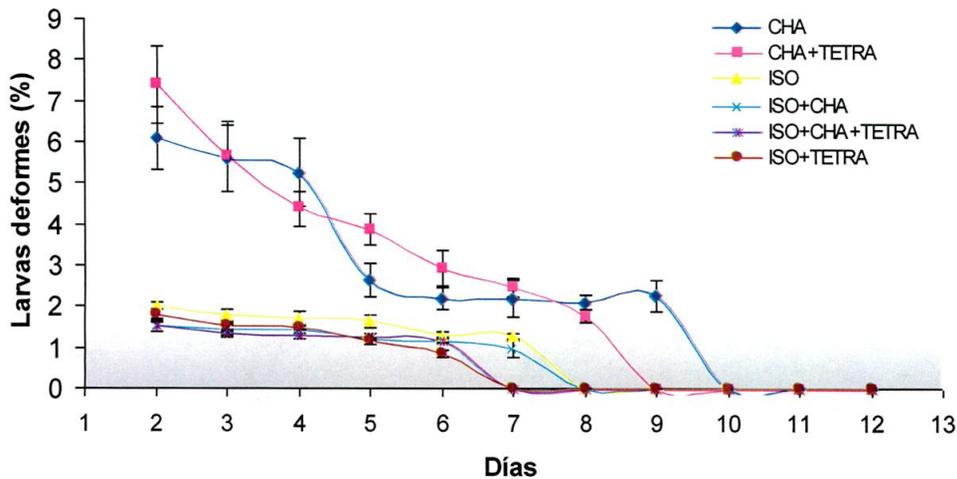
**Tabla 22.** Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje de larvas de *A. nucleus* con mancha ocular vs dieta microalgal

Dieta	Conteo	LS media	Grupos homogéneos
ISSO+TETRA	3	0.135155	X
CHA+TETRA	3	0.56102	X
ISO+CHA+TETRA	3	3.75414	X
ISO+CHA	3	4.09485	X

#### 5.4.5. Deformidad durante el cultivo

La mayor deformidad larval se presentó al inicio del experimento principalmente en las dietas CHA y CHA+TETRA con un 7.4 y 6.1%, de igual manera estas mismas dietas presentaron el mayor ritmo de descenso en la presencia de estas larvas, con un 0.6 y 0.9 %/día respectivamente. En contraste las demás dietas no presentaron más de un 2% de larvas deformes, con un ritmo de descenso en su supervivencia que osciló entre el 0.1 y 0.2%/día. En ninguna de las dietas evaluadas las larvas deformes sobrevivieron en cultivo más allá del noveno día (Figura 40).

El ANOVA mostró diferencias significativas entre los tratamientos con un  $P=0.0$  y  $F=39.02$ , por su parte la prueba de múltiples comparaciones reveló que el grupo homogéneo conformado por las dietas CHA y CHA+TETRA presentan los mayores porcentajes de larvas deformes (Tabla 23).



**Figura 40.** Porcentaje de deformidad en larval de *A. nucleus* sometidas a diferentes dietas microalgales (La barra indica el error estándar)

**Tabla 23.** Prueba de múltiples comparaciones para el porcentaje de larvas deformes de *A. nucleus* durante el cultivo vs dieta microalgal

Dieta	Conteo	LS medias	Grupos homogéneos
ISO+CHA+TETRA	21	35.2381	X
ISO+TETRA	21	39.5238	XX
ISO+CHA	21	42.1905	XX
ISO	21	59.2381	X
CHA	21	100.024	X
CHA+TETRA	21	104.786	X

#### 5.4.6. Eficacia del tratamiento

Para determinar la eficacia de la dieta se tuvo en cuenta la frecuencia en la que cada dieta aparecía en los mejores grupos homogéneos de las variables medidas (supervivencia, crecimiento, estado de condición diaria, porcentaje de mancha ocular y deformidad durante el cultivo) y el porcentaje que había alcanzado, considerando como la mejor aquella que presentó mayor frecuencia de aparición y el porcentaje más alto en cada variable. Bajo este criterio la dieta ISO+CHA estuvo siempre presente en los mejores grupos homogéneos y registrando los mejores valores (Tabla 40).

**Tabla 24.** Eficacia de las dietas microalgales. El \* indica los mejores valores

<b>Variables</b>	<b>ISO+CHA</b>	<b>ISO+CHA+TETRA</b>	<b>ISO+TETRA</b>	<b>ISO</b>	<b>CHA+TETRA</b>	<b>CHA</b>
% Supervivencia	76.3*	71.0	71.9	----	----	----
Crecimiento	140.7*	140.9	128.4	----	----	127.0
% Larvas deformes durante el cultivo	1.3*	1.3*	1.4	----	----	----
% Larvas llenas	89.3*	89.1	86.5	86.6	----	----
% Larvas semillenas	7.6*	8.4	10.3	10.8	----	----
% Larvas vacías	----	----	----	----	----	----
% Larvas mancha ocular	13.4*	9.3	----	----	----	----
Aparición en el mejor grupo homogéneo	6	6	5	5	0	0

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Concentración de esperma y tiempo de fertilización

Los resultados obtenidos indican una ausencia de interacción entre las concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización empleados, por lo que no se genera un efecto sinérgico, que aumente o disminuya los porcentajes de ovocitos fertilizados, larvas D obtenidas ni la cantidad de larvas deformes al combinar estas variables. Sin embargo sí existe un efecto más marcado por parte del tiempo de fertilización durante este proceso en comparación al generado por las concentraciones de espermatozoides empleadas.

Diversas investigaciones demuestran la concentración de espermatozoides utilizada no es un factor limitante para logra la fertilización de los ovocitos, desde luego siempre y cuando estas concentraciones sean mayores que la de ovocitos presentes. Con relación a esto, Villavicencio (1997), reportan fertilizaciones en *N. sudnodosus* de hasta el 95% con la utilización de una relación de fertilización de tan solo 2 espermatozoides por ovocito; de igual manera, Monsalvo-Spencer (1998), trabajando con *A. ventricosus* registró fertilizaciones del 90% con un concentración de 7 espermatozoides por ovocito. Sin embargo, otros autores recomiendan la utilización de altas concentraciones de esperma, como es el caso de Narvarte y Pascual (2003), quienes al usar una concentración de 10 espermatozoides por ovocito en *Aequipecten tehuelchus* hallaron un 10% de ovocitos fertilizados, y al aumentar dicha concentración a 30-50 espermatozoides se incrementó a 36 y 32.6% respectivamente. También, Rampersad *et al.* (1994) utilizaron un amplio rango de concentraciones, entre 10.000 y 100.000 por mL<sup>-1</sup> en *Crassostrea gigas*, obteniendo una alta eficiencia en la fertilización con dichas concentraciones, disminuyendo la importancia de este factor en el éxito de la fertilización de esta especie.

La efectividad tanto de bajas como de altas concentraciones de espermatozoides podría atribuirse a la utilización, en todos estos experimentos, de la técnica clásica de fertilización descrita por Loosanoff y Davis (1963), consistente en la obtención por separado y posterior mezcla a una concentración dada de los gametos obtenidos, la cual inevitablemente concentra en un volumen pequeño ambos gametos aumentando las posibilidades de contacto entre ellos. Esto explicaría la similitud del porcentaje de fertilización con la concentración de 100 espermatozoides por ovocito (89.4%) y el presentado por Velasco *et al.* (2007) (89%) utilizando una concentración 50:1 espermatozoides por ovocito, para esta misma especie.

Inversamente a lo esperado, se demostró que el tiempo de fertilización ejerce mayor influencia sobre los porcentajes de ovocitos fertilizados que el número de



espermatozoides utilizado, siendo mayor este porcentaje entre más sea el tiempo de fertilización. Posiblemente esto se produce, porque al aumentar el tiempo de contacto espermatozoide y ovocito se incrementan las posibilidades de que todos los ovocitos se encuentren rodeados por espermatozoides y sean fertilizados; sin embargo, autores como Blacio y Álvarez (2001), Maeda-Martínez (2001), Helm *et al.* (2006) y Velasco (2008) mencionan que un tiempo prolongado de fertilización, sumado a altas concentraciones de espermatozoides pueden aumentar los porcentajes de fertilización pero a la vez favorecer la ocurrencia de poliespermia, lo cual reduce la producción de larvas D y aumenta la proporción de larvas anormales.

Ahora bien, es posible que en el menor tiempo de fertilización (15 minutos), la presencia del primer cuerpo polar, (signo que indica que se llevó a cabo la fertilización) no fuera visible en parte de los ovocitos fertilizados, teniendo en cuenta que según Barros (2004) y Velasco (2008), esto se observa entre los 7 y 20 minutos después de efectuada la unión de los gametos, por lo que en estos tratamientos es posible que se hubieran considerado no fertilizados algunos ovocitos que iniciaron su proceso de fertilización tarde, por no presentar la presencia de cuerpos polares al momento de la revisión.

Otro aspecto de gran importancia por no decir el objetivo de la fertilización es la obtención de larvas veliger o larvas D saludables, aspecto en el cual también ejerció una mayor influencia el tiempo de fertilización en comparación con la concentración de espermatozoides. Los resultados indicaron que no se presentaron diferencias significativas entre las cantidades de larvas D producidas bajo las diferentes concentraciones de espermatozoides, esto podría deberse a que el rango entre las concentraciones de espermatozoides probadas pudo no ser suficientemente grande para que se pudiera expresar alguna diferencia. Otras investigaciones con distintas especies de pectínidos: *Chlamys asperrima* (O'Connor y Heasman, 1995), *A. ventricosus* Monsalvo-Spencer (1998), *N. nodosus* (Acosta, 2004), *A. nucleus* (Barros, 2004) y *A. purpuratus* (Martínez *et al.*, 2007), utilizaron relaciones de fertilización de 7, 10, 30, 50, 60, 120 y hasta 1000 espermatozoides por ovocito, obteniendo producciones de larvas D que oscilan entre 90 y 95%, confirmando la poca influencia de la concentración de espermas sobre la obtención de larvas D.

En cuanto al tiempo de fertilización, la influencia de este sobre los porcentajes de larvas D obtenidas, presentó un comportamiento inverso al mostrado en los ovocitos fertilizados, ya que los mayores valores de larvas D se observaron en los tiempos de fertilización de 15 y 30 min; sin embargo, estos tiempos lograron una menor fertilización que con 45 min. La disminución en los porcentajes de larvas D obtenidas, cuando se incrementó el tiempo de fertilización, se atribuyó posiblemente a problemas de poliespermia, ya que al aumentar el tiempo de contacto entre el ovocito y los espermatozoides se aumenta la posibilidad de que más de uno penetre el ovocito y se produzca una fertilización, pero con un desarrollo embrionario anormal que termina con

la muerte del cigoto o la formación de una larva deforme (Gruffydd y Beaumont, 1970; Stephano y Gould, 1988; Rampersad *et al.*, 1994; Fernández, 1991).

A pesar que no existieron diferencias significativas entre los tiempos de fertilización de 15 y 30 min, la mayor producción de larvas D se obtuvo con la combinación de 100 espermatozoides por ovocito tiempo de 30 min, debido posiblemente a que al disminuir este tiempo se reduce la posibilidad de poliespermia y la manipulación prematura de los ovocitos recién formados, y a la vez, una alta concentración de espermatozoides acelera el proceso de fertilización, lo que permite que los espermatozoides más competentes fertilicen primero el ovocito.

Uno de los aspectos que se pretende eliminar o por lo menos reducir durante el proceso de la fertilización es la formación de larvas deformes, en este sentido esta investigación determinó que tanto la concentración de espermatozoides como el tiempo de fertilización tienen influencia significativa sobre el número de larvas deformes obtenidas; además, las mayores cantidades de estas larvas se presentaron en la menor concentración de espermatozoides (10 espermatozoides por ovocito) y tiempo de fertilización (15 min). Este comportamiento posiblemente obedezca a que en bajas concentraciones de espermatozoides la velocidad con que todos los ovocitos son fecundados es menor, comparada con densidades más altas, lo que se traduce en un mayor requerimiento de tiempo para lograr una mayor fertilización, situación que entra en contraposición con el de 15 minutos por ser este el menor de los tiempos empleados, condiciones que obligaría a que los procesos de lavado y tamizado que se realizan para retirar el exceso de espermatozoides y limpieza de los cigotos se ejecuten en forma temprana en los ovocitos recién fecundados aun cuando gran parte de ellos recién inician la formación del cuerpo polar o las primeras divisiones causando un posible daño mecánico por desprendimiento o maltrato de un cuerpo polar o un blastómero lo que generaría una larva deforme. Pues tal como se mencionó anteriormente autores como Villavicencio (1997), Monsalvo-Spencer (1998) y Velasco *et al.* (2007) afirman que estas estructuras tan delicadas se forman dentro de los primeros 15 minutos después de efectuada la unión de los gametos.

Otra posible causa de la formación de larvas deformes al utilizarse bajas densidades de espermatozoides, es la ausencia de competencia o selección natural entre los espermatozoides, ya que al haber tan pocos disponibles para fecundar los ovocitos aumentan las posibilidades que espermatozoides poco viables o competentes logren fertilizar un ovocito (Gruffydd y Beaumont, 1970).

Con relación al tratamiento C100T45, el cual presentó la menor cantidad de larvas deformes, pudo deberse a la ocurrencia de un fuerte proceso de poliespermia que produjo la muerte de los cigotos; pues, este tratamiento presentó los máximos porcentajes de ovocitos fertilizados y también los menores porcentajes de larvas D obtenidas y larvas deformes, por lo que podría suponerse que los ovocitos fertilizados

que no llegaron a ser larvas D o larvas deformes, tuvieron que haber muerto durante el desarrollo embrionario (Stephano y Gould, 1988; Fernández, 1991; Rampersad *et al.*, 1994).

Las larvas obtenidas a través de los diferentes procesos de fertilización no se vieron afectadas en su supervivencia por la concentración de espermatozoides utilizada; sin embargo, existe una influencia por parte del tiempo de fertilización, indicando que el tiempo de 45 min favorece la supervivencia de las larvas. No obstante, esta aparente superioridad puede atribuirse a la baja densidad en el cultivo larval registrada en los tratamientos de 45 min, más que a la influencia que puede tener el proceso de fertilización, ya que los tratamientos de 45 min se caracterizaron por presentar las menores cantidades de larvas D y por ende las menores densidades en el cultivo larval. Con relación a lo anterior, autores como Rojas *et al.* (1988), Ortiz (1994), Maeda-Martínez (2001), Helm *et al.* (2006), Velasco (2008) y Velasco y Barros (2008), mencionan que la utilización de menores densidades de cultivo larval reducen la competencia por el alimento y favorece la supervivencia al reducir los productos de excreción, como el amonio.

Asumiendo que la concentración de espermatozoides no influye sobre la supervivencia de las larvas en el cultivo y que la influencia de parte del tiempo en la supervivencia está más relacionada con la densidad larval manejada que por el tiempo de fertilización empleado, se podría decir que la supervivencia de las larvas está regulada por su interacción con las condiciones del cultivo como temperatura, salinidad, pH, alimentación, densidad etc., y no por el modo en el cual se realizó su fertilización.

En cuanto a los porcentajes de supervivencia, estos son similares a los obtenidos por Velasco y Barros (2008), quienes reportan para esta misma especie, supervivencias al final del cultivo entre 2 y 15%. Por su parte, Helm *et al.* (2006) sugieren que la supervivencia de larvas de pectínidos desde la fase D hasta la metamorfosis se encuentra entre el 15 y 30%.

Por otro lado, el crecimiento al igual que el estado de condición de las larvas, no estuvieron afectados por la concentración de espermatozoides utilizada, ni por el tiempo de fertilización empleado, lo que indica que estos factores ejercen influencia solo durante el desarrollo embrionario y la formación de la larva D. El estado de condición de larvas llenas fue el predominante (con más del 70% de las larvas en todos los tratamientos), comportamiento que concuerda con lo reportado por Lora-Vilchis y Maeda-Martínez (1997) en larvas de *A. ventricosus*, quienes afirman que por lo menos el 70% presentaron una alta eficiencia en la ingestión de microalgas, en especial *I. galbana*.

La presencia de larvas con mancha ocular para el último día de cultivo larval varió entre 7.6 y un 20%, sin embargo la ausencia de diferencias significativas entre los porcentajes

de larvas con mancha ocular nos indican que la formación de esta no está regulada o influenciada por la forma en que se realice la fertilización, sino que es un reflejo de las calidades medioambientales del cultivo y la alimentación suministrada, que indica que la larva ha acumulado suficientes reservas energéticas y esta estructural y funcionalmente equipada para convertirse en una larva pediveliger y buscar un sustrato donde fijarse y realizar metamorfosis (Velasco 2008).

## **6.2. Efectos de la fuente de agua utilizada en el cultivo larval**

El hecho que los resultados obtenidos en el agua de mar artificial mostraran la menor supervivencia, crecimiento y estado de condición diaria, seguidos de los resultados presentados por el agua oceánica, sin ser esta última significativamente diferente del agua de mar clorinada y el agua de mar sin tratar que presentó los mayores valores, posiblemente está relacionado con la concentración de algunas sustancias presentes en el agua de mar como materia orgánica (MO) y aminoácidos disueltos (AA), y compuestos inorgánicos como amonio, nitrato y nitritos que son de gran importancia en la calidad del agua (Colt y Armstrong, 1981; Weiling *et al.*, 1995) y que influyen en el desarrollo y el estado de condición de las larvas, incluyendo la tasa de filtración e ingestión, el crecimiento y la supervivencia (Pouvreau *et al.*, 2000; Strugnell y Southgate, 2003; Sicard-González *et al.*, 2006). En este sentido Manahan y Crisp (1982), Manahan (1983) y Helm *et al.* (2006), mencionan que las larvas de los bivalvos tienen la capacidad de tomar cantidades significativas de MO y AA disueltos a través del velum, constituyéndose en una gran fuente de energía, principalmente durante los primeros días de vida cuando el aparato digestivo está en desarrollo.

Bayne (1983) y Helm *et al.* (2006), sugieren que además de la MO y AA, las larvas se pueden alimentar de agregaciones de bacterias, que en conjunto con la MO disuelta, pueden constituir una importante fuente nutritiva para el desarrollo de las larvas, prolongando la supervivencia de estas cuando no hay suficiente alimento en suspensión en la columna de agua.

Teniendo en cuenta que el agua de mar artificial utilizada en este experimento carece de MO y AA disueltos y de las bacterias propias del agua de mar, podría suponerse que la falta de estas sustancias y microorganismos generaría una desventaja nutricional frente a las demás, provocando menor supervivencia y lento crecimiento de las larvas; además, se desconoce el efecto que tiene el agua de mar artificial empleada en este ensayo sobre la microalga utilizada como alimento y sobre las mismas larvas. Sin embargo, otros autores obtuvieron buen crecimiento y supervivencia al cultivar larvas de *Crassostrea gigas* y *Ostrea edulis* en agua de mar artificial (Courtright *et al.*, 1971). También, His *et al.* (1997) lograron resultados muy similares en el desarrollo larval de *C. gigas* y *Mytilus sp* tanto en agua de mar artificial como en agua de mar oceánica; mientras que Helm *et al.* (2006), no consiguieron una supervivencia mayor a 6 días al cultivar larvas de *C. gigas* en estas clases de agua; así mismo, Abasolo-Pacheco *et al.* (2009)



trabajando con larvas de *Nodipecten subnodosus* y *A. ventricosus* en agua de mar artificial, registraron muy bajos crecimientos y supervivencia solo hasta el noveno día de cultivo. Por su parte Gretchen *et al.* (2004), al probar diferentes marcas comerciales para la preparación de agua de mar, afirman que las sales disueltas durante la preparación no alcanzan el equilibrio iónico sino hasta 4 días después de su preparación, siendo nociva para las larvas antes de este tiempo; también, Courtright *et al.* (1971) en *M. edulis*, encontraron que la sal no disuelta, eran tóxicas para las larvas de, causando alteración de las valvas y obstrucción del intestino.

En cuanto al comportamiento de las microalgas en el agua de mar artificial, Trujillo (1992) afirma que el crecimiento y supervivencia de las microalgas varía según la formulación empleada.

Todos estos estudios dejan entrever que la efectividad del agua de mar artificial para el cultivo larval de bivalvos está directamente relacionada con la formulación de esta y la forma de preparación, y en el caso del presente estudio solo se puede afirmar que la fuente de agua de mar artificial utilizada no brinda condiciones adecuadas para el correcto desarrollo de las larvas de *A. nucleus*.

Por su parte, el agua de mar de origen natural también presenta variaciones en las concentraciones de MO y AA disueltos y bacterias, debido a que estas se reducen a medida que se aleja de la costa, gracias al fenómeno de dilución. Garrasi *et al.* (1979) afirman que las concentraciones de AA en altamar pueden oscilar entre  $0.2$  a  $0.5 \times 10^{-6}$  M, mientras que para aguas costeras y estuarinas según North, (1975) y Lee y Bada (1977) varían entre  $14$  y  $17 \times 10^{-6}$  M.

Estas variaciones en el aporte de nutrientes podrían ser las responsables de la menor supervivencia y lento crecimiento presentado al inicio del cultivo en las larvas mantenidas en agua oceánica, debido a que durante los primeros días de vida las larvas asimilan mejor estas sustancias nutritivas (Manahan, 1983); por el contrario, las mantenidas en agua de mar clorinada y sin tratar, por ser aguas tomadas a 20 metros de la costa posiblemente posean una calidad nutricional más alta, presentando por consiguiente una mejor supervivencia y crecimiento a lo largo del cultivo. Este comportamiento coincide con Shumway y Parsons (2006) quienes afirman que es mucho más común la aparición de larvas de pectínidos en aguas costeras que en aguas oceánicas, y por lo expresado por Abasolo-Pacheco *et al.* (2009), que al evaluar diferentes fuentes de agua para el cultivo de larvas de *N. subnodosus*, encontraron que el agua de mar tomada cerca de la costa y filtrada a  $1 \mu\text{m}$  genera una mayor supervivencia y mejor crecimiento de las larvas.

La similitud en la supervivencia, el crecimiento y el estado de condición presentadas entre los tratamientos clorinada y sin tratar, hacen suponer que las concentraciones de hipoclorito de sodio utilizadas en este trabajo para desinfectar el agua de mar, no

reducen por completo la materia orgánica disuelta ni la carga bacteriana presente, lo cual no genera un impacto en la calidad nutricional de esta agua; sin embargo, la utilización de concentraciones muy altas de hipoclorito de sodio pueden formar compuestos oxidantes residuales de larga permanencia en el agua marina como las cloraminas, las cuales son altamente tóxicas para las larvas de los bivalvos (OIE, 2009).

A pesar de que las larvas mantenidas en agua de mar clorinada y sin tratar presentaron un mejor desarrollo en comparación con las mantenidas en agua de mar artificial y oceánica, ninguna de estas registró la aparición de la mancha ocular. Al parecer la ausencia de larvas con mancha ocular está relacionada con el lento crecimiento expresado por estas larvas, las cuales registraron al día 17 de cultivo un crecimiento máximo de 132  $\mu\text{m}$ . Talla inferior a la registrada por Velasco y Barros (2008) para la misma edad en esta misma especie y también inferior a la encontrada en los experimentos de concentración de espermas y tiempo de fertilización, al igual que en el experimento de evaluación de dietas microalgales realizados en este trabajo. Este bajo crecimiento indicaría que la larva aun no ha alcanzado las suficientes reservas energéticas por lo que estructural y funcionalmente no se encuentra provista para desarrollar la mancha ocular y proseguir con su desarrollo (Velasco 2008).

Según autores como Ibarra *et al.* (1995) y Avendaño *et al.* (2001), la ocurrencia de retrasos en el crecimiento de las larvas puede deberse a procesos de autofecundación o de ovocitos que aun no habían completado su proceso de maduración (ovocitos inmaduros), a este respecto Velasco (2008), afirma que otra posible causa del retraso en el crecimiento larval se deba a la presencia de agentes infecciosos como ciliados y copépodos. En este sentido es posible que el lento crecimiento larval y por ende el retraso en la formación de estructuras como la mancha ocular sea debido a la presencia de ciliados los cuales aunque no muy abundantes estuvieron presentes en este ensayo. La posibilidad de ocurrencia de autofecundación e inmadurez de los ovocitos fue descartada por haberse realizado un proceso de fertilización controlado y por haber realizado la aclimatación y acondicionamiento de los reproductores antes de ser inducidos al desove. Sin embargo, no es posible descartar la influencia genéticas como la heterocigocidad que pueden afectar las velocidades y de desarrollo de las larvas entre las cohortes (Helm *et al.*, 2006).

### **6.3. Densidad inicial y concentración de alimento**

Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con Ibarra *et al.* (1997), quienes probaron densidades de 5, 10 y 20 larvas  $\text{mL}^{-1}$  en *A. ventricosus* sin registrar variaciones significativas en la supervivencia de las larvas, observando un mejor crecimiento en las mayores densidades; sin embargo, estos resultados logrados contradice lo mencionado por autores como Rojas *et al.* (1988), Ortíz (1994) y Velasco y Barros (2008) quienes trabajaron densidades de 1, 5, 10, 15, 20 y 30 larvas  $\text{mL}^{-1}$  en *Pecten ziczac*; *N. subnodosus* y en *A. nucleus* respectivamente, observando una menor

supervivencia y crecimiento al aumentar la densidad. Según estos autores, esto se debe posiblemente a choques entre las larvas, lo cual produce una alimentación discontinua, sumado al incremento en la concentración de productos de excreción como el amonio y la competencia por alimento.

Así mismo, los resultados de crecimiento obtenidos con las distintas concentraciones de alimento difieren con otros autores que reportan un menor crecimiento al someter las larvas de *A. irradians concentricus* y *A. nucleus* a altas concentraciones de alimento (Lu y Blake, 1996; Velasco y Barros, 2008). También, Bayne (1983), Maeda-Martínez (2001) y Helm *et al.* (2006) sostienen que altas concentraciones de alimento tienen un efecto negativo en el crecimiento de las larvas, porque es un factor estresante que obliga a las larvas a destinar energía para la producción de pseudoheces. Igualmente, en ciertas especies el exceso de alimento genera un cierre de valvas, ocasionando un cese de la alimentación y por ende un pobre crecimiento.

La ausencia de diferencias significativas en la supervivencia registrada entre las densidades evaluadas, podrían atribuirse a los estrechos rangos entre las densidades probadas. Autores como Ibarra *et al.* (1997) y Liu *et al.* (2006), trabajando con 5, 10, 20 y 40 larvas mL<sup>-1</sup> en *A. ventricosus* y *M. meretrix*, tampoco hallaron diferencias en esta variable, mencionan que siempre y cuando se tengan buenas condiciones de alimentación, calidad de agua y oxígeno, es posible mantener un cultivo a altas densidades. No obstante, Uriarte *et al.* (2001), afirman que cuando se exceden ciertos valores de densidad según la especie, independientemente de la cantidad de alimento que se suministre y de la buena calidad de agua que se brinde, se presentan problemas en la supervivencia y el crecimiento; de igual forma, este autor afirma que durante los primeros días de desarrollo las larvas pueden soportar altas densidades gracias a su menor tamaño y a las reservas de vitelo que aun conservan (solo durante las primeras 24 horas), reduciendo de esta manera sus necesidades de espacio y alimento durante esta etapa. Según lo mencionado se podría suponer que la ausencia de diferencias significativas en la supervivencia de las larvas bajo las distintas densidades también podría ser atribuible a esta capacidad que tienen las larvas de soportar altas densidades durante los primeros días de vida, después de estos días la densidad inicial de siembra se reajustó de manera natural en la medida en que se reducía el número de larvas, manteniendo equilibrado el crecimiento y la supervivencia. Según Uriarte *et al.* (2001), es deseable mantener constante la biomasa cultivada por unidad de volumen, por ello es necesario disminuir las densidades conforme avanza el crecimiento.

En cuanto a la escasa influencia de la concentración de alimento sobre la supervivencia de las larvas, Ortíz (1994), en larvas de *N. subnodosus* al probar concentraciones desde 1.250 hasta 10.000 cél/larva, no encontró diferencias significativas en la supervivencia, pero si una tendencia de mayor crecimiento de las larvas a concentraciones más altas, contrario a lo observado en este trabajo. El comportamiento del crecimiento bajo las distintas concentraciones de alimento estuvo influenciado posiblemente por el reajuste

natural sufrido por la densidad a medida que se reducía el número de larvas, convirtiendo a la concentración de alimento en el único factor constante en cada tratamiento, lo cual generaba a medida que se reducía el número de larvas en cada tanque un incremento gradual en la relación número de células microalgales por larva presentes. Esta situación afectó significativamente el crecimiento de las larvas, principalmente aquellas expuestas a las menores densidades (5 larvas mL<sup>-1</sup>) y las mayores concentraciones de alimento (70.000 cél mL<sup>-1</sup>). Autores como Bayne (1983), Bricelj y Shumway (1991) y Maeda-Martínez (2001), mencionan que el incremento en la concentración de células microalgales aumenta la tasa de rechazo de partículas o producción de pseudoheces que posiblemente intervienen en el proceso de alimentación, reduciendo la tasa de ingestión y en consecuencia el crecimiento. Esto explicaría, el porqué la densidad de 5 larvas mL<sup>-1</sup> registró el menor crecimiento y por ende entre mayor era la concentración de alimento utilizada en esta densidad, menor era su ritmo de crecimiento.

Los tratamientos expuestos a densidades de 10 y 15 larvas mL<sup>-1</sup> y alimentados a concentraciones de 20.000 y 40.000 cél mL<sup>-1</sup>, presentaron las mayores tasas de crecimiento debido posiblemente al incremento gradual en la relación número de células microalgales por larva, que estuvo más coherente al aumento en la tasa de filtración que experimentan las larvas normalmente a medida que crecen (Bayne 1983; Mac Donald, 1988; Maeda-Martínez, 2001). Esto se debe a que al aumentar la tasa de ingestión se reduce la producción de pseudoheces y los efectos tóxicos y microbiológicos de las microalgas residuales en descomposición, favoreciendo las condiciones de cultivo y mejorando el crecimiento (Rojas *et al.*, 1988). Con relación a lo anterior, Helm *et al.* (2006) afirman que es posible duplicar e incluso triplicar la densidad normal de las larvas si se administra una alimentación de acuerdo al número de larvas en un tanque y su tamaño, en lugar de alimentarlo según el volumen por unidad.

La notable superioridad en el estado de condición que reflejan las densidades de 15 y 10 larvas mL<sup>-1</sup> frente a la densidad de 5 larvas mL<sup>-1</sup>, podría estar influenciada, al igual que en la supervivencia y el crecimiento, por la densidad inicial de siembra de cada tratamiento la cual no fue manipulada ni reajustada de manera controlada, salvo el día que inicio el experimento y su comportamiento frente a las diferentes concentraciones de alimento probadas, ya que como se mencionó anteriormente, los problemas de sobrealimentación que experimentó la menor densidad (5 larvas mL<sup>-1</sup>) generan una influencia negativa sobre la tasa de ingestión, lo explicaría por qué en estos tratamientos y en aquellos que utilizaron la mayor concentración de alimento (70000 células mL<sup>-1</sup>) se presentaron los mayores porcentajes de larvas con glándula digestiva semillena y vacía, mientras que en las mayores densidades en donde se presentó un mejor equilibrio entre el número de larvas y la concentración de alimento, se registró el mayor porcentaje de larvas con glándula digestiva llena.



Ahora bien, el hecho que entre las densidades de 10 y 15 larvas mL<sup>-1</sup>, la primera presentará el mayor porcentaje de larvas con glándula digestiva llena, principalmente la mantenida a 40.000 cél mL<sup>-1</sup>, es un indicador que esta densidad es la que ofrece una mejor relación de espacio y disponibilidad de alimento, permitiendo maximizar la ingestión de células microalgales por parte de las larvas, sin llegar a saturarlas. Bayne, (1983) y Lu y Blake (1996) mencionan que el mejoramiento en la eficiencia de la ingestión se ve reflejada en mejor crecimiento y mayor supervivencia de las larvas, condiciones que cumple el tratamiento L10-40C, que a pesar de presentar un crecimiento menor (no significativo) que el L15-20C, refleja, en compensación, una mayor estabilidad en la supervivencia.

La presencia de larvas deformes en este ensayo no guarda ninguna relación aparente con las densidades larvales usadas ni con las concentraciones de alimento suministradas. Tal como se ha mencionado en este trabajo, la presencia de larvas deformes está más relacionada con la calidad de los ovocitos utilizados y posibles problemas durante el proceso de la fertilización tales como poliespermia y autofecundación, muy comunes en bivalvos hermafroditas (Stephano y Gould, 1988; Rampersad *et al.*, 1994; Fernández, 1991; Salaun *et al.*, 1991). La permanencia de este tipo de larvas en el cultivo, dependerá del grado de deformidad de cada una y de su capacidad para alimentarse y desarrollar sus otras funciones vitales.

La ausencia de larvas con mancha ocular en este experimento al igual que en el experimento de evaluación de fuentes de agua parece estar relacionada con el bajo crecimiento expresado por las larvas, retrasando o imposibilitando la formación de nuevas estructuras como lo es la mancha ocular. Por lo general la aparición de la mancha ocular en la mayoría de los pectínidos comerciales se da entre las 160 y las 260  $\mu\text{m}$  (Maeda-Martínez, 2001) y para esta especie según Velasco y Barros (2008) se forma entre los 135 y 200  $\mu\text{m}$ , rango inferior al máximo alcanzado en este ensayo, que fue de 126  $\mu\text{m}$  al día 14 de cultivo. Este bajo crecimiento puede ser debido múltiples factores como: deficiencias en los requerimientos nutricionales, problemas bacterianos, de calidad de agua o genéticos que pueden afectar las velocidades y de desarrollo de las larvas al no poder acumular suficientes reservas energéticas. (Ibarra *et al.*, 1995; Avendaño *et al.*, 2001; Helm *et al.*, 2006; Velasco, 2008)

#### **6.4. Evaluación de seis dietas para la alimentación larval**

Los resultados obtenidos indican que tanto la supervivencia como el crecimiento larval en *A. nucleus* alcanzaron el mayor valor al ser alimentados con la dieta ISO+CHA, del mismo modo se evidenció que las mezclas que incluían la microalga *I. galbana* también presentaron altos valores de crecimiento y supervivencia, en contra posición las dietas monoalgales que fueron las que presentaron los menores rendimientos.

Las ventajas de las dietas mixtas sobre las monoalgales han sido reportadas desde hace más de 20 años por autores como Bayne (1983) y Valdivieso *et al.* (1988) entre otros, de igual manera la combinación de una microalga flagelada como *Isochrysis* y la diatomea *Chaetoceros* ha sido descrita en muchos trabajos, como una dieta de alto valor nutricional por su buen balance entre nivel de proteínas y lípidos que eleva el crecimiento y la supervivencia larval en muchas especies de bivalvos, como ejemplo de estas combinaciones están las investigaciones de Valdivieso *et al.* (1988) y Martínez (1991), en larvas de *A. purpuratus*, Avilés-Quevedo (1990) y Lora-Vilchis y Martínez (1997), Millán-Tovar (1997) en *A. ventricosus*, Ortíz (1994) y Villavicencio (1997) en *N. subnodosus*, Urban (1999) en *Pinctada imbricata*, Helm *et al.* (2006) en *C. gigas*, *C. rhizophorae* y *Tapes philippinarum*, en todas estos trabajo se reporta una mejoría sustancial en el crecimiento y supervivencia al aplicarse esta clase de combinación porque se incrementan los depósitos diarios de proteína y la utilización aparente de la misma.

Este resultado indicaría que las dietas que incluían a la microalga *I. galbana* en especial la combinada con la microalga *C. calcitrans*, suplirían de mejor manera los requerimientos nutricionales de las larvas de *A. nucleus* en comparación con las demás dietas evaluadas, estos resultados concuerdan con los encontrados por Velasco y Barros (2008), quienes al evaluar el crecimiento y la supervivencia de las larvas de *A. nucleus* bajo diferentes mezclas de microalgas y microalgas con emulsiones lipídicas, encontraron que la dieta *I. galbana* + *C. calcitrans* registró la mayor talla con 143  $\mu\text{m}$  al día 13 y un crecimiento promedio de 3.3  $\mu\text{m}/\text{día}$ , de igual manera esta misma dieta mostró la mayor supervivencia acumulada con un 4%; estos autores atribuyen este resultados a la buena relación entre ácidos grasos esenciales que provee la mezcla de estas microalgas, no obstante estos valores son inferiores a los encontrados en este trabajo con la misma dieta (194  $\mu\text{m}$  al día 12, un crecimiento de 9.6  $\mu\text{m}/\text{día}$  y una supervivencia del 49%). Estas diferencias podrían obedecer a factores como la calidad nutricional de las microalgas utilizadas, pues según autores como Maeda-Martínez, (2001) y Saucedo *et al.* (2009), la calidad nutritiva de las microalgas es altamente variable según las condiciones ambientales, aunque estas se mantengan estrictamente controladas, además otros problemas que contribuye a variar su calidad nutritiva es la contaminación bacteriana, pues aunque se tomen las máximas precauciones se mantiene vulnerable a tales efectos y por tanto su calidad nutritiva se ve afectada, razón por la cual existan diferentes respuestas de crecimiento de las larvas de una misma especie ante una misma dieta al ser evaluada en diferentes momentos o áreas geográficas.

En todos los tratamientos, la tendencia de las larvas en la mayoría del tiempo fue la de mantenerse en el estado de condición llena, indicando que realizaron la ingestión de la dieta, independientemente de las microalgas que la conformarán. Sin embargo, los resultados muestran también que los tratamientos en los que se utilizó la microalga *I. galbana* presentaron un significativo aumento en el porcentaje de larvas llenas, a la vez que se redujeron los porcentajes de semillenas y vacías, posiblemente debido a las



características biológicas de esta microalga por ser de cuerpo desnudo, móvil, de tamaño pequeño, forma ovoide, que la hacen más asequible y digerible, apropiada para la alimentación de los pectínidos en su fases larvaria (Velasco, 2008).

Por otro lado el hecho que la dieta ISO+CHA haya presentado los mayores valores de larvas llenas puede estar asociado al alto valor nutritivo de esta dieta ya mencionado anteriormente. Según Wildish *et al.* (1987) y Bricelj y Shumway (1991), la tasa a la cual las partículas alimenticias son ingeridas por las larvas está en función de algunas variables entre las que se destaca: la temperatura, la concentración de alimento, el flujo del agua y el valor nutritivo de las partículas de alimento, siendo esta ultima variable la única que no se mantuvo constante, por lo tanto pudo influir en la ingestión de alimento por parte de las larvas en este experimento.

Es de notar el hecho que en todos los tratamientos se hubiese presentado una reducción en los porcentajes de larvas llenas entre los días 8 y 11, hecho que posiblemente se debe al desarrollo del umbo y posteriormente la secreción de la prodisoconcha II (Velasco, 2008); todo esto podría causar cierto grado de estrés en el proceso de alimentación e implica un mayor gasto de energía debido a la segregación de una concha más gruesa, lo que genera en consecuencia, un peso adicional y por lo tanto, un esfuerzo mayor para mantenerse nadando en la columna de agua (Cragg y Crisp, 1991). Teniendo en cuenta que dicha disminución en el porcentaje de larvas llenas se produjo levemente con las dietas ISO+CHA e ISO+CHA+TETRA, se podría suponer, que debido a la cantidad de nutrientes y la equilibrada relación entre ellos, estas dietas ayudarían más eficazmente a soportar dicho proceso; lo contrario ocurrió con las dietas ISO, CHA, ISO+TETRA y CHA+TETRA, en donde este descenso fue más evidente y se presentó un mayor retraso y una menor homogeneidad en la formación de la larva umbonada, lo que indica que estas últimas cuatro dietas no satisfacen enteramente los requerimientos nutricionales para ayudar a las larvas a llevar a cabo tal proceso.

El mayor porcentaje de mancha ocular, se observó en la dieta ISO+CHA e ISO+CHA+TETRA, estas dietas se caracterizaron por presentar también los mayores ritmos de crecimiento. Indudablemente el acelerado crecimiento producido por estas dietas propicio un rápido desarrollo de las estructuras responsables de originar la mancha ocular y la posterior fijación de las larvas a un sustrato; según Maeda-Martínez, (2001) este tipo de mezclas microalgales favorecen la acumulación de proteínas la cual se traduce en un rápido desarrollo, en este sentido Uriarte y Frías (1999) observaron que dietas con altos contenido de proteína permitían completar más rápido el cultivo postlarvario reduciéndolo hasta en 15 días, permitiendo el traslado de las postlarvas al mar en un menor tiempo.

En cuanto a las otras dietas que no presentaron la mancha ocular, es posible que la falencia, escasez o desequilibrio nutricional que presenten estas dietas, impidieran la acumulación de cantidades adecuadas de energías, retrasando su crecimiento y por ende

la formación de la mancha ocular (Fariás-Molina, 2001; Velasco, 2008; Velasco y Barros, 2008. Autores como Lu y Blake (1996) y Raby *et al.* (1997), afirman que el crecimiento y desarrollo de las larvas depende de la ganancia neta de energía proveniente del alimento particulado y que se da cuando la energía asimilada excede las necesidades de mantenimiento del animal, y la energía adicional es utilizada para incrementar el peso corporal.

En cuanto a la deformidad larval, es evidente que los tratamientos CHA y CHA+TETRA presentaron un mayor número de larvas deformes que los demás, posiblemente a un error al momento de homogenizar las larvas antes de sembrarlas en los tanques de cultivo, debido a que no existe evidencia que la alimentación favorezca la deformidad y menos cuando tan solo han transcurrido dos días de cultivo, pues tal como sea mencionado anteriormente este fenómeno es más común durante la fertilización (Monsalvo-Spencer, 1998; Román *et al.*, 2001; Blacio y Álvarez, 2001; Uriarte *et al.*, 2001), de igual manera la permanencia de las larvas deformes durante el cultivo, como ya se discutió obedecería a las deficiencias estructurales y funcionales que presentan las larvas deformes que limitan su capacidad de desarrollar correctamente funciones vitales como alimentarse, nadar, respirar, etc.

## 7. CONCLUSIONES

No se presentó interacción entre las distintas concentraciones de espermatozoides y tiempos de fertilización utilizados en ningunas de las variables estudiadas: porcentajes de fertilización, larvas D obtenidas, deformidad, supervivencia, estado de condición, aparición de mancha ocular, permanencia de las larvas deformes durante el cultivo y crecimiento.

Los resultados indican que el factor que mayor influencia ejerció sobre la fertilización, obtención de larvas D y deformidad fue el tiempo de fertilización, por el contrario la concentración de espermatozoides sólo influyó sobre la deformidad larval, alcanzándose menores porcentajes con la concentración de 50:1 y 100:1 espermatozoides:ovocito.

La mezcla de altas concentraciones de espermatozoides y tiempos prolongados de fertilización produce alta mortalidad de cigotos, así como bajas cantidades de larvas D. Así mismo, un alto porcentaje de ovocitos fertilizados no asegura necesariamente una alta producción de larvas D.

Los factores probados: concentración de espermatozoide:ovocito y tiempo de fertilización, sólo influyeron sobre el desarrollo embrionario hasta la obtención de larvas D, dado que la supervivencia, el crecimiento y el estado de condición de las larvas durante el cultivo se encuentran afectados por las condiciones propias del cultivo, tales como densidad larval, alimentación, calidad del agua, temperatura, salinidad y pH.

La mejor fertilización se obtuvo con la concentración de 100 espermatozoides por ovocito y tiempo de 30 minutos.

Las diferentes fuentes de agua de mar utilizada durante estos experimentos no influyeron sobre la formación ni la permanencia de larvas deformes en el cultivo. En cuanto al crecimiento y supervivencia, las larvas se vieron afectadas por la utilización del agua de mar artificial, y el mejor desarrollo de las larvas se produjo en las aguas de mar de origen natural, siendo estas: oceánica, clorinada y sin tratar.

La densidad inicial de cultivo fue el factor que mayor influencia ejerció sobre el crecimiento y el estado de condición de las larvas.

El comportamiento de la supervivencia, no varió significativamente bajo ninguna de las densidades iniciales ni concentraciones de alimento probadas, de igual modo no se presentó interacción entre estas dos variables.

Los tratamientos que iniciaron con una mayor densidad de cultivo (10 y 15 larvas mL<sup>-1</sup>) registraron un mayor crecimiento y un mejor estado de condición en comparación con los de densidad de 5 larvas mL<sup>-1</sup>.

En lo concerniente al estado de condición, se registró el mejor comportamiento en las larvas cultivadas a una densidad de siembra inicial de 10 larvas mL<sup>-1</sup> y a una concentración de 40.000 cél mL<sup>-1</sup>

La dieta compuesta por las microalgas *I. galbana* + *C. calcitrans* suplió de mejor manera las necesidades nutricionales de las larvas, favoreciendo su rápido desarrollo.

La semejanza en el crecimiento, supervivencia y estado de condición de las larvas alimentadas con las dietas *I. galbana* + *C. calcitrans* e *I. galbana* + *C. calcitrans* + *T. suecica*, indica que la adición de la microalga *T. suecica*, no representa un beneficio significativo, por el contrario, su implementación incrementaría los costos en la producción de alimento vivo en laboratorio.



## 8. REFERENCIAS

- ABASOLO-PACHECO, F., MAZÓN-SUÁSTEGUI, J. M. y P. E. SAUCEDO. 2009. Response and condition of larvae of the scallops *Nodipecten subnodosus* and *Argopecten ventricosus* reared at the hatchery with different seawater sources. *Aquaculture*. 296: 255–262
- ACOSTA, E. 2004. Experimentos de reproducción artificial del scallop *Nodipecten nodosus*. Tesis de pregrado para optar al título de Ingeniero Pesquero. Universidad del Magdalena, Facultad de Ingeniería. Santa Marta, Colombia. 59 p
- AKABOSHI, S. y J. E. ILLANES. 1983. Estudio sobre la captación, precultivo y cultivo en ambiente natural de *Chlamys (Argopecten) purpurata*, Lamarck 1819, en Bahía Tongoy, IV región, Coquimbo. Symposium Internacional de Acuicultura, Coquimbo, Chile, Septiembre de 1983: 233-251
- ALDERMAN, D. J. y T.J. HASTINGS. 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance–potencial for consumer health risks. *International journal of food science and technology*. 33: 139-155
- AVENDAÑO, R. E, M. LE PENNEC & M. CANTILLANEZ. 2001. Anormalidades en larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Pectinidae), uno de los problemas en la producción artificial de semilla. *Estud. Oceanol*. 20: 33-42.
- AVILÉS-QUEVEDO, M. A. 1990. Crecimiento de la almeja Catarina (*Argopecten purpuratus*) en función del alimento, con anotaciones sobre su biología y desarrollo. Tesis de maestría en ciencias, Instituto Politécnico Nacional, Las Paz, México. 81 pp.
- BALCÁZAR, J.L., RUÍZ-ZARZUELA, I., CUNNINGHAM, D., VENDRELL, D., MUZQUIZ, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veter. Microb*. 114, 173–186.
- BARROS, J. M. 2004. Ensayos de reproducción artificial de la vieira *Argopecten nucleus* Born, 1780 (Bivalvia: Pectinidae) en condiciones controladas. Tesis de pregrado para optar al título de Ingeniero Pesquero. Universidad del Magdalena, Facultad de Ingeniería. Santa Marta, Colombia. 90 p.
- BAYNE, B. L. 1983. Physiological ecology of marine molluscan larvae. *En*: Verdonk N. H., J. A. M. van der biggelaar y A.S. tompa (Eds). *The mollusca*. Academic press, Orlando. 299-343
- Bill, Frank. “Shells| Shell Collecting Nature-Jacksonville, Florida”. Internet: (<http://www.jaxshells.org/atlanticb.htm>). Consultado el 10 de Junio de 2009.
- BLACIO, E. y R. ÁLVAREZ. 2001. El Mundo Acuícola. Tecnología para el cultivo de scallops (*Argopecten circularis* Sowerby, 1835) en Ecuador. *Ecuador*. 8 (1): 56-58

- BRICELJ, V. M. y S. SHUMWAY 1991. Physiology: energy acquisition and utilization. In: *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture* (ed. by S.E. Shumway). Elsevier. Amsterdam. 305-346
- CASTELLANOS, C. y N. CAMPOS. 2007. Variación espacial y temporal de juveniles de *Pinctada imbricata* (Röding, 1798) y *Argopecten nucleus* (Born, 1778) en la región norte del Caribe colombiano. *Bol. Inv. Mar Cost.* 36: 209-22
- COCHARD, J. C. y N. DEVAUCHELLE. 1993. Spawning, fecundity and larval survival and growth in relation to controlled conditioning in native and transplanted populations of *Pecten maximus* (L): evidence for the existence of separate stocks. *J Exp. Mar. Biol. Ecol.* 169: 41-56
- COLT, J. E. y D. A. ARMSTRONG. 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and molluscs. *Proc. Bioeng. Symp. Fish Cult., Fish Cult. Sect.* In: FCS Publ., vol. 1. American Fishery Society. 34-47
- COURTRIGHT, R. C., BREESE, W. P. y H. KRUEGER. 1971. Formulation of synthetic sea water for bioassays with *Mytilus edulis* embryos. *Water Res.* 5: 877-888
- CRAGG, S. M. y D. J. CRISP. 1991. The biology of scallop larvae. En: S. Shumway (ed). *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier Science, Amsterdam. 75-132
- DE LA ROCHE, J. P y A. VÉLEZ. 1997. Descripción del desarrollo larval de la vieira “pata de león” *Nodipecten nodosus* bajo condiciones de laboratorio. 1997. VII Colacmar, Sao Paulo, 238 p
- DÍAZ, J. M. y M. PUYANA. 1994. Moluscos del Caribe Colombiano, un catálogo ilustrado. 1994. Colciencias, Fundación Natura e INVEMAR, Bogotá, 291 p + laminas.
- Dore, I. 1991. Shellfish. A Guide to oysters, mussels, scallops, clams and similar products for the commercial user. Van Nostrand Reinhold. Nueva York, USA. 272
- FARIÁS-MOLINA, A. 2001. Nutrición en Moluscos Pectínidos. En: MAEDA-MARTÍNEZ, A.N. (Editor). 2001. *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México. Cap. 5: 89-104
- FERNÁNDEZ, I. 1991. Reproducción y Acondicionamiento de Bivalvos en el Criadero. Tema 16. Conselleria de Pesca, Marisqueo e Acuicultura. Xunta de Galicia. España. 35 p
- GARRASI, C., DEGENES, E. T. y K. MOPPER. 1979. The free amonio acid composition of seawater obtained without desalting and precocentration. *Mar. Chem.* 8: 71-75
- GÓMEZ-GIL B., ROQUE A. y A. GUERRA-FLORES. 2001. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. En:

- Páez-Osuna F. Camaronicultura y Medio Ambiente. Primera edición. Diciembre 2001. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. 273-274
- GRETCHEN, K.B., STEPHEN, J.K., JOSEPH, R.T. y A. RAYMON. 2004. Changes in water quality after addition of sea salt to fresh water: implications during toxicity testing. *Chemosphere*. 57: 1707–1711p
- GRUFFYDD, L.D. y A.R BEAUMONT. 1970. Determination of the optimum concentration of eggs and spermatozoa for the reproduction of normal larvae in *Pecten maximus* L. (Mollusca, Lamellibranchia). *Helgol. Wiss. Meeresunters*. 20: 486-497
- GUTIÉRREZ, N. 2009. Aquahoy portal de información en acuicultura. Internet: (<http://www.aquahoy.com/content/view/7549/lang,es/>). Consultado el 10 de Junio de 2009.
- GUZMÁN, Z., ELJAIK, N., DE LEON. M. T., MADERA, J. y J. RODRÍGUEZ. 2004. Sector agropecuario, cultivo del camarón. Superintendencia de sociedades, Intendencia Regional Cartagena. 120 p
- HELM, M. BOURNE, M. N. y A. LOVATELLI. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. Documento técnico de pesca número 471. Roma, FAO. 182 p
- HIS, E., M. N. SEAMAN y R. BEIRAS. 1997. A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Wat. Res*. Vol, 31 (2): 351–355 p
- IBARRA, A. M., P. CRUZ & B. A. ROMERO. 1995. Effects of inbreeding on growth and survival of shell-fertilized catarina scallop larvae, *Argopecten circularis*. *Aquaculture*. 134: 37-47
- IBARRA, A.M., J. L. RAMÍREZ y G. A. GARCÍA. 1997. Stocking density effects on larval growth and survival of two catarina scallop, *Argopecten ventricosus* (=circularis) (Sowerby II, 1842), populations. *Aquaculture Research*. 28: 443-451
- ILLANES, J. E. 1995. Cultivo de larvas y postlarvas. En: 8 Curso Internacional en Cultivo de Moluscos. Coquimbo, Chile. 384 p.
- INVEMAR. 2005. Informe del Estado de los Ambientes Marinos y Costeros en Colombia: Año 2005. (Serie de publicaciones periódicas/INVEMAR; No. 8) Santa Marta. 360 p
- INVEMAR, 2009. Cultivo piloto experimental de los bivalvos (*Pinctada imbricata*, *Pteria colymbus* y *Argopecten nucleus*) como sistema productivo alternativo a formas de subsistencia tradicional en Bahía de Portete, Departamento de la Guajira, Caribe colombiano. 63 p
- LABARTA, U., FERNANDEZ-REIRIZ, M. J., ALBERTOSA, M. y A. PÉREZ-CAMACHO. 1997. Evaluación de dietas vivas e inertes para el cultivo de juveniles de bivalvos. VI Congreso Nacional de Acuicultura.

- LEE, C. y J. L. BADA. 1977. Dissolved amino acids in the Equatorial Pacific, the Sargasso Sea and Biscayne Bay. *Limnol. Oceanogr.* 22: 502-510
- LOBOS, G. 1992. Análisis del mercado mundial para el ostión de Chile y evaluación económica de un centro de cultivo de ostión del Norte. Tesis de postgrado (Economía Agraria). Pontificia Universidad Católica de Chile. 167 p + Anexos.
- LODEIROS, C. FREITES, L.; NÚÑEZ, M. y J. H. HIMMELMAN. 1993. Growth of the Caribbean scallop *Argopecten nucleus* (Born 1970) in suspended culture. *J. Shell. Res.* Vol.12, 2: 291-294
- LOOSANOFF, V. L. y H. C. DAVIS. 1963. Rearing of bivalve mollusks. In: GRUFFYDD, LI. D. and A. R. BEAUMONT. 1970. Determination of the optimum concentration of eggs and spermatozoa for the reproduction of normal larvae in *Pecten maximus* L. (Mollusca, Lamellibranchia). *Helgol. Wiss. Meeresunters.* 20: 486-497
- LORA-VILCHIS, M. C. y A. N. MAEDA-MARTÍNEZ. 1997. Ingestion and digestion index of catarina scallop *Argopecten ventricosus-circularis*, Sowerby, 1842, veliger larvae with ten microalgae species. *Blackwell Science Ltd. Aquaculture research.* 28: 905-910
- LIU, B., DONG, B., TANG, B., ZHANG, T. y J. XIANG. 2006. Effect of stocking density on growth, settlement and survival of clam larvae, *Meretrix meretrix*. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China. *Aquaculture.* 258: 344-349
- LU, Y.T y N. BLAKE. 1996. Optimum concentrations of *Isochrysis galbana* for growth of larval and juvenile bay scallops, *Argopecten irradians concentricus* (Say). *Journal of Shell. Res.* 15 (3): 635-643
- LUNA-GONZÁLEZ, A., MAEDA-MARTÍNEZ, A.N., SAINZ-HERNÁNDEZ, J.C., ASCENCIO-VALLE, F., 2002. Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to *Vibrio alginolyticus* strain. *Disease. Aqua. Org.* 49, 221-226.
- McDONALD, B.A. 1988. Physiological energetics of the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 120: 155-170
- MAEDA-MARTÍNEZ, A., ORMART, P., CANO, T. M. y V. OSORIO. 1996. Cultivo de scallops en Ecuador: una alternativa en desarrollo. *Acuicultura del Ecuador.* 13: 30-36
- MAEDA-MARTÍNEZ, A.N. (ed.). 2001. Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México 501 p
- MANAHAN, D. T. y D. J. CRISP. 1982. The role of dissolved organic material in the nutrition of pelagic larvae: amino acid uptake in bivalve veligers. *Amer. Zool.* 22: 635-646 p
- MANAHAN, D. T. 1983. The uptake and metabolism of dissolved amino acids by bivalve larvae. *Biol. Bull.* 164: 236-250 p



- MARTÍNEZ, G. 1991. Estudios nutricionales en larvas de ostión *Argopecten purpuratus*. Informe técnico, Fondo de desarrollo productivo, Corporación de Fomento de la Producción, CORFO. Chile. 40 p
- MARTÍNEZ, G., METTIFOGO, L., PÉREZ, M. A. y C. CALLEJAS. 2007. A method to eliminate self-fertilization in a simultaneous hermaphrodite scallop. 1. Effects on growth and survival of larvae and juveniles. *Aquaculture*. 273: 459-469
- MILLÁN-TOVAR, M. M. 1997. Experimentos de inducción a la maduración de *Argopecten venticosus* (Sowerby, 1842) y estudio del valor nutricional de *isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*, durante su crianza larvaria. Tesis de maestría. Área interdisciplinaria de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. 140 p
- MONSALVO-SPENSER, P. 1998. Estudio sobre el cultivo de larvas y juveniles de almeja catarina *Argopecten ventricosus* (=circularis) (Sowerby II, 1842) en el laboratorio. Tesis de maestría. CICIMAR. La Paz, B.C.S. México. 90 p
- NARVARTE, M. A. y M. S. PASCUAL. 2003. Fertilization, larval rearing and postlarval growth of the Tehuelche scallop *Aequipecten tehuelchus* D'Orb., 1846. *Aquaculture*. 217: 259-274
- NORTH, B. B. 1975. Primary amines in California coastal waters: Utilization by phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 20:20-27
- O'CONNOR, W. A. y M. P. HEASMAN. 1995. Spawning induction and fertilization in the doughboy scallop *Chlamys (Mimachlamys) asperrima*. *Aquaculture*. 136: 117-129
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE). 2006. Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos 5º edición. 499 p
- ORTÍZ, G. 1994. Efecto de la ración alimenticia y la densidad de cultivo sobre el desarrollo larval de *Lyropecten subnodosus*. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. 135 p
- PADILLA, M. 1979. Desarrollo larval del ostión *Chlamys (Argopecten) purpuratus* (Lamarck, 1819) en condiciones de laboratorio (Mollusca:Pelecipedo). *Ciencias y Tecnologías del Mar. Cona*. Vol 4: 41-52
- PAULET, Y. M. 1990. Role de la reproduction dans le déterminisme du recrutement chez *Pecten maximus* (L) de la baie de saint - Briec. These de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest France. 194 p
- POUVREAU, S., BODOY, A. y D. BUESTEL. 2000. In situ suspension feeding behavior of the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*: combined effects of body size and weatherrelated seston composition. *Aquaculture*. 181: 91-113

- PEÑA, J. 2001. Taxonomía, morfología, distribución y hábitat de los pectínidos iberoamericanos. En: Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. Editorial Limusa. 1-25
- PÉREZ, A. y G. ROMÁN. 1987. La reproducción en los moluscos bivalvos. En: Reproducción en acuicultura. Espinosa y Labarta Editores. Cap. 2: 133-184
- RABY, D., MINGELBIER, M, DODSON, J. J., KLEIN, B., LAGADEUC, Y. y L. LEGENDRE. 1997. Food particle size and selection by bivalve larvae in a temperate embayment. Mar. Biol. 127: 665-672p
- RAMPERSAD, J. N., AGARD, J. B. y D. AMMONS. 1994. Effects of gamete concentration on the in vitro fertilization of manually extracted gametes of the oyster (*Crassostrea rhizophorae*) Aquaculture. 123 (1-2): 153-162
- ROJAS, L. M., VÉLEZ, A. y O. AZUAJE. 1988. Efectos individuales y combinados de la densidad larval y la ración de alimenta sobre la supervivencia y el crecimiento de la vieira *Pecten ziczac*. Bol. Inst. Oceanogr. 27: 57-62
- ROMÁN, G., MARTÍNEZ, G., GARCÍA, O. y L. FREITES. 2001. Reproducción. En: Maeda-Martínez, A.N. (Editor). 2001. Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México. Cap. 2: 27-59
- RIQUELME, C., ARAYA, R., VERGARA, N., ROJAS, A., GUAITA, M., CANDIA, M., 1997. Potential of probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Aquaculture 154, 17–26.
- SAÍNZ-HERNÁNDEZ, J.C., MAEDA-MARTÍNEZ, A.N., 2005. Sources of *Vibrio* bacteria in mollusk hatcheries and control methods: a case study. Aqua. Res. 36, 1611–1618.
- SALAUN, M., BOUCHER, J. Y. y M. LE PENNEC. 1991. Prodissoconch shell characteristics as indicators of larval growth and viability in *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758). Journal Shell Res. 10: 37-44
- SASTRY, A.N. 1963. Reproduction of the bay scallop *Aequipecten irradians* Lamarck. Influence of temperature on maturation and spawning. En: Biol. Bull. 125: 146-153 p
- SASTRY, A. N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae) En: Reproduction of marine invertebrates (A.C. Giece y J. S. Pearse). Academic Press, New York, vol. 5. 113-292
- SAUCEDO P., A. MARTÍNEZ-LÓPEZ & J. CÁERES-PUIG. 2009. Interactive effects of temperature and diet on the growth and biochemical composition of juveniles of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica*. Aquaculture Research 40, 1301-1309.
- SHUMWAY, S.E. y G. J. PARSONS. 2006. Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Developments in aquaculture and fisheries science, Vol 35. Second edition. Elsevier. 1460 p



- SICARD-GONZÁLEZ, M. T., MAEDA-MARTÍNEZ, A. N., LLUCH-COTA, S. E. y L. M. ROLDÁN-CARRILLO. 2006. Frequent monitoring of temperature: an essential requirement for site selection in bivalve aquaculture in tropical-temperate transition zones. *Aqua. Res.* 37: 1040-1049
- SOUDANT, P. 1995. Les phospholipides et les sterols des géniteurs et des larves de coquille Saint - jacques *Pecten maximus* (L). Relations avec la nutrition. These de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest. 294 p
- STEPHANO, J. L. y M. GOULD. 1988. Avoiding polyspermy in the oyster (*Crassostrea gigas*). Elsevier. *Aquaculture.* 73: 295-307
- STRUGNELL, J. M. y P. C. SOUTHGATE, 2003. Changes in tissue composition during larval development of the blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.). *Mollusc. Res.* 23: 179-183
- STURLA, L y L. A. VELASCO. 2008. Mercado y comercialización de pectínidos. En: VELASCO, L.A. 2008. *Biología y cultivo de los pectínidos de interés comercial de Colombia.* Luz Adriana Velasco, Editor. Editorial Unimagdalena. Cap. 8: 203-225 p
- TRUJILLO, M. L. 1992. Evaluación de dos sistemas para la producción masiva de microalgas, empleando un medio de cultivo artificial. Tesis de maestría en Ciencias. CICESE. 121 p
- URBAN, H. J. 1999. Diagnóstico y evaluación de la factibilidad biológica, técnica y económica del cultivo experimental de bivalvos de interés comercial en el Caribe colombiano. Informe técnico final, INVEMAR, Santa Marta. 212 p + anexos.
- URIARTE, I. y FARÍAS, A. 1999. The effect of dietary protein content on growth and biochemical composition of Chilean Scallop *Argopecten purpuratus* (L) postlarvae and spat. *Aquaculture* 180: 119-127.
- URIARTE, I., RUPP, G. y A. ABARCA. 2001. Producción de juveniles de Pectínidos Iberoamericanos bajo condiciones controladas. En: Maeda-Martínez, A. N. (ed.). 2001. *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura.* McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México. Cap. 8: 147-171 .
- UTTING, S. D. y P. F. MILLICAN. 1998. The role of diet in hatchery conditioning of *Pecten maximus* L.: a review En: *Aquaculture.* 165: 167-178
- VADIVIESO, V., C. LOYOLA y F. GALLEGOS. 1989. Producción experimental de concha de abanico en ambiente controlado, Callao, Perú. En: memorias simposio internacional de los recursos vivos y las pesquerías en el pacífico sudeste. Viña del mar, Chile. 9 – 13
- VALERO, A.P.; S. SÁNCHEZ, C. GARCÍA, A. J. CÓRDOBA, J. P. DE LA ROCHE, J. C. GÓMEZ, C. CASTELLANOS, M. E. TORRES, M. E. RUEDA, R. HERNÁNDEZ, J. P. BAUTISTA, ASSMUS y Y. CABALLERO. 2000. Cultivo de bivalvos marinos del Caribe colombiano. En: COLCIENCIAS. Colombia: Ciencia y Tecnología. Vol.18 No.13. Bogotá. 40 p

- VELASCO L. A, 2006. Effect of microalgal concentration and water temperature on the physiology of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. J. Shellfish Res. 25(3): 823-831
- VELASCO, L. A. 2007. Energetic physiology of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus* fed with different microalgal diets. Aquaculture. 270: 299-311
- VELASCO, L. A., BARROS, J. y E. ACOSTA. 2007. Spawning induction and early development of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. Aquaculture. 272: 767-773
- VELASCO, L. A. 2008. Biología y cultivo de los pectínidos de interés comercial de Colombia. Editor Luz Adriana Velasco. Editorial Unimagdalena. 258 p
- VELASCO, L. A y J. BARROS. 2008. Experimental larval culture of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. Aquaculture Research. 39: 603-618
- VILLAVICENCIO, G. 1997. Acondicionamiento gonadal, desarrollo embrionario y cultivo de larvas de la almeja mano de león, *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1835), alimentadas con cuatro especies de microalgas. Tesis de pregrado en Ingeniería en Acuicultura. Instituto tecnológico del Mar. La Paz, B.C.S., México. 93 p
- WEILING, Z., XILIN, D. AND Z. ZHENGGUO. 1995. Effects of Mg super (2+), Ca<sup>2+</sup> and g<sup>2+</sup>/Ca contents on survival of *Macrobrachium rosenbergii* larvae reared in mixed water. cean. Limn. Sin/Haiyang 26, 551–557 (in Japanese).
- WILDISH, D. J., D. D. KRISTMANSON, R. L. HOAR, A. M. DECOSTE, S. D. McCORMICK & A. W. WHITE. 1987. Giant scallop feeding and growth responses to flow. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 113: 207-220.
- WINKLER, F. M. y B. F. ESTÉVEZ. 2003. Effects of self-fertilization on growth and survival of larvae and juveniles of the scallop *Argopecten purpuratus* L. *Jour. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 292: 93-102 p

## 9. ANEXO

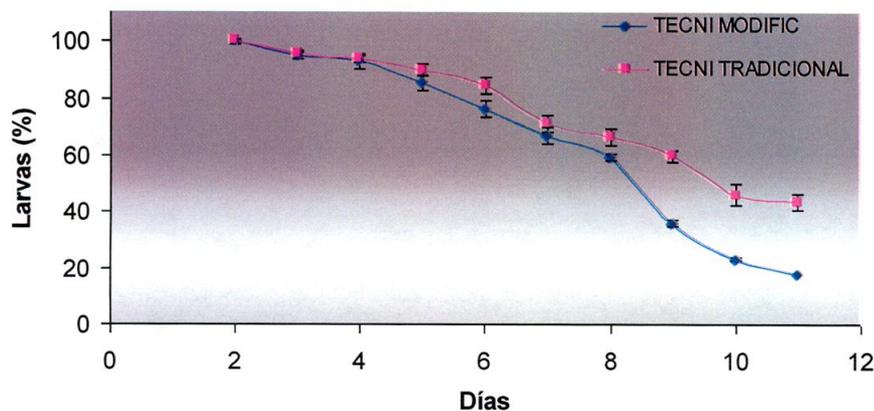
**Anexo 1.** Relación de las raciones utilizadas en número de células/mL y en peso seco de las microalgas utilizadas equivalente a *I. galbana* (Modificado de Helm *et al.*, 2006).

Especie de microalga	Relación en número de cél/ML	Relación en peso seco eq. a 1 cél de <i>I. galbana</i>
<i>Isochrysis galbana</i>	1	-
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	1	3,1
<i>Tetraselmis suecica</i>	1	0,93

**Anexo 2.** Comparación de dos técnicas de cultivo de larvas de *A. nucleus*

### Supervivencia larval

Tanto la técnica de cultivo larval propuesta por Velasco y Barros (2008) (Técnica tradicional) como la desarrollada en este estudio (Técnica modificada) mostraron porcentajes de supervivencia muy similares hasta el cuarto día de cultivo, con el 93.6 y 92.9% respectivamente; a partir de este día y en adelante se observó una disminución progresiva en los porcentajes de supervivencia de ambas técnicas, siendo más notoria a partir del octavo día de cultivo en la técnica modificada, la cual disminuyó a un ritmo de 9.1% diario, en comparación con la tradicional que registró un descenso de 6.3%, presentando para el último día de cultivo una supervivencia del 43.6 y 18% para la técnica tradicional y la modificada (Figura 1).



**Figura 1.** Porcentaje de supervivencia larval de *A. nucleus* bajo dos técnicas de cultivo. (La barra indica el error estándar)

En cuanto al número de larvas que llegaron hasta el final del cultivo, la técnica modificada inició con un promedio de 4.538.000 larvas, cantidad 10 veces mayor a la utilizada en la técnica tradicional que fue de 417.000; esta diferencia se mantuvo hasta el octavo día de cultivo, fecha en la cual ambas técnicas presentaron una cantidad de larvas equivalentes a 2.667.778 y 276.667 larvas para la tradicional y modificada, a partir del noveno día de cultivo estas cantidades descendieron en deferente proporciones, al final del experimento se obtuvo 182.222 larvas para la técnica tradicional y 803.333 larvas para la técnica modificada, siendo esta última 4.4 veces mayor que la tradicional (figura 2 y 3).

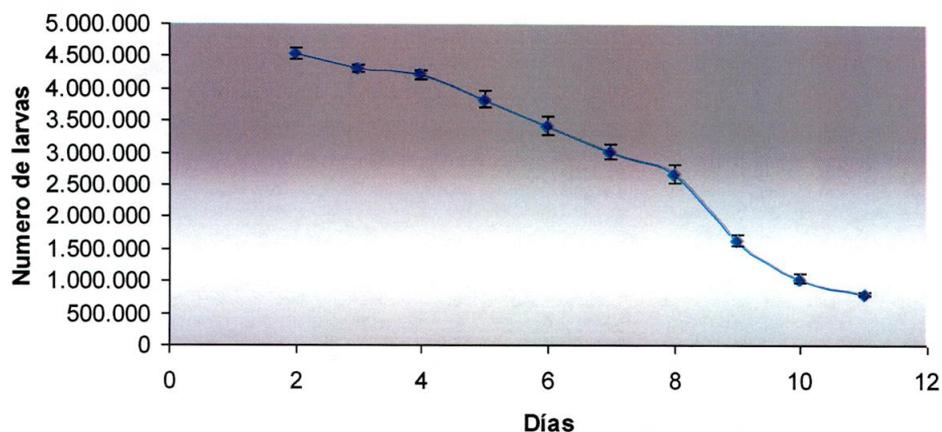


Figura 2. Cantidad de larvas de *A. nucleus* técnica modificada. (La barra indica el error estándar)

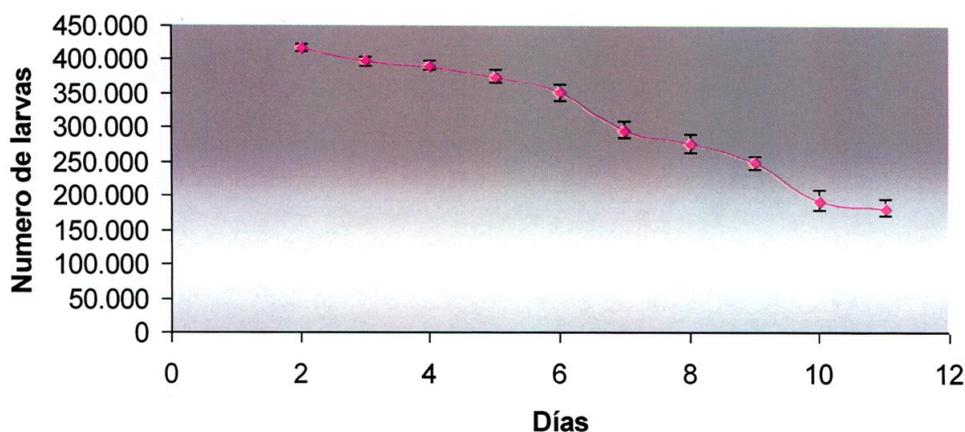
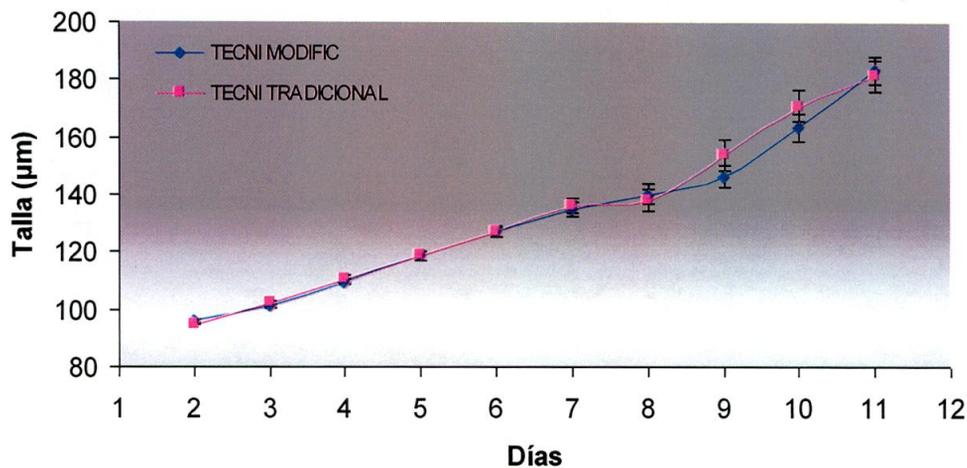


Figura 3. Cantidad de larvas de *A. nucleus* técnica tradicional (La barra indica el error estándar)

### Crecimiento larval

El crecimiento de las larvas fue muy homogéneo para las dos técnicas, siendo la tradicional mayor por solo  $0.08 \mu\text{m}$  ( $9.7 \mu\text{m}/\text{día}$ ) en comparación con la modificada ( $9.6 \mu\text{m}/\text{día}$ ), excepto los días nueve y diez de cultivo en los que se observó una pequeña disminución del crecimiento por parte de la modificada registrando una diferencia promedio con respecto a la tradicional de  $7 \mu\text{m}$ . Para el final del cultivo las tallas fueron de  $183.2$  (tradicional) y  $181.2 \mu\text{m}$  (modificada) (Figura 4).

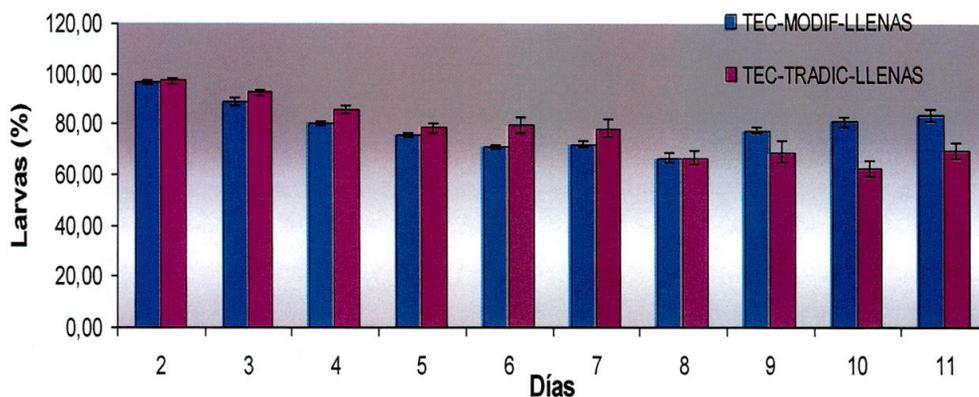


**Figura 4.** Crecimiento larval de *A. nucleus* técnica tradicional. (La barra indica el error estándar)

#### Estado de condición diaria larval

Al inicio del experimento tanto en la técnica de cultivo tradicional como la modificada, los porcentajes de larvas en estado llenas fueron altos con 97.2 y 96.6%. Entre el tercer y séptimo día; la técnica tradicional mantuvo un mayor porcentaje de larvas llenas superando en promedio la tradicional en un 5%. En el octavo día ambas técnicas igualaron sus porcentajes de larvas con un 66.5%, pero a partir del noveno día y hasta el final del cultivo, la modificada tuvo los mayores porcentajes, superando en promedio a la tradicional en un 5.7%.

Al final del cultivo la técnica modificada presentó un 83.6% de larvas llenas frente a la tradicional que alcanzó un 63.5% (figura 5).



**Figura 5.** Estado de condición diaria de larvas llenas de *A. nucleus* con las dos técnicas de cultivo. (La barra indica el error estándar)

### Larvas semillenas y vacías

Tanto en las larvas semillenas como en las vacías, se presentó un comportamiento inverso al registrado en las larvas llenas. En general a lo largo del experimento los porcentajes de larvas semillenas fueron mayores en la técnica modificada durante los primeros 7 días de cultivo, periodo en el cual el mayor valor se registró en el día 7 con 19% (modificada) y 18.4% (tradicional). A partir del día 8 y hasta el final del cultivo este comportamiento se invirtió, siendo mayor la presencia de larvas semillenas en la técnica tradicional con el mayor valor el octavo día (29%), frente a un 23.6% en la modificada. Al final del cultivo la tradicional registró un 23.3% y la modificada un 13.5% (Figura 6).

En el caso de las larvas vacías ninguna de las técnicas de cultivo evaluadas superó el 12%, siendo mayor la presencia de larvas vacías durante los primeros ocho días en la modificada con un máximo de 11.2%. A partir del noveno día y hasta el final del experimento la tradicional presentó el valor máximo al día 10 con 11.2% (Figura 7).

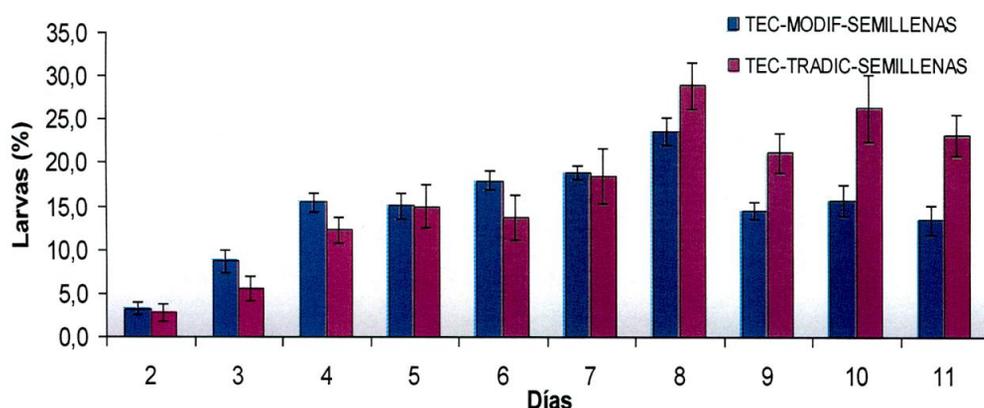


Figura 6. Estado de condición diaria de larvas semillenas de *A. nucleus* con las dos técnicas de cultivo. (La barra indica el error estándar)

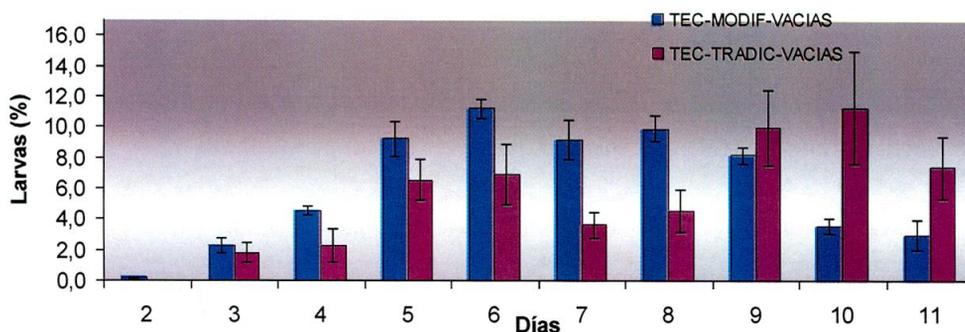


Figura 7. Estado de condición diaria de larvas vacías de *A. nucleus* con las dos técnicas de cultivo. (La barra indica el error estándar)

### Porcentaje de larvas con mancha ocular

La presencia de larvas con mancha ocular se observó a partir del décimo día, tanto en la técnica tradicional como en la modificada con valores de 7.8 y 3.1%. Para el día 11 la tradicional alcanzó un 27.9%, mientras que la modificada aumentó a un 20.7% (Figura 8).

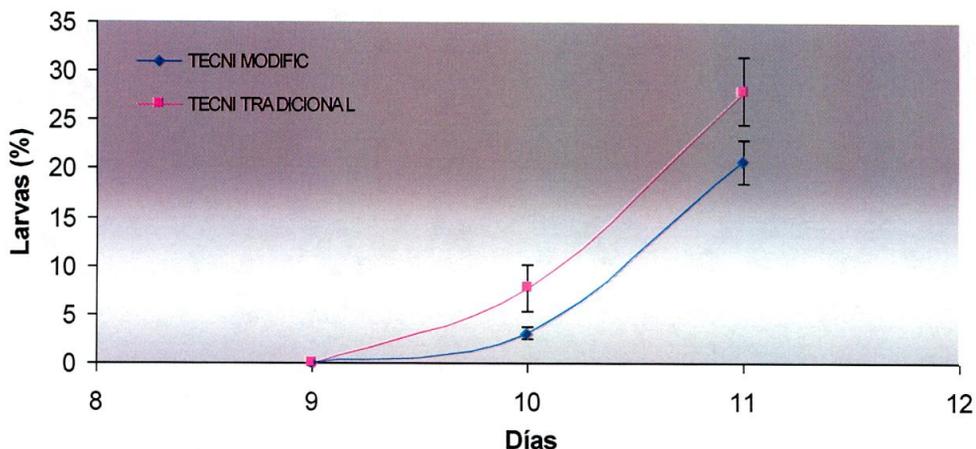


Figura 8. Porcentaje de larvas de *A. nucleus* con presencia de mancha ocular bajo dos técnicas de cultivo. (La barra indica el error estándar)

### Número de larvas con mancha ocular

La técnica modificada presentó para el día 10 de cultivo un promedio de 33.000 larvas con presencia de mancha ocular, cantidad equivalente al doble de la obtenida en la tradicional, que para el mismo tiempo registró 16.000 larvas en este estado. En el día 11 de cultivo las cantidades de larvas con presencia de mancha ocular aumentaron para ambas técnicas, manteniéndose aun la superioridad en la modificada con un promedio de 168.000 larvas, cantidad 3.4 veces superior a la generada por la tradicional que fue de 48.000 larvas (Figura 9).

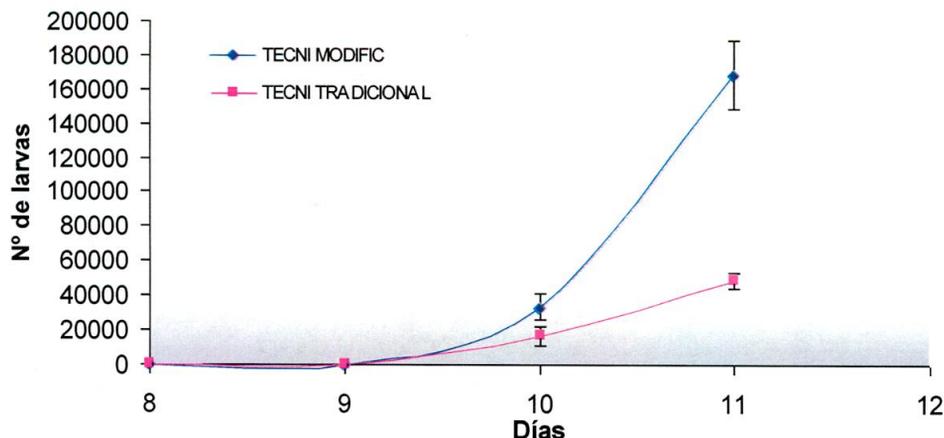
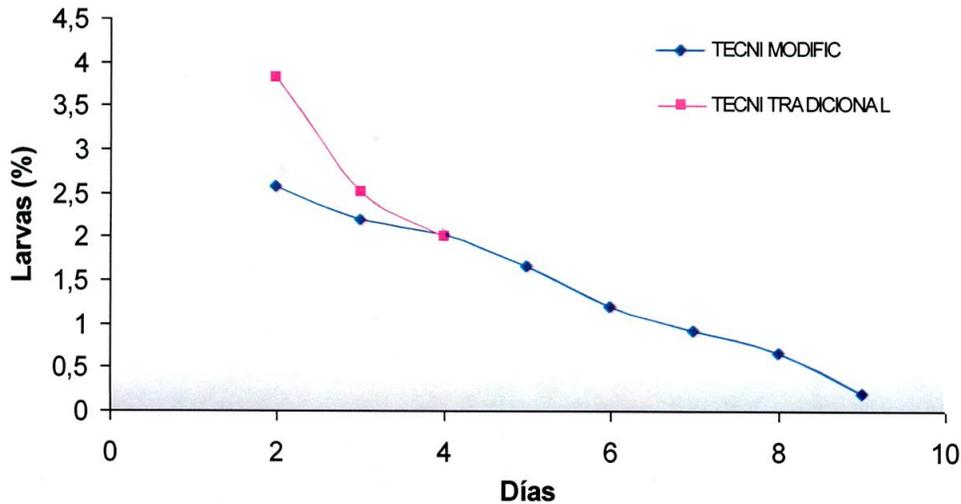


Figura 9. Número de larvas de *A. nucleus* con presencia de mancha ocular con las dos técnicas de cultivo. (La barra indica el error estándar)

### Porcentaje de larvas deformes durante el cultivo

La técnica modificada presentó un menor porcentaje de larvas deformes al principio del cultivo con un 2.6% en comparación con la tradicional con 3.8%. En contraste esta última registró por menor tiempo la presencia de estas larvas, presentando al cuarto día un 2.0%, mientras que la tradicional mostró larvas deformes hasta el día 9 con un 0.2% (figura 10).



**Figura 10.** Porcentaje de larvas deformes de *A. nucleus* con las dos técnicas de cultivo. (La barra indica el error estándar)

### Número de larvas deformes

El número promedio de larvas deformes registradas para los primeros cuatro días de cultivo en ambas técnicas, mostró que la técnica modificada fue nueve veces mayor que la tradicional, alcanzando en el cuarto día de cultivo un número 87.000 larvas deformes en comparación con la tradicional que registro un número de 8.000.

A partir del día 5 de cultivo solo la técnica tradicional presentó larvas deformes, las cuales descendieron en promedio a razón de 15.000 larvas diarias, registrando el día nueve 4.000 larvas (Figura 11).

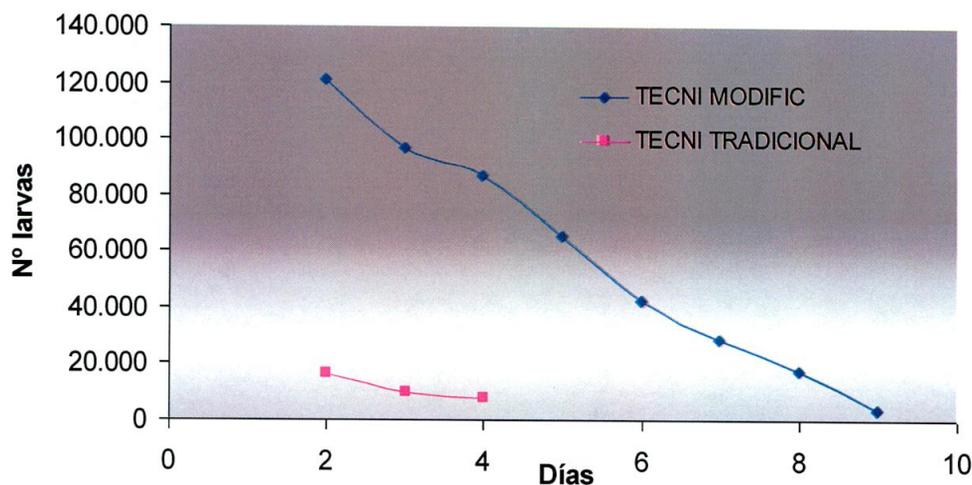


Figura 11. Número de larvas deformes de *A. nucleus* bajo dos técnicas de cultivo. (La barra indica el error estándar)

#### Análisis de la Comparación de técnicas

Las dos técnicas de cultivo lograron el desarrollo de larvas de *A. nucleus* hasta el estado de larvas con ojo. Presentándose en la técnica tradicional al final del cultivo los mayores porcentajes de supervivencia y larvas con mancha ocular, no obstante fue la técnica modificada la que obtuvo el mayor número de larvas vivas y larvas con mancha ocular al final del cultivo, este comportamiento indicaría que ambas técnicas son potencialmente viables para la obtención de postlarvas, también que la tradicional presentó los mayores porcentajes en las variables mencionadas anteriormente, atribuyéndose esto a la densidad de 1 larva mL<sup>-1</sup>, la cual es 10 veces menor que la utilizada en la técnica modificada, el uso de esta baja densidad (como se mencionó en la discusión) reduce en gran medida problemas como la competencia por alimento, el choque entre larvas y el incremento en los productos de excreción como amonio (Pérez y Román, 1987; Cragg y Crisp, 1991; Uriarte *et al.*, 2001), favoreciendo las condiciones para que tanto las larvas competentes como aquellas que no lo son del todo sobrevivan y terminen su desarrollo hasta postlarvas.

Por el contrario la técnica tradicional al incrementar la densidad (sin exceder los límites), mejorar la dieta y aumentar la cantidad de alimento, promueve al interior del cultivo una especie de selección natural, permitiendo la supervivencia solo de las larvas más competentes, esto puede ser observado de mejor manera en las graficas de los estado de condición (Figura 5, 6, 7), donde durante los primeros 7 días de cultivo es evidente que la técnica tradicional presenta un mayor porcentaje de larvas llenas en comparación con la técnica tradicional, sin embargo en el octavo día, en el cual se presentó la formación del umbo, que es un evento considerado altamente estresante (debido a la serie de cambios morfológicos y fisiológicos que implica) que según Velasco (2008), es en conjunto con la metamorfosis las etapas en las cuales se produce la mayor mortalidad en el cultivo, la técnica modificada registró los mayores porcentajes de larvas llenas.

El hecho de que la técnica modificada registrara un mayor número de larvas llenas durante la formación del umbo, podría ser el reflejo de proceso de selección natural, en el cual se redujo el número de larvas presentes, en especial aquellas larvas con menos



reservas de energía (semillenas y vacías) o también llamadas larvas poco competentes se vieron fuertemente afectadas por el gasto energético que implicó la formación del umbo, reduciendo el número de larvas semillenas y las vacías, produciendo en consecuencia un 14% de aumento en el porcentaje de larvas llenas con relación a la técnica tradicional, la cual al tener una menor densidad mantuvo unas condiciones menos adversas que permitieron la supervivencia de un mayor número de larvas semillenas y las vacías. De igual manera esto es evidente el número de larvas con mancha ocular, puesto que entre mayor sea el número de larvas en estado de condición llenas mayor es la posibilidad de que estas larvas tengan una mayor reserva energética que les permita desarrollarse más rápido y generar la mancha ocular.

En cuanto al crecimiento de las larvas, no se presentó diferencias entre las dos técnicas, indicando que las condiciones de densidad, dieta y concentración de alimento por cada una de ellas, interaccionan de manera adecuada dentro de cada técnica.

Por último el porcentaje de larvas deformes para ambas técnicas no supero el 4% y tal como se explicó en los experimentos anteriores la aparición de este tipo de larvas es un fenómeno relacionado más a los procesos de maduración de los reproductores, fertilización y desarrollo embrionario que a la técnica de cultivo que se emplee.

Desde el punto de vista productivo, la obtención de semilla de pectínidos involucra las fases de acondicionamiento de reproductores y desove, cultivo larvario, asentamiento, cultivo postlarvario en el mar y producción de microalgas (Velasco, 2008), de estas fase el cultivo larval es la que mayor tiempo y dinero requiere, porque se realiza en su totalidad bajo condiciones de laboratorio y de su buen desarrollo depende el éxito del asentamiento y el cultivo postlarval en el mar.

### **Aspecto económico**

Dentro de los principales costos que involucra la larvicultura de bivalvos marinos, está el personal, materiales y suministro de servicios públicos, los cuales pueden alcanzar a sumar hasta un 77% de los costos de operación (Velasco, 2008); teniendo en cuenta esto y a pesar que la técnica modificada presentó un 25% menos de supervivencia que la técnica tradicional, el número de larvas que sobrevivieron al final del cultivo y las que presentaron mancha ocular en la técnica modificada fueron 4.4 y 3.5 veces mayor respectivamente, con respecto a las obtenidas en la técnica tradicional; este incremento en la producción se logró ocupando el mismo número de tanques de cultivo, personal de trabajo e infraestructura física y área de producción; sin embargo para mantener esta producción se hace necesario incrementar la producción de microalgas.

En la Tabla 1 de este anexo se presenta la comparación de los costos de producción y ganancias de las dos técnicas de cultivo, basado en el análisis financiero de la producción de semilla realizado por Velasco (2008), se evidencia que la técnica modificada genera más de un 300% de ganancias que la técnica tradicional y un 79% más de ganancia que el reportado en el análisis financiero elaborado por Velasco (2008).

Otro aspecto que favorece en términos de producción a la técnica modificada es la capacidad de aumentar el porcentaje del estado de condición de las larvas llenas, mediante un proceso de selección natural dejando solo las larvas más aptas para iniciar el proceso de fijación, proceso en el cual según Velasco (2008), la larva reduce

dramáticamente su tasa de alimentación mientras metamorfosean, dependiendo casi exclusivamente de sus reservas energéticas, lo cual indica que las larvas que presenten un estado de condición bajo (larvas semillenas y vacías) probablemente no soporten este proceso y mueran, sumado a esto la fijación implica la modificación de algunos parámetros de cultivo como la reducción de la densidad a 1 larvas mL<sup>-1</sup>, el aumento en la tasa de recambio, concentraciones de alimento y las instalaciones de sustratos; por lo tanto la selección llevada a cabo en la técnica modificada permite optimizar el espacio, el alimento, el personal y los recursos, al dejar solo larvas capaces de soportar la metamorfosis, mientras que en la técnica tradicional estas condiciones de espacio y alimento y demás son brindadas tanto a las larvas con buen potencial (larvas llenas), como a las larvas menos aptas (semillenas y vacías), obteniendo al final mayor fijación con las larvas llenas.

**Tabla 1. Comparación de los costos de producción y ganancias en la producción de semilla de *A. nucleus*, bajo tres técnicas de producción (Modificado de Velasco, 2008)**

<b>Producción</b>	<b>Técnica tradicional</b>	<b>Técnica modificada (este trabajo)</b>	<b>Velasco (2008)</b>
Capacidad de tanques de larvicultura en mL	5.000.000	5.000.000	5.000.000
Densidad de siembra Larvas mL <sup>-1</sup>	1	10	3
Nº de tanques	6	6	6
Larvas totales	30.000.000	300.000.000	83.333.333
% De larvas para fijar	43,6	17,9	36
Total larvas	13.080.000	53.700.000	30.000.000
% De semilla recuperada	2,1	2,1	2,1
Total semilla recuperada	274.680	1.127.700	630.000
Ciclos de producción por año	6	6	6
Total de semilla al año	1.648.080	6.766.200	3.780.000
Costo por semilla en pesos	60	60	60
Ingresos generados en pesos	98.884.800	405.972.000	226.800.000