



INSTITUTO SUPERIOR TECNOLÓGICO

“LUIS ARBOLEDA MARTÍNEZ”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Tecnóloga en Acuicultura

Tema:

Ingestión y digestión de 7 especies de microalgas en el cultivo larvario y post larvario temprano de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833).

Autora:

Juletzy Andreina Reyes Aguilar

Tutor de tesis:

Blgo. Daniel Fortunato Rodríguez Pesantes, MSc.

Cotutor de tesis:

Blga. María Guadalupe Bravo Montesdeoca, MSc.

2021-202

**CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE REVISIÓN Y EVALUACIÓN DEL
TRABAJO DE TITULACIÓN**

Tesis de grado sometida a consideración del tribunal de revisión y sustentación, como requisito previo a la obtención del título de Tecnóloga en Acuicultura

TEMA: Ingestión y digestión de 7 especies de microalgas en el cultivo larvario y post larvario temprano de *Anadara tuberculosa*

Realizada por:

Juletzy Andreina Reyes Aguilar

GEORMERY
BELEN MERA
LOOR -
1314730787

Firmado digitalmente
por GEORMERY
BELEN MERA LOOR -
1314730787
Fecha: 2022.02.22
17:56:21 -06'00'

Blga. Geormery Mera Loor
CI. 1314730787



Firmado electrónicamente por:
CESAR ALEJANDRO
ESTAY MOYANO

MSc. Cesar Estay Moyano
CI. 1303528549



Firmado electrónicamente por:
JORGE WASHINGTON
FIGUEROA GUZMAN

Blgo. Jorge Figueroa Guzmán
CI. 1310538713

CERTIFICADO DEL COTUTOR

Tutor de Tesis: Blgo. Daniel Fortunato Rodríguez Pesantes, MSc.

Cotutor de Tesis: Blga. María Guadalupe Bravo Montesdeoca, MSc.

Certifican: Que el trabajo de investigación titulado:

Ingestión y digestión de 7 especies de microalgas en el cultivo larvario y post larvario temprano de *Anadara tuberculosa*, de la señorita: Reyes Aguilar Julezzy Andreina con CI 1314533876, egresada de la carrera de Acuicultura ha sido realizada, revisada, corregida y aprobada bajo nuestra dirección, cumpliendo con las disposiciones reglamentarias del Instituto Superior Tecnológico Luis Arboleda Martínez.

Manta, 20/12/2021



Firmado electrónicamente por:
**MARIA GUADALUPE
BRAVO MONTESDEOCA**

María Guadalupe Bravo Montesdeoca

Cotutor

San Pedro, 23 de Noviembre del 2021

**MSc. Guadalupe Bravo Montesdeoca
Coordinadora Carrera de Acuicultura I
ITSLAM**

De mi consideración:

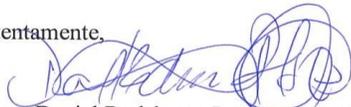
Reciba un cordial saludo de quien suscribe. El presente documento se extiende como constancia de la participación de la estudiante Julezzy Andreina Reyes Aguilar, con cedula de ciudadanía 1314533876 y egresada del Instituto tecnológico Luis Arboleda, dentro de la investigación "Early life cycle description and effects of microalgal diets on larval and post-larval development of the mangrove cockle *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833)", de la cual se desprende el tema de tesis "Ingestión y digestión mediante microalgas en el desarrollo larvario y proceso de asentamiento en concha prieta (*Anadara tuberculosa*).

El mencionado proyecto se desarrolló en el CENAIM bajo mi tutoría. En calidad de Investigador, he revisado previamente el primer documento de tesis, el mismo que sugiero también debe ser revisado por los coordinadores de la carrera de acuicultura del ITSLAM para conformidad de las partes.

Aprovecho este medio para felicitar la coordinación y augurar éxitos en la formación de profesionales en la rama de la acuicultura, lo cual fortalece la educación en el País y aportará en el desarrollo de nuevas formas de explotar racionalmente nuestros recursos.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,



Blgo. Daniel Rodríguez-Pesantes Ms.C.
TUTOR -INVESTIGADOR
CENAIM-ESPOL



ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En mi calidad de autor, yo JULETZY ANDREINA REYES AGUILAR con CI. #1314533876, egresada de la carrera de Acuicultura, menciono que los derechos patrimoniales del trabajo de grado titulado “ Ingestión y digestión de 7 especies de microalgas en el cultivo larvario y post larvario temprano de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833)” y la autoría le pertenece a mi persona, y la titularidad serán compartidos con el Instituto Tecnológico Superior “ Luis Arboleda Martínez “ y “Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas de la Escuela Superior Politécnica del Litoral CENAIM – ESPOL “, de acuerdo a lo que dispone la ley de propiedad intelectual.

Manta, 18/11/2021

Atentamente.



JULETZY ANDREINA REYES AGUILAR

CI. 131453387-6

AUTORÍA

Yo Reyes Aguilar Juletzy Andreina, con CI # 1314533876, soy responsable de las ideas, doctrinas (enseñanzas) y resultados expuestos en esta Tesis de grado, y el patrimonio intelectual de la misma pertenecen al Instituto Superior Tecnológico Luis Arboleda Martínez.

A handwritten signature in blue ink, reading "Juletzy Reyes", enclosed within a blue oval scribble.

JULETZY ANDREINA REYES AGUILAR

CI. 131453387-6

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada:

A mi madre Irene Aguilar quien, con su amor, paciencia, consejos y más que nada esfuerzo me ha permitido llegar a cumplir un sueño más, gracias mamá, por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo, valentía, fe y perseverancia, por nunca dudar de mí, aunque yo misma lo hiciera, gracias por ser luz en mi vida.

A mi eterno Ángel, mi padre Robert Reyes por ser mi guía, durante el camino recorrido hasta el día de hoy.

A la persona que a sido como mi padre desde hace muchos años, Baldomero Macias, por su cariño y por siempre brindarme su apoyo.

A mis hermanos Bryan, Robert y Norbelin por su ayuda y apoyo incondicional, durante todo este proceso, aun siendo a la distancia nunca me dejaron sola.

Se la dedico a ustedes familia, porque con su amor, oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona, me dieron fuerzas para seguir adelante y de una u otra forma me acompañaron en todo momento.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto Tecnológico Superior Luis Arboleda Martínez (ITSLAM) porque en sus aulas y junto a sus docentes me formé de modo integral como persona y futura profesional con principios y valores, a la Coordinadora de la Carrera de Tecnología Superior en Acuicultura, la Blga. María Guadalupe Bravo Montesdeoca, por su dirección, enseñanza y paciencia ya que también hizo parte de este proceso como mi tutora.

Mi profundo agradecimiento a el Centro Nacional De Acuicultura e Investigaciones Marinas de la Escuela Superior Politécnica De Litoral (CENAIM- ESPOL), a el Director, señor Stanislaus Albert Sonnenholzner Schodl, Ph.D, y todo el personal que lo conforma por confiar en mí, abrirme las puertas y permitirme realizar todo el proceso investigativo dentro de este prestigioso centro. De igual manera, mis agradecimientos a el personal del área de moluscos, por su paciencia, ayuda y amistad.

Quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento a mi tutor, Blgo. Daniel Fortunato Rodríguez Pesantes Ms.C quien, con su dirección, valioso conocimiento, enseñanza y colaboración me permitió el desarrollo de este trabajo e hizo que pueda crecer más como profesional.

Al igual quiero expresar mi especial agradecimiento a mi familia, Irene, Baldomero, Bryan, Jenny, Robert, Daniela, por su amor, consejo, ayuda, confianza, compañía y por estar pendiente de mi desarrollo como profesional. A mi compañero y amigo Marcelo Macias por su colaboración, paciencia, y compañía en este proceso de titulación.

RESUMEN

Anadara tuberculosa es un molusco bivalvo que habita en manglares en la región oeste del Pacífico Tropical, actualmente su extracción representa una gran actividad económica, en la pesquería artesanal de Ecuador. Lastimosamente, no se han implementado cultivos experimentales documentados en laboratorio que permitan develar el desarrollo temprano, con características específicas para producir semillas masivas.

El objetivo a investigar fue evaluar la ingestión y digestión mediante microscopia epifluorescente de 7 especies de microalgas en el cultivo larvario y post larvario temprano de *Anadara tuberculosa*, en laboratorio. Para esto, se extrajeron reproductores de manglares de la isla Puna, provincia de Guayas-Ecuador, con longitud entre 45 mm, altura 34 mm y promedio de masa húmeda de 13,76 g, fueron trasladados al CENAIM en un contenedor isotérmico. El desove se consiguió mediante estímulos térmicos ($\pm 10^{\circ}\text{C}$ por 3-4 ocasiones). Larvas iniciales D se obtuvieron en 18 horas post-fertilización (PF). Las dietas mostraron desempeños diferentes en las larvas, esto fue evidente a partir del día 13 PF cuando por deficiencia nutricional se observaron mortalidades en los tratamientos *Tetraselmis chui* y *Thalassiosira* sp, mientras que *Pavlova lutheri* presentó mortalidad total el día 15 PF.

Las dietas en las que se observó mejor desempeño presentando mancha ocular fueron: *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros muelleri*, *Tisochrysis lutea* y *Chaetoceros calcitrans*.

Luego, se evaluó el éxito en el asentamiento, utilizando las dietas; *C. gracilis*, *C muelleri*, *C. calcitrans*, *T lutea*, dietas que mostraron mejor rendimiento con larvas pediveliger viables. Finalmente, estas larvas tuvieron un mayor porcentaje de asentamiento con la dieta

compuesta de *C. gracilis* con un 397.1 ± 1.1 y *C. muelleri* 394.3 ± 1.5 μm , respectivamente fueron las mejores, aunque no fueron significativamente diferentes; y las dietas *C. calcitrans* y *T. lutea* con 308.3 ± 11.2 y $304.1 \pm 5,4$ μm respectivamente las de peor desempeño (con igualdad estadística).

Abstract

Anadara tuberculosa is a bivalve mollusk that inhabits mangroves in the western region of the Tropical Pacific, currently its extraction represents a major economic activity in the artisanal fishery of Ecuador. Unfortunately, no documented experimental cultures have been implemented in the laboratory to unveil the early development, with specific characteristics to produce massive seeds.

The objective of the research was to evaluate the ingestion and digestion by epifluorescent microscopy of 7 species of microalgae in larval and early post larval culture of *Anadara tuberculosa*, in the laboratory. For this, broodstock were extracted from mangroves of Puna Island, province of Guayas-Ecuador, with length between 45 mm, height 34 mm and average wet mass of 13.76 g, were transferred to CENAIM in an isothermal container. Spawning was achieved by thermal stimulation ($\pm 10^{\circ}\text{C}$ for 3-4 occasions). Initial D larvae were obtained at 18 hours post-fertilization (FP). The diets showed different performances in larvae, this was evident from day 13 FP when, due to nutritional deficiency, mortalities were observed in the treatments *Tetraselmis Chui* and *Thalassiosira sp.* while *Pavlova Lutheri* presented total mortality on day 15 FP.

The diets with the best eye spot performance were: *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros muelleri* *Tisochrysis lutea* and *Chaetoceros calcitrans*.

Then, settlement success was evaluated, using the diets; *C. gracilis*, *C. muelleri*, *C. calcitrans*, *T. lutea*, diets that showed better performance with viable pediveliger larvae. Finally, these larvae had a higher settlement percentage with the diet composed of *C. gracilis* with 397.1 ± 1.1 and *C. muelleri* 394.3 ± 1.5 μm , respectively were the best,

although they were not significantly different; and the diets *C. calcitrans* and *T. lutea* with 308.3 ± 11.2 and 304.1 ± 5.4 μm respectively were the worst performers (with statistical equality).

INDICE

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE REVISIÓN Y EVALUACIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
CERTIFICADO DEL TUTOR Y COTUTOR	3
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS	5
AUTORÍA.....	6
DEDICATORIA.....	7
AGRADECIMIENTO	8
RESUMEN.....	9
Introducción	19
Antecedentes	22
Planteamiento del problema.....	28
Justificación	29
Objetivos	31
Objetivo general.	31
Objetivos específicos.	31
Hipótesis.....	31
Marco teórico	32
Generalidades de los bivalvos	32
A. tuberculosa: aspectos morfológicos	33

	14
Taxonomía de A. tuberculosa (Sowerby 1988)	36
Reproducción	37
Estado poblacional de A. tuberculosa	39
Marco referencial	41
Ingestión y digestión mediante microscopia epifluorescente	42
Asentamiento	43
Materiales y métodos	45
Ubicación	45
Desinfección de la sala experimental	45
Microalgas	46
Inducción al desove	49
Evaluación de dietas en el cultivo larvario	52
Caracterización del proceso de ingestión y digestión por microscopia de epifluorescencia	54
Evaluación de dietas en la etapa de asentamiento	55
Análisis estadístico	57
Resultados	58
Evaluación del proceso de ingestión y digestión mediante la microscopia epifluorescente	58
Evaluación de dietas en el cultivo larvario	58

Supervivencia	60
Tasa de crecimiento diaria	62
Nota: Tasa de crecimiento diaria (μm) durante el cultivo larvario, alimentado con siete dietas mono-algales	62
Evaluación de dietas en la etapa de asentamiento, crecimiento y asentamiento de larvas pediveliger.	63
Discusión	65
Conclusiones	69
Recomendaciones	69
Referencias	70
Anexos	82

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de Extracción en los principales puertos de Ecuador	26
Tabla 2. Nombres comunes de acuerdo a su distribución.....	36
Tabla 3. Meses de mas alta de madurez gonadal en su distribución geográfica.....	38
Tabla 4. Tamaño y características de las microalgas evaluadas	44
Tabla 5. Etapas del proceso de ingestión y digestión en glándula digestiva de larvas.	54
Tabla 6. Promedio de longitud (μm) de <i>A.tuberculosa</i>	57
Tabla 7. Longitud (μm) y desviación estándar de las dietas.....	60
Tabla 8. (TCD). Tasa de crecimiento diaria. (TCT) Tasa de crecimiento total del cultivo y la tasa de asentamiento representada en (%) con su respectiva desviación estándar.....	64

INDICE DE ILUSTRACIÓN

Ilustración 1. Reproductor de <i>A. tuberculosa</i>	34
Ilustración 2. Sala experimental	43
Ilustración 3. Conteo de microalgas	46
Ilustración 4. Reproductores de <i>A. tuberculosa</i>	47
Ilustración 5. Metodos profilacticos de <i>A. tuberculosa</i>	48
Ilustración 6. Inducción al desove.....	49
Ilustración 7. Proceso de recambio y observaciones por microscopio y mediciones con el programa iWork.	50
Ilustración 8. Sala experimental y proceso de recambio y siembra de las larvas.....	52
Ilustración 9. Larvas de <i>A. tuberculosa</i> analizadas por microscopia epifluorescente.	54
Ilustración 10. Crecimiento en la longitud durante el cultivo larvario de <i>A. tuberculosa</i>	55
Ilustración 11. El porcentaje de supervivencia de las larvas en base a las siete dietas evaluadas.....	57
Ilustración 12. Tasa de crecimiento diaria (μm) durante el cultivo larvario	58

ABREVIATURA

CENAIM: Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas.

ESPOL: Escuela Superior Politécnica del Litoral.

PF: Post-Fertilización.

FAO: Food and Agriculture Organization.

CPUE: Captura por unidad de esfuerzo.

INP: Instituto Nacional de Pesca.

UPS: Unidades Prácticas de Salinidad.

TCD: Tasa de Crecimiento Total.

TCT: Tasa de Crecimiento Total.

mm: Milímetro

Introducción

Según cifras de la FAO los desembarques mundiales de productos pesqueros procedentes de aguas marinas y continentales alcanzaron una cifra del orden de 92 millones de toneladas en el año 2012, de la cual alrededor del 88% corresponde a aguas marinas y estuarinas. Estos niveles de producción se han mantenido relativamente estables desde mediados de la década de 1990. Sin embargo, si se excluye los desembarques reportados de aguas continentales, existe una tendencia a la disminución de los desembarques (FAO, 2014). En gran medida la sobreexplotación de los recursos pesqueros es la principal causa de la tendencia decreciente en los desembarques de aguas estuarinas a nivel mundial.

La sobreexplotación de las especies es en la actualidad un problema por resolver, en nuestro país la situación es homóloga a la tendencia global. *A. tuberculosa* es un molusco bivalvo que habita en manglares, fangosos arcillosos o limo-arcillosos tiene una amplia distribución que comprende desde la Laguna Ballena en México, hasta Tumbes, Perú (Mackenzie, 2001). En las costas ecuatorianas, se localizan desde el norte (Palma real, San Lorenzo, Tambillo, Limones); al sur de Muisne en la provincia de Esmeraldas; Bahía de Caráquez en la provincia de Manabí; Puerto El Morro e isla Puna en la provincia del Guayas y el Archipiélago de Jambelí en la provincia El Oro (Mora, 1990).

El agotamiento del recurso concha prieta ha conducido a desarrollar proyectos de producción de semilla en condiciones de laboratorio en varios Países

como por ejemplo México (Robles et al., 1999), El Salvador (Vásquez et al., 2009) y Perú (Diringer et al., 2012). En Nicaragua se reportan cultivos de engorde de juveniles de *A. tuberculosa* (Espinoza et al., 2019), mientras que Panamá comenzó con este proyecto de engorde en el año 2009 (Cordero et al., 2017). En Costa Rica y Guatemala se han evaluado cultivos en zona de manglares. En El Salvador también se implementaron cultivos tanto en laboratorio y cultivos de engorde, donde se generó el 2007 una guía para cultivo de esta especie (Rivero, 2009).

Los cultivos en el Pacífico colombiano se han realizado mediante la técnica de encierros o en suspensión dentro de cajas (Cantera, 1987). Así mismo, se han realizado cultivos de fondo, los cuales no fueron viables por la afectación de depredadores (*Thais kiosquiformis* y *Callinectes* spp) (Velasco y Barros 2008).

En Ecuador se han realizado ensayos de producción de semilla con fines de repoblamiento y fomento para seguridad alimentaria. (Subsecretaria de Acuicultura, 2014). La concha prieta es un recurso importante para la subsistencia de varias familias de comunidades costeras, por ello se considera de importancia comercial, puesto que sostiene una de las principales pesquerías artesanales de la zona costera provista de manglar, constituyendo una substancial fuente para las comunidades humanas del litoral. Los volúmenes de extracción han cubierto tanto de las necesidades familiares como las del comercio local (Rivero, 2009; Espinosa et al., 2010).

La extracción anual en otros países de la región se sitúa alrededor de un millón de docenas en Costa Rica y medio millón de docenas en El Salvador. (Lazarich et al., 2009). En Nicaragua la extracción total de las dos especies de

Anadara sp, *similis* y *tuberculosa* es de aproximadamente 2.5 millones de docenas por año, divididas en algo más de un millón de docenas de *A. similis* y 1.4 millones de docenas de *A. tuberculosa* (Lazarich et al., 2009).

En la actualidad, debido a la falta de un control efectivo que permita el cumplimiento de las medidas regulatorias estatales (veda extractiva por reproducción y veda al tamaño), la pesquería artesanal del recurso está siendo afectada por la sobreexplotación, siendo uno de los indicadores, el incremento del porcentaje de conchas pequeñas, menor a 45 mm de longitud de valva no reglamentaria (Rendón et al., 2004).

Para la producción acuícola la alimentación depende de la alimentación con microalgas que son la base de la nutrición de la mayoría de especies que se cultivan, ya sea en el caso de peces (primeros estadios larvarios), crustáceos (estadios larvarios) y especialmente moluscos bivalvos (Morgan et al., 2007). La especie *Chaetoceros muelleri* es utilizada como alimento por su adecuada proporción de ácidos grasos insaturados en los cultivos de crustáceos y bivalvos (Benemman, 1992).

Varios reportes demuestran que las microalgas son la principal fuente de alimentación de moluscos filtradores (Knauer y Southgate, 1997; Spolaore et al., 2006; Brennan y Owende, 2010; Harun et al., 2010; Mendoza et al., 2011). De todas ellas, los géneros más comunes para alimentación son *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* y *Thalassiosira* (Hammouda et al., 1995; Knauer y Southgate, 1997; Spolaore et al., 2006).

Antecedentes

La sobreexplotación de los recursos naturales cada vez es más notoria a tal punto de que muchas especies se encuentran en estado crítico, debido principalmente a la sobrepesca y a los daños causados en el hábitat de estas especies (FAO, 2018). La acuicultura surge como una alternativa económicamente viable y ambientalmente sostenible debido a la posibilidad de operación a gran escala, contribuyendo en la reducción del esfuerzo pesquero (Pipitone et al., 2000).

La acuicultura en los países de América Latina se ha extendido de manera continua en los últimos 20 años, relacionándose particularmente con camarones en Ecuador y México, y con salmones y bivalvos en Chile. En el año 2005, de acuerdo con los informes estadísticos suministrados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), se produjeron aproximadamente 130000 toneladas de moluscos en esta región, mostrando que el interés por cultivar bivalvos está aumentando entre los industriales del sector pesquero (FAO, 2007).

En Ecuador, en la mayoría de los puertos pesqueros se refleja la falta de planes de manejo por recurso, que vayan enfocados a gestionar un uso sostenible de los mismos. Esta carencia va de la mano con la falta de información científica que oriente y/o sustente su explotación; en este sentido, es probable que algunos recursos estén en fase de sobrepesca o incluso en colapso poblacional. Un ejemplo

tangible es la disminución alarmante del recurso *Spondylus* (*Spondylus limbatus=calcifer* y *Spondylus crassisquama=princeps*) (Loor et. al., 2016), siendo este caso una clara evidencia de la sobrepesca. Algo similar ocurrió en los primeros años de la pesquería de pepinos de mar (*Isostichopus fuscus*), en donde las malas decisiones referentes al manejo pesquero, principalmente con el establecimiento de cuotas de captura por encima de su capacidad de regeneración natural, o aperturas de la pesquería (Castrejón et al., 2008).

Los mayores conflictos se relacionan a la elevada captura de individuos jóvenes y a la falta de certeza sobre el estado de sus poblaciones. Otro factor de importancia, aterrizando en el recurso concha prieta y otros recursos pesqueros de los ecosistemas de manglar, es la disminución del hábitat. En Ecuador, la pérdida de áreas de manglar por efectos de la tala ha sido muy significativa (Beitl, 2014). Aunque a nivel regional la concha prieta ha sido declarada como agotada, producto de la sobreexplotación (Silva y Bonilla, 2001; Espinosa et al., 2010; Espinosa, 2011), esto muchas veces viene acompañado de un patrón de pesca (mortalidad por pesca en función de la edad o talla), en el cual se explota predominantemente individuos de pequeñas tallas o juveniles no comerciales < 45 mm longitud total. Lo cual no permite que los organismos alcancen las tallas óptimas de captura y puede incidir negativamente sobre el éxito reproductivo, por la disminución de la fracción adulta de la población. (Beitl, 2014).

A escala global el desarrollo del cultivo de moluscos posee un gran potencial para contribuir al alivio de la pobreza, en la medida en que contribuye a la seguridad alimentaria de las comunidades como fuente económica. Además de

generar empleo y fuentes de ingreso alternativas a la pesca de extracción (Rivero, 2009) *A. tuberculosa* es el molusco bivalvo de mayor comercialización en la región, representando gran parte de la actividad económica dentro de la pesquería artesanal con una gran demanda en el ámbito regional y nacional. (Azabache, 2016).

En algunos países del Pacífico americano como México, Honduras, El Salvador, Ecuador y Perú, existen casos documentados de disminución en la población de *A. tuberculosa*. (Mackenzie, 2001).

Se conoce además información relacionada con la pesquería, (Flores, 2002; Flores, 2010; Flores y Licandeo, 2010; Flores, 2011). condición reproductiva (Prado-Carpio, et al, 2020), experimentos de crecimiento en canastas sumergidas. (Flores, 2017), biometría y análisis de la estructura poblacional (Mora y Moreno, 2008) parámetros de crecimiento y mortalidad natural (Flores, et al, 2014).

En el Ecuador, estudios técnicos realizados en el cantón Muisne y Archipiélago de Jambelí, entre el Instituto Nacional de Pesca (INP) y El Programa de Manejo de Recursos Costeros, resaltan la importancia de este recurso, donde indican que estas áreas aportaron en 1998 cerca del 99.4% de los desembarques nacionales; acentuando la tendencia decreciente, con respecto a estudios de años anteriores (Santos y Moreno, 1999).

Según datos reportados por la Dirección General de Pesca, durante el periodo 1980-1987, se desembarcaron conchas sobre las 3000 a 4000 toneladas métricas hasta el año 1985, para luego producirse un descenso a partir de 1986 y 1987 (Mora 1989). Los desembarques en 1998 mostraron una tendencia decreciente

respecto a 1997, con un descenso estimado del 73,8% anual en el Archipiélago de Jambelí y del 27,4% en el estuario del Río Muisne. (Santos y Moreno 1999).

La tendencia decreciente de los desembarques de esta pesquería ha sido señalada por (Santos y Moreno 1999) y (Mora et al., 2009); situación que se ve reflejada por el aumento del esfuerzo y la disminución del número de conchas por conchero desde 2004 y en el 2008. Además, denotado también por el elevado porcentaje de conchas extraídas por debajo de la talla legal (Mora et al., 2009).

Un análisis de los principales indicadores pesqueros Captura por Unidad de Esfuerzo (CPUE), fue realizado en base a información obtenida del seguimiento de la pesquería de la concha prieta durante el año 2009 en los sitios de desembarque más importantes, las zonas de mayor explotación se encuentran al norte y sur del país; en casi todos los esteros de la Reserva Ecológica Manglares Cayapas-Mataje, Estuario del Río Muisne, Estero El Morro y Archipiélago de Jambelí, donde están localizados los principales puertos de desembarque como San Lorenzo, Muisne, El Morro, Puerto Bolívar, Puerto Jelí y Hualtaco (Mora y Moreno, 2009).

En la provincia de Esmeraldas se registró la participación de 321 recolectores de concha (esfuerzo pesquero) en el Puerto de San Lorenzo, la (CPUE) o número de conchas promedio por recolector estuvo en 100 conchas/pescador/pesca mientras que en el Puerto de Muisne el esfuerzo pesquero fue estimado en 75 concheros y el promedio de (CPUE) fue de 120 conchas/pescador/pesca. (INP, 2020).

En la provincia de El Oro, se registro durante el monitoreo de la pesquería 464 recolectores de concha, distribuidos: Puerto Bolívar 140; Puerto Jelí 45 y Hualtaco 279. Mientras que la CPUE o número de conchas promedio por recolector estuvo en 173 conchas/pescador/pesca, distribuidas en Pto. Bolívar 170; Pto. Jelí 150 y Hualtaco 200 conchas. (INP, 2020). La serie de datos más completa y confiable de desembarques de conchas en Ecuador corresponden al monitoreo de la pesquería, a nivel nacional, por parte del INP durante el período 2004-2011 (Mora y Moreno, 2009; Mora et al. 2009, 2010, 2011). Para la Provincia de El Oro los datos del INP cubrieron 10 meses del año 2004, 4 meses del año 2005, 8 meses del 2008, 9 meses del 2009, los años 2010 y 2011 completos, y 4 meses del año 2012. (Mora et al., 2009). A pesar de no contar con registros estadísticos continuos de varios años sobre volúmenes de desembarques, esta pesquería ha sostenido una actividad extractiva constante a través del tiempo. (Cáceres, 2019).

Tabla 1. *Datos de Extracción en los principales puertos de Ecuador.*

Año	Puerto	# Concha extraída	CPUE	Autor (s)
2004	Bolívar	5.809.836	156	Mora et al. (2009)
	San lorenzo	11.062.084	284	
	El Morro	488.749	106	
	Muisne	2.223.236	129	
	Jelí	1.594.976	160	
	Hualtaco	4.907.101	119	
2005	Bolívar	1.787.720	187	Mora et al. (2008-2009)
	San lorenzo	6.152.953	170	
	El Morro	168.226	157	
	Muisne	525.882	108	

	Jelí	676.686	167	
	Hualtaco	1.437.126	135	
2008	Bolívar	3.445.869	119	Mora et al. (2009)
	San lorenzo	6.667.617	320	
	Muisne	1.132.711	100	
	Jelí	1.314.434	134	
	Hualtaco	5.959.595	115	
2009	Bolívar	2.000.000	102	Mora et al. (2010)
	San lorenzo	8.000.000	122	
	Muisne	4.000.000	105	
	Jelí	944.000	110	
	Hualtaco	4.000.000	95	
2010	Bolívar	3.058.926	106	Mora et al. (2011)
	El Morro	556.879	115	
	Muisne	1.181.922	120	
	Jelí	1.318.436	112	
	Hualtaco	5.636.785	97	
2011	Bolívar	4.124.818	127	Flores et al. (2011)
	El Morro	727.425	115	
	Jelí	1.461.873	128	
	Hualtaco	6.054.623	103	
2012	Bolívar	4.234.564	100	Vera et al. (2018)
	El Morro	703.487	122	
	Jelí	2.211.553	115	
	Hualtaco	5.602.721	150	
2013	Bolívar	4.359.003	110	Moreno, (2013)
	San lorenzo	15.806.289	145	
	El Morro	685.166	126	
	Muisne	1.654.339	116	
	Jelí	4.035.477	126	
	Hualtaco	6.730.857	125	
2014	San lorenzo	24.036.205	188	Cáceres, (2019)
	Muisne	2.674.569	146	

Nota: Tabla modificada en base a los estudios que se encuentran citados.

Planteamiento del problema

Es importante destacar, que es de gran beneficio conocer qué especie de microalgas puede la larva ingerir y aprovecharlo nutricionalmente ya que se puede evitar alimentarlos con microalgas que no serán consumidas y que puede afectar en el proceso del cultivo.

Las microalgas poseen un número de atributos claves para ser usadas en acuicultura, como el tamaño y forma de la célula, una fácil ingestión y digestión, la composición bioquímica y la ausencia de toxinas (Brown 2002).

El hecho de que especies particulares de microalgas se ingieren no significa necesariamente que se digieran (Sowerby, 1842), ya que puede o no aprovechar nutricionalmente estas microalgas en su desarrollo larvario.

Por esto, es necesario encontrar un alimento que le favorezca a *A. tuberculosa* para que tenga las condiciones adecuadas y de esta manera mejorar la calidad nutricional y la reserva de estos moluscos previo al proceso de asentamiento.

Justificación

En el Ecuador, la actividad extractiva de *A. tuberculosa* se desarrolla sin una adecuada planificación, lo que ha puesto en riesgo la estabilidad, conservación y productividad de la especie; adicionalmente, el crecimiento demográfico en la zona de extracción y en consecuencia el incremento en el número de concheros, ha provocado una mayor presión del recurso. (Díaz y Melo, 2011). Por otra parte, la falta de información ontogénica de la concha negra es un gran impedimento para el desarrollo sustentable de la misma. Sin embargo, la estadística disponible sobre la pesquería de esta concha ha conducido a determinar el estado sobreexplotado de *A. tuberculosa*.

La actual explotación del recurso debe convertir los conceptos de evaluación y manejo en una vía necesaria para lograr el objetivo del desarrollo sustentable de esta especie, ya que es un recurso pesquero de gran importancia para el Ecuador. Una de las posibles alternativas que ayuden a mantener este importante recurso, es su extracción racional y responsable, implementando medidas que regulen su explotación sostenible. Actualmente es posible emplear la acuicultura como una herramienta válida que permita recuperar la densidad de este molusco. Ello permitiría a través del repoblamiento dirigido conseguir una menor dependencia de animales silvestres, como lo practicaron en el Santuario Nacional los Manglares de Tumbes (Mendoza y Peralta, 2003).

La alimentación de los bivalvos es dependiente a las microalgas y micro partículas, pero no todas las microalgas pueden ayudar a que estos bivalvos se desarrollen de manera eficiente (Vivanco et, al., 2014). Ello obviamente incide en el crecimiento y la supervivencia larval, ya que la calidad nutricional del alimento suministrado es un factor crítico que determina la calidad y salud de las larvas y contribuye al éxito de las operaciones de acuicultura (Brown, 2002).

La fase de asentamiento comprende: conducta de asentamiento, fijación y metamorfosis (Bonar et al., 1990), la misma que puede prolongarse y cuyo éxito depende si las larvas competentes encuentran un sustrato y estímulo adecuado para el asentamiento (Bayne, 1975). Existen factores ambientales que influyen en el asentamiento, los cuales varían entre las especies, tales como flujo de agua, presión, temperatura, luz, bacterias, microflora, microfauna y aspectos físico-químicos del sustrato basal (tipo de material, porosidad, textura, color, energía libre superficial). (Zimmer y Tamburri, 1994).

Por lo anteriormente documentado, la presente investigación se enfocará, en obtener un alimento eficaz, el cual deberá complementar todas las necesidades nutricionales de esta especie en etapa temprana, así con ello poder obtener un protocolo para la producción de semillas de forma masiva y/o proponer repoblaciones para evitar la desaparición del recurso.

Objetivos

Objetivo general.

Determinar que especies de microalgas favorecen en el desarrollo larvario de *Anadara tuberculosa* y definir una dieta adecuada para optimizar el desempeño en el asentamiento.

Objetivos específicos.

- Evaluar 7 especies de microalgas para definir su eficiencia de acuerdo con los requerimientos nutricionales tempranos de *A. tuberculosa*.
- Determinar la ingestión y digestión de *A. tuberculosa* en base a las dietas.
- Determinar, tasa de asentamiento de acuerdo a la variable dieta en las larvas de concha prieta.

Hipótesis

1.- Las larvas de *A. tuberculosa* alimentadas con microalgas flageladas y diatomeas tendrán un mejor desarrollo y supervivencia.

2.- Las larvas de *A. tuberculosa* con una alimentación adecuada tendrán un mayor porcentaje de supervivencia en la fase de asentamiento.

3.-El tipo de microalgas que consumen afecta al crecimiento y supervivencia de *A. tuberculosa*.

Marco teórico

Generalidades de los bivalvos

Los bivalvos constituyen una de las seis clases dentro del *Phylum molusca*, su principal característica es poseer una concha dividida en dos valvas (que encierran las partes blandas) unidas por una charnela, que cubren total o parcialmente el cuerpo del organismo (Gosling, 2002). Otras características importantes son: estar comprimidos lateralmente y poseer branquias o octenidios bien desarrollados y especializados para la alimentación y la respiración. Pueden vivir enterrados en fondos blandos de arena, lodos o combinados, también se pueden encontrar como habitantes sésiles o a superficies rígidas como acantilados rocosos, algunas especies perforan el sustrato roca o madera. (Morris, 1966).

Tienen un sin fin de formas y colores según la especie de la que se trate. Los bivalvos no tienen cabeza ni cola bien definidas, aunque se emplean los mismos términos anatómicos que se usan para describir estas partes en otros animales. El umbo o zona de la charnela, donde se unen las valvas, es la parte dorsal del animal y la región en el lado opuesto es el margen ventral. En especies que cuentan con sifones (almejas), el pie se encuentra en posición anterior-ventral y los sifones en la zona posterior. En las ostras la zona anterior está en la charnela y en las vieiras se encuentra dónde están localizados la boca y el pie rudimentarios. (Helm et al., 2006).

El cuerpo se encuentra comprimido lateralmente, la cabeza muy reducida y no tienen rádula, ya que se alimentan por filtración. La concha que los recubre externamente está formada por dos piezas, articuladas en posición dorsal, ya que se cierra gracias a las contracciones de los músculos abductores, debido a que la elasticidad del ligamento que une las valvas las mantiene normalmente abiertas.

Presentan un pie con forma de hacha, que viene utilizado sobre todo para el anclaje y la locomoción. A los lados de la masa visceral se encuentran las branquias, situadas en la cavidad del manto, y se encuentran muy modificadas, participando en los procesos de captura de los alimentos. El manto de los bivalvos forma como una gran lamina de tejido que se extiende por debajo de las valvas. El borde presenta tres pliegues: el interno contiene músculos, el intermedio tiene función sensorial y el externo es encargado de secretar la concha.

***A. tuberculosa*: aspectos morfológicos**

Se caracteriza por presentar conchas grandes, ovaladas, gruesas con un promedio de 33 a 37 costillas, los márgenes dorsales son angulados, de color blanco cubierta por un periostraco piloso que va desde café oscuro hasta negro. Posee umbos anchos y prominentes. Los nódulos o tubérculos de las costillas son la razón del nombre de la especie y su área cardinal es angosta. (Lazarich et al., 2009).

Posee umbos anchos y prominentes, los nódulos o tubérculos de las costillas son la razón del nombre de esta especie. El área cardinal en la especie es angosta y puede alcanzar una longitud de 56 mm, altura 42 mm y diámetro de 40 mm (Sowerby, 1833).

Según Sanclement (2008), la concha se encuentra formada por 3 capas: la exterior constituida por quitina, una capa intermedia de calcita y una interior laminada. Poseen dos lóbulos de tejido llamada manto cuya función es segregar la concha, formando una espaciosa cavidad en torno al cuerpo, sus células precipitan el CaCO_3 (carbonato de calcio) de la sangre para hacer crecer la concha. (Helm et al., 2006).

Ilustración 1. *A. tuberculosa*.



Nota: Reproductor que se utilizó para el desove.

Se alimentan de fitoplancton, materia orgánica del suelo y de partículas en suspensión. Las partículas alimenticias, que en algunos casos miden alrededor de 2-8 μm , son filtradas de las corrientes de agua que pasan entre filamentos (Barnes y Ruppert, 1991).

La alimentación depende exclusivamente de la filtración, en donde absorbe agua, retiene el alimento, y luego expulsa el agua; por esta razón se alimenta principalmente de diatomeas bentónicas, detritus y también pueden ingerir algunos organismos zoo- planctónicos. (Quinteros y Zea, 2012). Cuando sube la marea (pleamar) y el área del manglar se inunda la concha abre las valvas y empieza a comer. Al bajar la marea cierra las valvas y espera la próxima pleamar para volver a comer, posee la capacidad de filtrar hasta 50 litros de agua por día (Quinteros y Zea, 2012).

La madurez sexual se alcanza en individuos entre 23 y 26 mm de longitud total, en el Pacífico colombiano, es considerada una especie hermafrodita protándrica, debido a las diferencias en la proporción sexual entre hembras y machos (Afiati, 2007; Flores y Lincadeo., 2010). El porcentaje de carne por peso es de 18,26%. La especie tiene importancia como fuente de proteínas ya que posee el 61.6% de proteínas, 21.6% de carbohidratos, 8.8% de cenizas, 7.9% de lípidos; el valor calórico fue de 5.2 kcal/g. (Cruz, 2012). Se puede concluir que *A. tuberculosa* presenta valores nutricionales óptimos para el consumo humano, por su bajo contenido de grasa y su aceptable contenido proteico (Cruz et al., 2012).

Taxonomía de *A. tuberculosa* (Sowerby 1988)

La taxonomía es en base a lo publicado por (Lizarich, 2009)

Reino: Animalia

Filo: Mollusca

Clase: Bivalvia

Orden: Arcoida, Prionodonta o Eutaxodonta

Familia: Arcidae

Género: *Anadara*

Especie: *tuberculosa*

Nombre científico: *Anadara tuberculosa*

Nombre común: Concha prieta, negra, curil, chucheca

Tabla 2. *Nombres comunes de A. tuberculosa* de acuerdo a su distribución.

País	Denominaciones	Autor (es)
Ecuador	Concha prieta	Mora et al. (1992)
México	Pata de mula	López-Rocha et al. (2012)
Costa Rica	Piagua	Lucero et al. (2008)
Colombia	Piagua	Rivero et al. (2009)
Panamá	Chucheca-concha prieta	Lizarich, (2009)
Perú	Concha prieta	Alemán et al. (2010)
Nicaragua	Concha prieta	Lizarich, (2009)
El salvador	Concha negra- Curil	Rivero et al. (2009)
Honduras	Concha negra	Rivero et al. (2009)
Guatemala	Concha negra	Rivero et al. (2009)

Reproducción

La producción de óvulos y esperma es un proceso denominado gametogénesis, cuyo inicio depende de varios factores, como el tamaño del bivalvo, la temperatura y la cantidad y calidad de alimento que recibe. Existen varios factores ambientales que pueden inducir el desove, de los cuales cabe mencionar, la temperatura, los estímulos químicos y físicos, las corrientes de agua o una combinación de éstos. (Helm et al., 2006).

La presencia de esperma en el agua a menudo estimula el desove de animales de la misma especie. (Helm et al., 2006). *A. tuberculosa* es un bivalvo dioico, es decir, posee sexos separados, con fecundación y desarrollo externo, en consecuencia, el sexaje requiere sacrificar al individuo, sin embargo, el sexo de individuos maduros es fácil de reconocer por el color de los productos sexuales. Estos son de color blanquecino y consistencia pegajosa en los machos y en las hembras son de apariencia granular y color anaranjado. (Mora y Moreno, 2007)

A través de cortes histológicos el ciclo reproductivo se ha definido en 4 estadios de madurez propuesto por Mora y Moreno (2009): Indiferenciado, en desarrollo, maduro y desove. La especie se caracteriza por presentar desoves continuos durante todo el año a lo largo de la costa ecuatoriana, mostrando sus máximos niveles porcentuales de desoves entre febrero y abril, pero con una

marcada variabilidad entre los puertos de desembarque (Mora y Moreno, 2009; Mora et al., 2009; Mora et al., 2010; Mora et al., 2011; Mora et al., 2012)

Mackie (1984) afirma que la temperatura es uno de los factores externos más importantes que influyen en el ciclo reproductivo de los bivalvos. En algunas especies, el desove se inicia cuando la temperatura excede de un nivel crítico característico de 30 °C. Otras investigaciones han demostrado que, en ambientes naturales, los cambios de salinidad, al igual que los de temperatura, producen desoves en bivalvos de zonas tropicales y templadas (Stuardo y Martínez, 1974; Parwadani, 2011), causadas principalmente por stress osmótico (Fong et al., 1995). Según Cruz (1984), la época de desove de *A. tuberculosa* está marcada por altas temperaturas y salinidades del agua.

Tabla 3. *Meses más alta de madurez gonadal en su distribución geográfica.*

País	Meses de maduración sexual	Autor (es)
Ecuador	Noviembre - Febrero	Lamus, (2006)
México	Mayo - Diciembre	Arias et al. (2018)
Costa Rica	Mayo - Septiembre	Lucero et al. (2008)
Colombia	Noviembre - Febrero	Squires et al. (1975)
Panamá	Octubre - Febrero	Días-Madrid, (2018)
Perú	Enero - Junio	Mendoza et al. (2007)
Nicaragua	Abril - Mayo	Susana, (2009)
El salvador	Mayo - Octubre	Galdámez, (2007)

Nota: Tabla modificada en base a los estudios citados.

Estado poblacional de *A. tuberculosa*

Entre los trabajos destinados a conocer las densidades poblacionales en la región del Pacífico, se encuentran los realizados en Colombia (Squires et al., 1975; Bolívar, 1984; Haskoning, 1986; Franco, 1995), México (Baqueiro, 1980), Costa Rica (Campos et al., 1990) y Nicaragua (Lazarich, Rivas y Arguello, 2009).

En nuestro país entre las investigaciones realizadas con la especie se encuentran el de la pesquería de concha en el Archipiélago de Jambelí y Estuario del Río Muisne (*Santos y Moreno 1999; Moreno 2000 y 2001*), reserva Ecológica Manglares Cayapas Mataje (REMACAM), en la misma área Flores (2002) estudió la biometría, edad y crecimiento (*Moreno 2000 y 2001*), llevando este estudio a otros sitios el país (*Mora y Moreno, 2004-2013*)

La sobreexplotación de las especies es en la actualidad un problema por resolver, en nuestro país la situación es homóloga a la tendencia global, El agotamiento del recurso ha conducido a proyectos de producción de semilla en condiciones artificiales de laboratorio en varios países como México (Robles et al., 1999), El Salvador (Vásquez et al., 2009), Perú (Diringer et al., 2012). En Ecuador también se han realizado ensayos de producción de semilla (Subsecretaria de Acuicultura, 2014) con fines de repoblamiento y fomento para seguridad alimentaria (Rivas et al., 2018).

En Nicaragua se reportan cultivos de engorde de juveniles de *A. tuberculosa* (Espinoza et al., 2019), mientras que Panamá comenzó con este proyecto de

engorde en el año 2009. (Cordero et al., 2017). Crecimiento y engorde de concha prieta (*A. tuberculosa*) en corrales en los manglares de la isla Payana. En Costa Rica y Guatemala se han evaluado cultivos en zona de manglares. En El Salvador también se implementaron cultivos tanto en laboratorio y cultivos de engorde, donde se generó el 2007 una guía para cultivo de esta especie (Rivero, 2009).

Los cultivos en el Pacífico colombiano se han realizado mediante la técnica de encierros o en suspensión dentro de cajas (Cantera, 1987). También se han realizado cultivos de fondo, los cuales no son viables ya que son altamente afectados por el gasterópodo. *Thais kiosquiformis* y por *Callinectes spp.* (Velasco y Barros., 2008).

Marco referencial

Existen muchos estudios enfocados en determinar el tipo de alimento indicado para moluscos, estos estudios se han realizado con especies como *Pteria sterna*, (Erika M, et, al, 2004), *Crassostrea virginica* (Babinchak y Ukeles, 1979), *Mytilus edulis* y *Crassostrea gigas* (Rangel, 1984), *Pecten maximus* (Le Pennec y Rangel-Dávalos, 1985) y *A. ventricosus-circularis* (Lora-Vilchis y Maeda-Martínez, 1997).

Donde se pudieron deducir que *T. galbana*, *P. lutheri* y *Chaetocero calcitrans* son las microalgas con mejores estándares de nutrición durante los primeros días de desarrollo ya que cumplen con las propiedades nutricionales para ser utilizadas como alimento en acuicultura (Gouda et al. 2006; Collantes y Oliva en prensa), a diferencia de otras especies como las diatomeas: *C. gracilis*, *C. calcitrans*, *C. muelleri*, o algas verdes como *Thalassiosira weissflogii*, *Dunaliella salina*, *T. tetrathele* y *T. suecica* las cuales son recomendada en dietas mixtas, ya que genera una deficiencia nutricional si se usa por separados. (Martínez-Fernández et al., 2006; Velazco-Blanco, 1997; Sánchez-Lazo y Martínez-Pita, 2014; Cerón-Ortiz et al., 2009; Rico-Villa et al., 2006).

La capacidad de los organismos de ingerir, digerir y asimilar las microalgas depende también de variables como el tamaño y la morfología, y así puedan satisfacer las necesidades nutricionales de estos. (Coutteau y Sorgeloos 1992). En base a lo expuesto, estudios han demostrado que no todas las especies de microalgas se ingieren o digieren fácilmente por larvas bivalvas (Le Pennec y Rangel-Dávalos, 1985; Lora-Vilchis y Maeda-Martínez, 1997). Por lo tanto, la detección

de especies de microalgas con alto valor nutricional es una prioridad para la investigación de los cultivos de moluscos en los cultivos.

De acuerdo a estos diferentes estudios y métodos realizados se puede perseguir una investigación, con el fin de generar nuevos resultados y conocimientos de la cadena productiva de la especie *A. tuberculosa*, para que estos puedan ser utilizados en el manejo de esta especie en laboratorios para su sostenibilidad.

Ingestión y digestión mediante microscopia epifluorescente.

Se han propuesto varios métodos para evaluar la ingestión y la digestión de las algas unicelulares que sirven como alimento para las larvas, pero para Lucas y Rangel (1981), pocos métodos son completamente satisfactorios. Como las observaciones de alimentos, en microscopía fotónica en secciones semi-delgadas o en micro transmisión electrónica scopy (Masson, 1975) da buenos resultados, desafortunadamente en mucho tiempo. Al final de la última década, Babinchak y Ukeles (1979) propusieron un nuevo método basado en la observación por medio de microscopio epifluorescencia a larvas alimentadas o no. El microscopio de epifluorescencia permite observar, en el tracto digestivo larvario, la fluorescencia natural de clorofila de algas ingeridas. Experimento que resulto con éxito en *Crassostrea gigas* con el autor Lucas y Range1 (1981), luego Range1 (1984), para medir las tasas de ingestión y digestión de cinco algas unicelulares por las larvas de *Mytilus edulis* y *Crassostrea gigas* según la edad de las larvas y la temperatura

del medio ambiente. Varios de estudios relatan que el uso de la microscopia epifluorescente es eficaz en la detección de los procesos de la ingestión y digestión de microalgas por larvas de bivalvos (Lucas y Rangel, 1983; Rangel-Dávalos, 1984).

Asentamiento

El asentamiento supone el paso de la vida planctónica en la columna de agua a la residencia permanente en el sustrato, las larvas de ostras se solían fijar sobre conchas de bivalvos, principalmente conchas de ostras viejas, y se las dejaba crecer sobre la concha en las zonas de cría hasta que los juveniles alcanzaban una longitud de concha de aproximadamente 1 cm, que era cuando se transportaba el material de fijación con los juveniles adheridos a él hasta las instalaciones del productor. (Helm et al., 2006)

El sustrato para la fijación larvaria puede ser de diferente tipo de material, forma y textura, el más tradicional en los años setenta y ochenta, era la alamina de PVC negro (Pérez-Camacho, 1987)

En los cultivos flotantes el material de fijación con los juveniles puede colocarse sobre sogas o cables o líneas de flotadores suspendidas. El método solía ser eficaz para satisfacer de forma fiable las necesidades de semilla para los productores, pero tenía sus desventajas. La desventaja principal era que algunos años se daban fallos en la producción o ésta era insuficiente en las zonas de cría. (Helm et al., 2006). Entre los materiales de uso más común para proporcionar amplias zonas de superficie de fijación se pueden incluir los siguientes: Láminas de PVC ligeramente rugosas, capas de partículas y trozos de conchas que se

preparan moliendo conchas limpias de ostras viejas y esparciéndolas por el fondo de los tanques o bandejas de fijación., varios materiales plásticos, suelen fijarse y adherirse más prolíficamente sobre la superficie sombreada de los materiales de sustrato en los tanques poco profundos. (Helm et al., 2006)

Baltazar et al. (1999) realizó un estudio con *Crassostrea gigas*, donde las mayores fijaciones se presentaron sobre las conchuelas molida, seguido de plástico lijado y en menor proporción en las paredes del tanque de fibra de vidrio y valvas enteras de ostra (Baltazar et al., 1999)

Estudios indican que el proceso de asentamiento en pectínidos, en bolsas con malla de polipropileno y en las bolsas con malla de polietileno (Peña, 2011) Suelen retrasarse dependiendo de las condiciones del sustrato, puede prolongarse o no realizarse si las larvas competentes no encuentran un sustrato y estímulo adecuado para el asentamiento (Crisp, 1974; Bayne, 1975; Sastry, 1979; Tapia et al., 1993)

Materiales y métodos

Ubicación

La investigación se realizó en San Pedro de Manglaralto, en la provincia de Santa Elena-Ecuador, en el centro nacional de acuicultura e investigaciones marinas (CENAIM-ESPOL)

Desinfección de la sala experimental

Se realizó el proceso de desinfección de todas las superficies de la sala (tanques, plásticos cubre tanques y mesas de la sala experimental), con una solución de hipoclorito de sodio, el mismo se preparó tomando 250 mL de cloro comercial (10%) aforándolo luego a 10000 mL. Finalmente fueron enjuagados con agua de mar y agua dulce. Este proceso se repitió después de cada recambio. Para el experimento se utilizaron 21 tanques cilindro-cónicos de 50 L.

Ilustración 2. Sala experimental.



Nota: Sala experimental desinfectada, lista para continuar con la siembra.

Microalgas

Las 7 microalgas a evaluar en este experimento fueron: *Tetraselmis chuii*, *Thalassiosira* sp, *Tisochrysis lutea*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros muelleri* y *Chaetoceros calcitrans*, las cuales fueron facilitadas por el laboratorio de microalgas de CENAIM-ESPOL, cultivadas en medio f/2 (Guillard, 1975), enriqueciendo con metasilicato de sodio al 1% para diatomeas únicamente, Los medios de cultivo se prepararon con agua de mar filtrada a 0,45 μm e irradiadas con luz UV y en condiciones de luz fluorescente permanente (47-67 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y aireación constante. La temperatura y salinidad de los cultivos fue de 20 ± 0.5 °C y de 34 ± 0.1 g L⁻¹, respectivamente.

Tabla 4. *Tamaño y características de las microalgas evaluadas.*

Tamaño celular		
Especie	(μm)	Características
<i>C. gracilis</i>	6,6 \pm 0,76	Diatomea solitaria es de forma rectangular.
<i>C. muelleri</i>	7,0 \pm 1,22	Célula rectangular a menudo solitaria ligeramente silicificada.
<i>C. calcitrans</i>	8,0	Presentar plastos marrones o amarillos fucoxantina o beta-caroteno y están envueltas cubiertas de sílice.

<i>T. lutea</i>	5,0±0,55	Dos flagelos, de forma redonda-ovalada. Pared celular cubierto de escamas de polisacárido.
<i>P. lutheri</i>	5,0±0,65	Célula esférica con dos flagelos y pared celular.
<i>Thalassiosira</i> sp.	4,0-8,0	Forma rectangular, pero de acuerdo a las condiciones ambientales pueden cambiar de forma, célula solitaria, pero puede formar cadenas.
<i>T. chuii</i>	8,8±1,43	Flagelado verde de forma ovalada capaz de moverse por medio del flagelo.

Nota: *Modificado de Peña et al. (2011); Villa et al. (2014); Márquez et al. (2019); Rodríguez-Pesantes et al. (2020)

Las 7 dietas a evaluar se realizaron por triplicado y fueron distribuidos de una forma aleatoria simple Para estimar la concentración de las microalgas se realizaron conteos mediante una cámara neubauer usando lugol para inmovilizar las células y facilitar el proceso de conteo. La fórmula utilizada fue la siguiente. (Celeromics, 2015)

$$\text{Concentración de alimento} = \frac{\text{Número de célula} * 10000}{\text{Numero de cuadros}}$$

El cálculo para obtener la dosis requerida de alimento para las larvas se realizó por la siguiente formula:

V^2 = Volumen a usar

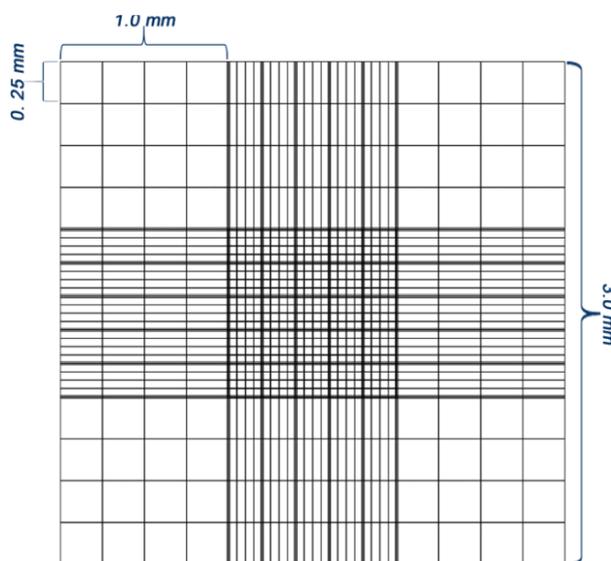
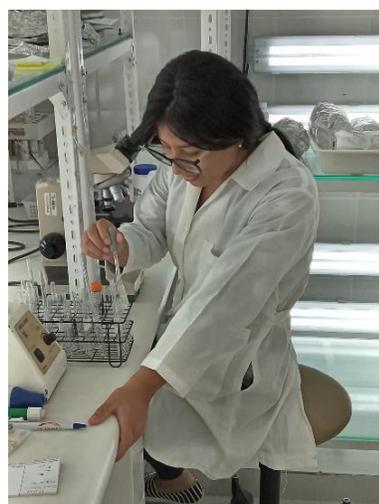
C^1 = Cel/mL requerida

V^1 = Volumen del tanque

C^2 = Densidad total cel/mL

$$V^2 = \frac{C^1 * V^1}{C^2}$$

Ilustración 3. *Conteo de microalgas.*



Nota: Se realizaban conteos diarios de microalgas con la cámara neubauer.

Inducción al desove

Se recolectaron 100 especímenes adultos (reproductores) de *A. tuberculosa*, en enero del 2020, estudios indican que la fisiología reproductiva de esta especie tiene mayor prevalencia entre los meses de febrero a marzo (Mora y Moreno, J. (2007).

Ilustración 4. *Reproductores de A. tuberculosa.*



Nota: Reproductores utilizados para el desove.

Los reproductores fueron extraídos de los manglares de la Isla Puná de la provincia de Guayas (Ecuador) y fueron transportados en un contenedor con agua de mar filtrada. Los bivalvos al llegar a CENAIM- ESPOL se indujeron a métodos profilácticos y se registraron biométricamente.

La longitud osciló entre 45 mm, altura 34 mm y promedio de masa húmeda de 13,76 g.

Ilustración 5. *Procesos profilácticos de reproductores de A. tuberculosa.*



Nota: Limpieza de *A. tuberculosa* en zona exterior

Posterior a esto, se analizó el índice de madurez de los reproductores, escogiendo 6 de ellos al azar para analizar el estado gonadal y se obtuvo una relación de 5 machos – 1 hembra. Se obtuvo desove estimulándolos mediante el proceso de shock térmico, con cambios bruscos de temperatura que varían entre 12 a 34 °C con un lapso de tiempo de 30 minutos o 1 hora por cada cambio de temperatura y así se obtuvo desove, este proceso duraba aproximadamente 6 horas.

Los gametos masculinos y femeninos fueron recolectados por separado para su posterior fertilización en una proporción de 10:1 (esperma: ovocito).

Después de 30 minutos, los huevos en división (embriones) se sembraron en 3 tanques de 1000 L conteniendo agua de mar filtrada e irradiada con UV en densidad de 20 huevos/mL⁻¹.

Ilustración 6. *Inducción al desove*



Nota: Shock térmico para obtener desove de *A. tuberculosa*.

Evaluación de dietas en el cultivo larvario

Las larvas D se obtuvieron en 18 horas después de la fertilización. Sin embargo, se colectaron 24 horas PF mediante un tamiz de 30 μm y se transfirieron a dos tanques de 1000 L donde se cultivaron hasta el día 3 PF para asegurar una buena condición de las larvas a ser usadas en el experimento.

Larvas con longitud de 90-95 μm , fueron transferidas aleatoriamente a 21 tanques cónicos de 50 L a una densidad de 2 larvas/mL y por triplicado. El sistema fue mantenido con aireación, a un rango de temperatura de $26,5 \pm 1$ ° C y la salinidad de 34 UPS (unidades Practicas de Salinidad). La alimentación fue proporcionada en dos raciones equivalentes cada día, iniciando con una densidad de 10.000 cel./mL (día 3PF) con un incremento diario de 5.000 cel./mL.

Los recambios se realizaron Inter diarios al 100% con agua filtrada e irradiada por luz UV. Las mediciones como longitud y altura se realizaron con el software (Nahwoo iWorks 2.0) y tomas fotográficas con una cámara digital (LANOPTIK MDX503, China) conectada a un microscopio trinocular (modelo CX31RTSF, Olympus, Japón) con lentes a magnitudes de visión (100X) Y (40X). La supervivencia diaria fue estimada mediante el conteo de larvas contenidas en un volumen conocido y extrapoladas al número de larvas inicialmente sembradas en cada tanque. Para estimar la tasa de crecimiento diría de todas las dietas utilizadas en el experimento se utilizó la siguiente formula: Abasolo-Pacheco et al. (2009).

Donde:

Ti = Talla inicial

Tf = Talla final

$$TCD = \frac{Tf * Ti}{N}$$

N = Número de días de cultivo

Ilustración 7. *Métodos del experimento*



Nota: Proceso de recambio y observaciones por microscopio y mediciones con el programa iWork.

Caracterización del proceso de ingestión y digestión por microscopia de epifluorescencia

Las algas contienen cloroplastos cargados de clorofila, esta sustancia emite una fluorescencia roja natural cuando está presente al ser excitada por radiaciones UV o azul cuando la clorofila es degradada, ella emite radiaciones en color naranja o amarillo y cuando ha sido destruida no se presenta ninguna fluorescencia visible.

Para determinar la ingestión y digestión de las microalgas en las larvas luego de cada recambio se realizaron observaciones los días 3, 6, 9, 12, 15, 18 21, 24, 29, 34, 39, 44 y 49 del cultivo, Luego se colocaron en *beakers* con agua filtrada por UV y se tomó una muestra por triplicada de 0,25 μ L en el portaobjeto (n= 25-30 larvas), para ser analizada por el microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 200, filtro FICT, Japón).mPor lo tanto, en este estudio se utilizó como referencia la metodología usada por Le Pennec y Rangel-Dávalos (1985) para detectar la ingestión y digestión.

Tabla 5. *Etapas del proceso de ingestión y digestión en glándula digestiva de larvas.*

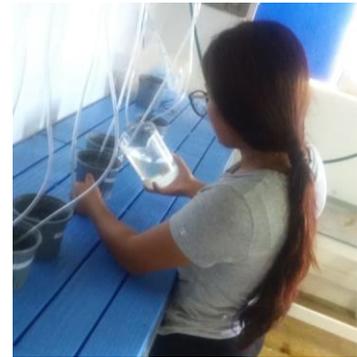
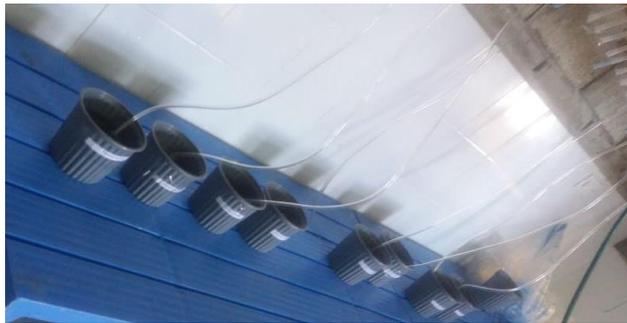
Etapas	Fluorescencia	Característica
Ingestión	Rojo	Células de microalgas definida en la glándula digestiva
Digestión	Naranja, amarillo y rosa	Células de microalgas en proceso digestivo

Evaluación de dietas en la etapa de asentamiento

Este experimento se llevó a cabo únicamente con las larvas que alcanzaron el estadio de mancha ocular en porcentaje igual o superior al 50%. Las larvas ($215,5 \pm 15,1 \mu\text{m}$) se alimentaron con cuatro microalgas que dieron mejor resultados: *C muelleri*, *C gracilis*, *C calcitrans* y *T. lutea*. Se utilizaron 12 recipientes de plástico de 65 cm^2 de área basal, con una capacidad de 500 ml, la densidad de siembra fue de 100 larvas pediveliger por cm^2 de acuerdo con Diringer et al., (2019) con aireación y un rango de temperatura diaria de ($27 \pm 1^\circ\text{C}$). Fueron alimentada con sus respectivas dietas a una concentración de $75.000 \text{ células mL}^{-1}$. Los recambios al 100 % se realizaban Inter diarios, en el experimento se utilizó agua filtrada e irradiada por luz UV. Después de cada recambio, las muestras de larvas retenidas en los tamices se observaron microscópicamente y se registró la biometría.

A los 30 días se concluyó esta evaluación, y procedió a determinar el tamaño de las semillas en un estereomicroscopio (Olympus modelo SZ2-ILST) conectado a una cámara y el Software (Nahwoo iWorks) así como también la tasa de asentamiento mediante la relación entre los animales sembrados y las semillas metamorfoseadas después de 30 días.

Ilustración 8. *Experimento en la etapa de asentamiento.*



Nota: Sala experimental de asentamiento, proceso de recambio y siembra de las larvas.

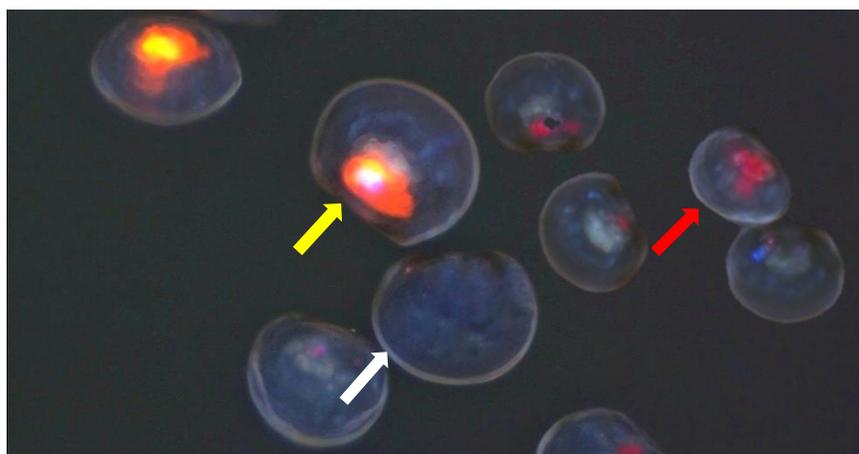
Análisis estadístico

Los efectos de los tratamientos sobre la longitud máxima, la tasa de crecimiento larval diaria, el asentamiento, el crecimiento de la semilla y la supervivencia, se analizaron en el programa RStudio, mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA). Previamente, la normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas se verificaron con las pruebas de Shapiro-Wilks y Bartlett, respectivamente. Los datos de supervivencia fueron transformados logarímicamente para normalizarlos. Al detectarse diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con ANOVA, se procedió a realizar el test post-hoc de comparaciones múltiples de Tukey (Zar, 1999). Para todas las pruebas, se utilizó una significancia de $p < 0,05$. Los datos se presentan como promedio y desviación estándar

Resultados

Evaluación del proceso de ingestión y digestión mediante la microscopia epifluorescente.

Ilustración 7. Larvas de *A. tuberculosa* analizadas por microscopia epifluorescente



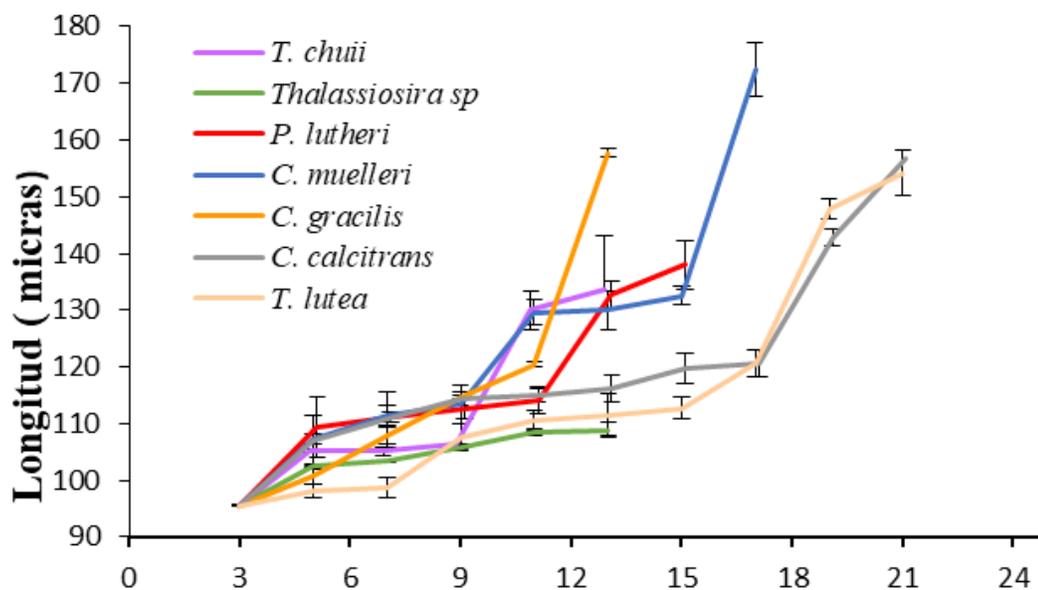
Nota: Flecha amarilla = larvas con células de microalgas en proceso de digestión. Flecha blanca= Larvas sin presencia de microalgas en la glándula digestiva o microalgas digeridas. Flecha roja= Presencia de las células de microalgas definidas en la glándula digestiva.

Evaluación de dietas en el cultivo larvario

Las larvas alimentadas con *Thalassiosira* sp. solo mostraron ingestión y digestión los primeros 5 días PF, con *T. chuii* fue notoria hasta los primeros 10-12 días PF, mientras que con *P. lutheri* se observó hasta el día 12-13 PF, mostrando altas mortalidades en las poblaciones alimentadas con estas dietas, finalmente presentaron mortalidad total el día 13 PF en *Thalassiosira* sp. y *T. chuii*, y el día 15 PF en *P. lutheri*. sin alcanzar la etapa de larva oculada. (Ilustración 9)

Las microalgas que mostraron mejor desempeño fueron *C. gracilis*, *C. muelleri*, *C. calcitrans* y *T. lutea*. Ya que la ingestión y digestión en las larvas fue evidente en todo el cultivo larvario. Sin embargo, *C. gracilis* fue el mejor tratamiento asimilado por las larvas mostrando presencia de mancha ocular el día 13, seguida de *C. muelleri*, que, a pesar de ser ingerido y digerido, tardó cuatro días más que *C. gracilis* en alcanzar la etapa oculada y en tener mejores resultados de crecimiento en longitudes alcanzadas (tabla 5) Así mismo *C. calcitrans* y *T. lutea* tardaron 21 días PF en alcanzar el estadio de larvas aculadas

Ilustración 10. Gráfico de longitud.



Nota: Crecimiento en la longitud durante el cultivo larvario de *A. tuberculosa*, alimentada con siete dietas mono-algales.

Tabla 6. Promedio de longitud (μm) de *A. tuberculosa*

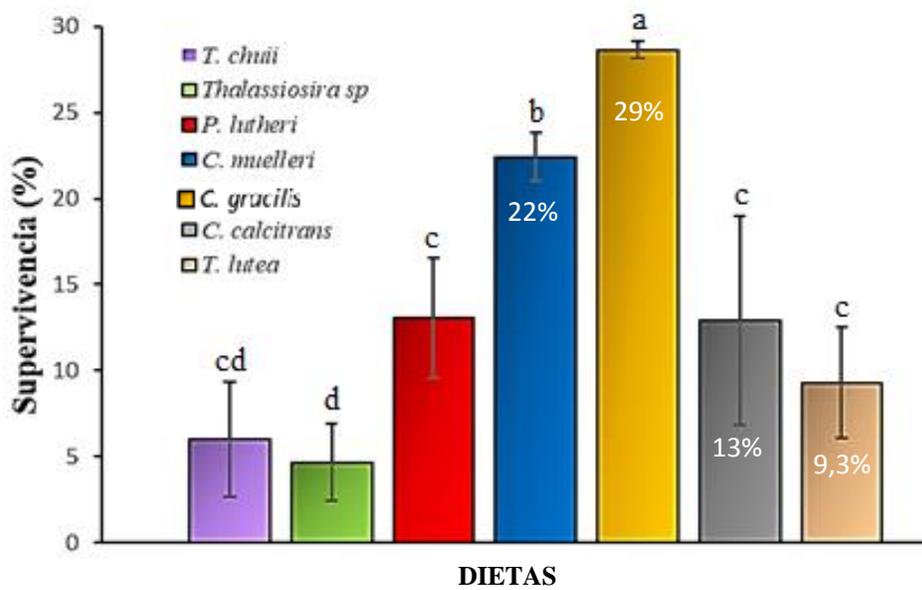
Dietas	Longitud alcanzada (%)
<i>C. muelleri</i>	172,47 \pm 4,73
<i>C. gracilis</i>	157,62 \pm 0,74
<i>C. calcitrans</i>	156,60 \pm 1,5
<i>T. lutea</i>	154,17 \pm 2,51
<i>Thalassiosira</i> sp.	108,90 \pm 0,03
<i>T. Chuii</i>	133,68 \pm 9,32
<i>P. lutheri</i>	138,04 \pm 2,32

Nota: Promedio de longitud (μm), alcanzada en las larvas durante el cultivo, alimentada con siete microalgas (\pm) Desviación estándar.

Supervivencia

Las dietas alimentadas con *T. Chuii*, *P. lutheri*, *Thalassiosira* sp obtuvieron una disminución evidente llegando a una mortalidad total el día 13 de PF. La supervivencia de las dietas presentó diferencia significativa, siendo *T. lutea* la dieta con menor supervivencia con un porcentaje de 9,3 \pm 1,96 mientras que *C. calcitrans* obtuvo un 12,9 \pm 3,07 *C. muelleri* obtuvo un 22 \pm 1,4 y *C. gracilis* obtuvo un 28,64 \pm 0,48. Siendo la mejor supervivencia registrada la de las larvas alimentadas de *C. gracilis*, seguido de *C. muelleri*.

Ilustración 11. *Gráfico de supervivencia*

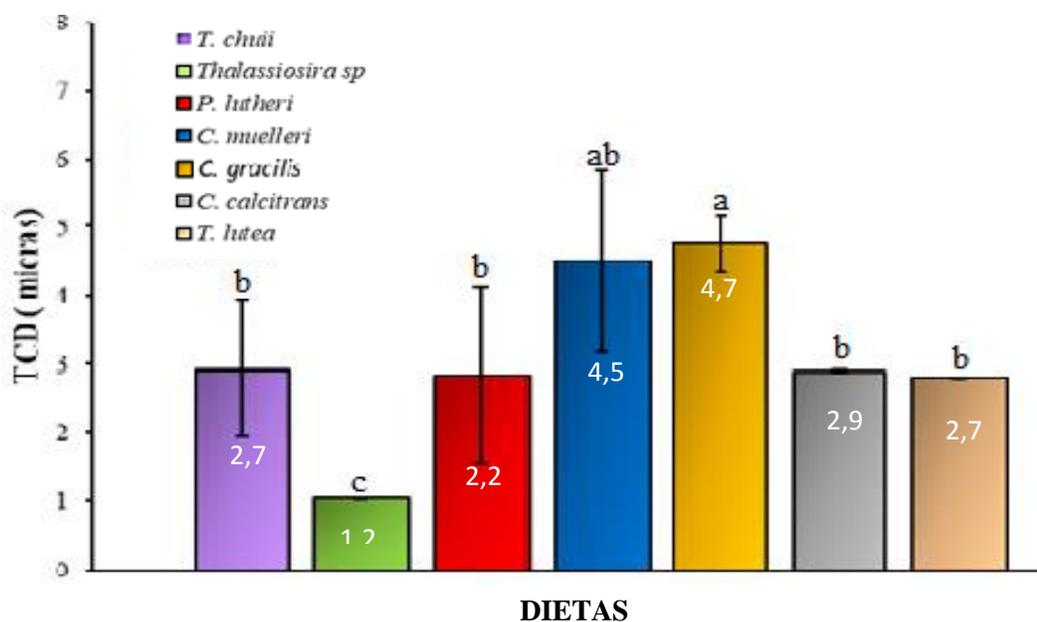


Nota: El porcentaje de supervivencia de las larvas en base a las siete dietas evaluadas.

Tasa de crecimiento diaria

En cuanto a la tasa de crecimiento diaria ($\mu\text{m}/\text{día}$), larvas alimentadas con *P. lutheri*, *T. chui* y *Thalassiosira* sp. Obtuvieron una tasa de crecimiento diaria de $2,21 \pm 0,72$; $2,78 \pm 0,002$; $1,02 \pm 0,05$ respectivamente, sin embargo presentaron mortalidad total el día 13 y 15 días del cultivo larvario el mayor desempeño se registró en larvas alimentadas con *C. gracilis* y *C. muelleri* con 4,77 y 4,52 $\mu\text{m}/\text{día}$ respectivamente, seguidas con igualdad estadística por *C. calcitrans* y *T. lutea* con 2,95 y 2,78 $\mu\text{m}/\text{día}$.

Ilustración 8.. Gráfico de tasa de crecimiento diaria.



Nota: Tasa de crecimiento diaria (μm) durante el cultivo larvario, alimentado con siete dietas mono-algales

Evaluación de dietas en la etapa de asentamiento, crecimiento y asentamiento de larvas pediveliger.

Los tratamientos alimentados con las dietas *C. muelleri* y *C. gracilis*, obtuvieron un mayor crecimiento y no se observó diferencia significativa estadísticamente. Mientras que las dietas compuestas por *T. lutea* y *C. calcitrans*, mostraron un incremento bajo.

Tabla 7: Longitud (μm) y desviación estándar de las dietas

Dietas	Longitud (%) en asentamiento
<i>C.gracilis</i>	397,1 \pm 1,1
<i>C. muelleri</i>	394,3 \pm 1,5
<i>C. calcitrans</i>	308,3 \pm 11,2
<i>T. lutea</i>	304,1 \pm 5,4

Nota: Crecimiento de las larvas en el proceso de asentamiento de acuerdo a las dietas suministradas.

Los dos tratamientos que llegaron a realizar el proceso de fijación fueron *C. gracilis* y *C. muelleri*, teniendo una diferencia significativa en cuanto a tasa de crecimiento, sin embargo, en la fase de asentamiento quien obtuvo un mayor porcentaje fueron las larvas alimentadas por *C. gracilis*, obteniendo en longitud de

semilla, 397.1 ± 1.1 y 394.3 ± 1.5 μm , respectivamente. Los resultados bajos se obtuvieron para *C. calcitrans* y *T. lutea* con 308.3 ± 11.2 y $304.1 \pm 5,4$ μm respectivamente.

La mejor tasa de crecimiento diaria (en los 30 días del experimento de asentamiento) se observó en las larvas alimentadas con *C. gracilis*, seguida de *C. muelleri*. Las dietas *C. calcitrans* y *T. lutea* fueron las de menor rendimiento. Se registró un patrón similar con la tasa de crecimiento total, es decir, *C. gracilis* fue significativamente diferente, seguido de *C. muelleri*, y finalmente *C. calcitrans* y *T. lutea* (Tabla 8).

Tabla 8. (TCD). Tasa de crecimiento diaria. (TCT) Tasa de crecimiento total del cultivo y la tasa de asentamiento representada en (%) con su respectiva desviación estándar.

<i>Tratamientos</i>	Tasa de asentamiento (%)	TCD	TCT	N° Días
<i>C. gracilis</i>	23 \pm 0,9	7,9 \pm 0,1	7,1 \pm 0,1	43
<i>C. muelleri</i>	10,5 \pm 8,9	7,4 \pm 0,1	6,3 \pm 0,1	47
<i>C. calcitrans</i>	0,2 \pm 0,1	5,1 \pm 0,4	4,2 \pm 0,2	51
<i>T. lutea</i>	0,2 \pm 0,1	4,9 \pm 0,2	4,1 \pm 0,1	51

Nota: En esta tabla se puede observar el resultado que se obtuvo con las diferentes dietas.

Discusión

Una alimentación requiere microalgas de calidad con una serie de atributos claves para su elección, los mismos que, basados en su morfología y composición deben ser adecuadas para la ingesta, aprovechamiento y fácil digestión. Este estudio da conocer que para larvas de *A. tuberculosa* la morfología no es una variable que pueda afectar la ingesta y posterior digestión. Sin embargo, de las siete microalgas evaluadas, solo *C. gracilis*, *C. muelleri*, *C. calcitrans* y *T. lutea* fueron las que dieron mejores resultados.

La facilidad de ingesta de esta especie es contraria a otras como por ejemplo *Argopecten ventricosus*, que, de diez dietas evaluadas, no ingirieron tres debido a que existió una correlación entre morfología-tamaño y la edad de las larvas (Lora-Vilchis y Maeda-Martínez, 1997), al igual que con *P. sterna* (Martínez-Fernández et al., 2004) y *Tridacna noae* (Southgate et al., 2017)

Esta investigación evidenció una digestión inicial de todas las microalgas, lo cual fue tangible en el crecimiento de las larvas, al menos durante los primeros 10-12 días del cultivo. Las microalgas de mejor desempeño, fueron *C. gracilis* y *C. muelleri*, con una tasa de crecimiento diaria de $4,77 \pm 0,41$ y $4,2 \pm 1,3$ μm respectivamente y un porcentaje de supervivencia de $28,64 \pm 0,48$ y $22 \pm 1,4$ respectivamente. Lo expuesto lleva similitud con lo reportado para *Striostrea prismatica* en cuanto al desempeño de *C. gracilis* y *C. muelleri*, donde se reportó una tasa de crecimiento diaria de 10-13 para *C. gracilis* y 4 $\mu\text{m}/\text{día}$ para *C. muelleri*

(Rodríguez-Pesantes et al., 2020). Otro bivalvo: *Ruditapes decussatus* presentó mejor resultado cuando las larvas fueron alimentadas con *C. muelleri* teniendo una tasa de crecimiento diaria de 7,3 μm y un porcentaje de supervivencia de 27% (Aranda-Burgos et al., 2014). Sin embargo, existen otros estudios como el de *Placopecten magellanicus* (Ky et al., 2013) con *Pinctada margaritifera* que han mostrado que las microalgas del género *Chaetoceros* son de gran beneficio en las dietas en comparación de otras evaluadas.

Por otro lado, *C. calcitrans* y *T. lutea* mostraron un desempeño menor, siendo *C. calcitrans* quien tuvo mejor porcentaje de crecimiento y supervivencia; a pesar de ser microalgas que las larvas de *A. tuberculosa* ingirieron y digirieron, estos resultados demostraron la carencia de algún nutriente importante indispensable en el perfil requerido por las larvas. Contrario a esto, larvas de *Crassostrea gigas* mostraron los mejores desempeños cuando se alimentaron con *C. calcitrans*, incluso sobre *T. lutea* (Rico-Villa et al. 2006). Las larvas de *Argopecten nucleus*, también mostraron tendencias similares en la evaluación de estas dietas, mostrando que *C. calcitrans* y *T. lutea*, no favorecían el crecimiento ni la supervivencia (Hernández et al., 2012). El comportamiento fue igual con larvas de *Placopecten magellanicus* donde se obtuvieron resultados bajos en términos de crecimiento y supervivencia con estas microalgas en comparación a las dietas formadas por otras diatomeas (Pernet y Tremblay, 2004).

P. lutheri, *Thalassiosira* sp, *T. chuii*, fueron las peores dietas en este estudio ya que las larvas presentaron mortalidad total, al día 15 PF, por lo tanto, estas dietas no aportaron los requerimientos nutricionales de *A. tuberculosa*. Sin embargo, otro

estudio demostró que estas microalgas son efectivas para otras especies como en el caso *Thalassiosira* cuyo uso ha demostrado buenos desempeños en larvas de *Crassostrea gigas* (Thompson y Harrison, 1992). Por otro lado, en larvas de *Crassostrea virginica* se reporta un buen crecimiento cuando estas fueron alimentadas con *T. chuii* (Hégaret et al., 2004). Le Pennec et al. (1985) obtuvieron mejores resultados cuando las larvas de *Pecten maximus* se alimentaron con *P. lutheri*, al igual que lo observado por Lora-Vilchis y Maeda-Martínez, (1997) en larvas de *Argopecten ventricosus-circularis* y Chelikowsky et al. (2013) en larvas de *Argopecten irradians*.

En base a lo expuesto, la microscopía de epifluorescencia demostró ser un método adecuado y permitió verificar la ingestión y digestión de las dietas evaluadas. Este método ha sido utilizado con éxito por Lucas y Rangel (1983) para *Crassostrea gigas*, Thunberg, Rangel (1984) para *Pecten maximus* y Le Pennec (1991) para *Strombus gigas*.

La supervivencia y el éxito de asentamiento de las larvas se debe al valor nutritivo del alimento que consume (Uriarte y Farías, 1999). Por ejemplo, la tasa de asentamiento que obtuvo *A. tuberculosa* con la dieta *C. gracilis* fue de $22,9 \pm 0,9$ %. Siendo menor a los reportado con las larvas de *Placopecten magellanicus* con un porcentaje de 29,7% (Pernet et al., 2004). Pero mayor a lo reportado en *Mytilus galloprovincialis* con $7,52 \pm$ % (Pettersen et al., 2010). Por otro lado, la tasa de asentamiento de *Cassostrea gigas*, ha mostrado porcentajes mucho más eficientes (alrededor de 58 ± 10 %) (Rico-volla et al., 2009)

En dependencia del origen alimenticio usado, investigaciones afirman que *T. lutea* y *C. calcitrans* han sido las dietas con las más bajas tasa de asentamiento (Soudant et al., 1998), coincidiendo así, con lo observado en esta investigación. Aunque *C. calcitrans* provoca buenas tasas de crecimiento, no concluye con buenas tasas de asentamiento; Sin embargo, Velasco (1997) encontró que las larvas alimentadas con una mezcla de *T. lutea* y *C. calcitrans* fueron capaces de completar su desarrollo hasta metamorfosis, pero no en el caso de *C. calcitrans* como dieta monoalgal en el pectínido *Nodipecten subnodosus*. Al igual que en la etapa larvaria, la microalga *C. gracilis*, fue la más completa, ya que en su ciclo larvario fue más corto mostrando mancha ocular a los 13 días PF.

Conclusiones

En este estudio se concluyó que el cultivo de semillas de *A. tuberculosa* fue posible en condiciones de laboratorio, con larvas alimentadas con microalgas *C. gracilis*, ya que fue el tratamiento que obtuvo mejores resultados, presentando mancha ocular primero que los otros tratamientos y tuvo una eficiencia de asentamiento del 23%. Se comprobó que las microalgas *T. chuii*, *Thalassiosira sp*, posiblemente no cumplen con los requerimientos necesarios para la etapa larvaria de *A. tuberculosa* ya que fueron los tratamientos que presentaron mortalidad total en el cultivo.

La microscopía epifluorescente demostró que la morfología de las microalgas no es una variable que afecte la ingesta de *A. tuberculosa*. Gracias a estos hallazgos, se considera que es posible la técnica de producir semilla de *A. tuberculosa* en cautiverio.

Recomendaciones

Se recomienda una dieta basada en una mezcla de *C. gracilis*, *C. muelleri* y *T. lutea* en proporción de 2:1:1 en todo el cultivo larvario hasta conseguir larvas con mancha ocular (~15 días después de la fertilización), y luego cambiarla a 2:2:1 hasta la obtención de semilla (~30 días después de la etapa de larva oculada). En busca de una mayor producción de semilla con fines de acuicultura y/o restauración ecológica, las investigaciones futuras deben incluir estudios relacionados con la optimización del acondicionamiento reproductivo, las densidades en cultivo, estrategias de asentamiento y engorde en campo.

Referencias

- A. Cruz, R., Fonseca Rodríguez, C., y Chavarría-Solera, F. (2012). Comparación de la composición química proximal de la carne de *Anadara Tuberculosa* y *A. Similis* (Bivalvia: Arcidae) de Chomes, Puntarenas, Costa Rica . *Revista Ciencias Marinas y Costeras*.
- Alina Villa , Diana Herazo, A. C. T. (2014). Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* (clon c-cal) en cultivos estáticos effect of photoperiod on the growth of diatom *Chaetoceros calcitrans* (c-cal) in static cultures. in *Intropica*.
- Bayne, B.J. 1975. The biology of mussel larvae. En: B.L. Bayne (ed.). *Marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge University Press, New York, pp. 81-115.
- Baldwin, B. S., y Newell, R. I. E. (1995). Relative importance of different size food particles in the natural diet of oyster larvae (*Crassostrea virginica*).
- Beitl, C. M. (2011). Cockles in custody: The role of common property arrangements in the ecological sustainability of mangrove fisheries on the Ecuadorian coast. *International Journal of the Commons*.
- Benemann, J. R. (1992). Microalgae aquaculture feeds. *Journal of Applied Phycology*
- Bonar, D. B., Coon, S. L., Walch, M., Weiner, R. M., y Fitt, W. (1990). Control of Oyster Settlement and Metamorphosis by Endogenous and Exogenous Chemical Cues.
- Brodie, J. y Lewis, J. (2007). Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics
- Brown, M. R., Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., y Gaxiola-Cortés,

- M. G. (2002). Nutritional value of microalgae for aquaculture.
- Cáceres, J. M. (2014). Situación pesquera artesanal del recurso concha en San Lorenzo y Muisne provincia Esmeraldas durante el 2014 fishery situation ark shell resource in major ports of the Esmeraldas province during 2014.
- Camacho, G. Y. (1999). Especies de Costa Rica, *Anadara tuberculosa*. INBio, Instituto de Biodiversidad Costa Rica.
- Cantera, J. (1987). Acuicultura de moluscos en la Universidad del Valle. En: A. Hernández y J. Plata, eds. Primera reunión de la Red Nacional de Acuicultura, Memorias, Bogotá, Colombia.
- Castrejón, M., Hearn, A., Carlos Murillo, J., Lalancette, A., Reyes, H., Gaibor, N., Chalén, X., Espinoza, E., Avendaño, U., Nacional Galápagos, P., Charles Darwin, F., & Futuro Latinoamericano-COPROPAG, F. (2008). Puntos de referencia objetivo para la pesquería de pepino de mar (*Isostichopus fuscus*) en la Reserva Marina de Galápagos.
- Coutteau P, P. S. (1992). The requirement for live algae and their replacement by artificial diets in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs.
- Cruz, R. A. (1984). Algunos aspectos de la reproducción en *Anadara tuberculosa*.
- Díaz, J. M., & Zapata, C. V. G. M. L. A. (2011). Diagnóstico de las principales pesquerías del Pacífico colombiano.
- Diringer, B. B., Vasquez, R., Moreno, V., Pretell, K., & Sahuquet, M. (2019). Peru project studies blood cockles for stock enhancement, aquaculture. July 2012.
- E Mora, L. F. J. M. G. G. (2011). La pesquería de la concha prieta (*Anadara tuberculosa* y *Anadara similis*) en los principales puertos de desembarque de Ecuador en el 2011.

- E Mora, M. B. (1992). Engorde de concha prieta en una zona de manglar de Bunche.
- Eslava Eljaiek, P. J., Vélez Calabria, G. M., & Wedler, E. (2003). Desarrollo de un programa de tecnologías de acuicultura como combinación entre producción pesquera y manejo ambiental en lagunas eutrofizadas.
- Espinosa, S., Delgado Hernández, M. F., Riofrío, B. O., Mejía-Ladino, L. M., & Gil-Agudelo, D. L. (2010). Estado de la población y valoración de algunas estrategias de conservación del recurso piangua anadara tuberculosa (sowerby) en sectores de bazán y nerete, costa pacífica nariñense de colombia*.
- FAO. (2007). Desarrollo acuicultura. gestión sanitaria para el movimiento responsable de animales acuáticos vivos. gestión sanitaria para el movimiento responsable de animales acuáticos vivos fao orientaciones técnicas para la pesca responsable.
- FAO. (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura.
- FAO. (2016). Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. www.fao.org/
- FAO. (2018). De la pesca y la acuicultura. <http://www.fao.org/publications/es>
- Farías, A., Uriarte, I., Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., & Gaxiola-Cortés, M. G. (2002). Nutrición en larvicultura de pectínidos: Relevancia de proteínas y lípidos.
- Flores, L., & Mora, E. (2016). Evaluando variaciones en la talla de Anadara tuberculosa y A. similis en el archipiélago de Jambelí: hay indicios de sobrepesca
- Flores Vera Luis, & Morales Escalante Maribel. (2018). Tasa de captura y composición de tamaños de Anadara spp. en Puerto El Morro, Ecuador.
- Fong, P. P., Kyojuka, K., Duncan, J., Rynkowski, S., Mekasha, D., & Ram, J. L. (1995).

- The effect of salinity and temperature on spawning and fertilization in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas) from North America. *Biological Bulletin*, 189(3), 320–329. <https://doi.org/10.2307/1542149>
- Gener, R. L. (2009). Comercialización con garantía de inocuidad.
- Gosling, E. (2008). Bivalve molluscs: biology, ecology and culture.
- Gouda, R., Kenchington, E., Hatcher, B., & Vercaemer, B. (2006). Effects of locally-isolated micro-phytoplankton diets on growth and survival of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) larvae. *Aquaculture*, 259(1–4), 169–180.
- Gutierrez, M., & Windevoxhel, N. (1999). La apicultura y las áreas de manglar. In *Manejo Productivo de Manglares en América Central* (pp. 137–151).
- Hammouda, O., Gaber, A., & Abdel-Raouf, N. (1995). Microalgae and wastewater treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31(3), 205–210.
- Harun, R., Singh, M., Forde, G. M., & Danquah, M. K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 14, Issue 3, pp. 1037–1047). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.004>
- Hégaret, H., Wikfors, G. H., Soudant, P., Delaporte, M., Alix, J. H., Smith, B. C., Dixon, M. S., Quére, C., Le Coz, J. R., Paillard, C., Moal, J., & Samain, J. F. (2004). Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation. *Aquaculture*, 234(1–4),
- Helm, M.M.; Bourne, N.; Lovatelli, A. (2006). Cultivo de bivalvos en criadero FAO Documento Técnico de Pesca. No. 471. Roma, FAO.
- HOLGUÍN, A. E. B. (2019). Percepciones de los concheros sobre su pesquería, el área

- protegida y concesiones de manglar en Puerto del Morro, Ecuador.
[http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/39924/1/Trabajo de Titulacion%2C Alfredo Becerra 2019.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/39924/1/Trabajo%20de%20Titulacion%20Alfredo%20Becerra%202019.pdf)
- José Antolín Aké Castillo. (2015). Descripción morfológica y autoecología de *Thalassiosira cedarkeyensis* A.K.S.K. Prasad (Bacillariophyta: Thalassiosirales), en la laguna de Sontecomapan, Veracruz, México.
- Knauer, J; Southgate, P. C. (1997). Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a microalga and microcapsules containing varying amounts of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid.
- Ky, C.-L., Blay, C., Sham-Koua, M., Vanaa, V., Lo, C., & Cabral, P. (2013). Family effect on cultured pearl quality in black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera* and insights for genetic improvement. *Aquatic Living Resources*, 26(2), 133–145.
<https://doi.org/10.1051/alr/2013055>
- Langdon, c. j. (1983). growth studies with bacteria-free oyster (*crassostrea gigas*) larvae fed on semi-defined artificial DIETS .
- Laura Barsanti, P. G. (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*.
- Lavens, P., & Sorgeloos, P. (1996). *Manual on the production and use of live food for aquaculture*.
- Le Pennec, M., & Rangel-Davalos, C. (1985). Observations en microscopie a epifluorescence de l'ingestion et de la digestion d'algues unicellulaires chez des jeunes larves de *Pecten maximus* (Pectinidae, Bivalvia).
- Lee, R. E. (2008). *hycology*, 4th edition. Cambridge University Press. USA.
- Liam Brennan Philip Owende. (n.d.). *Biofuels from microalgae—A review of technologies*

- for production, processing, and extractions of biofuels and co-products - ScienceDirect. Retrieved December 9, 2020, from
- Liu, W., Pearce, C., Alabi, A., Aquaculture, H. G.-S.-, & 2009, undefined. (2009). Effects of microalgal diets on the growth and survival of larvae and post-larvae of the basket cockle, *Clinocardium nuttallii*. Elsevier.
- Loor-Mera, A., & Arguello-Guevara, W. (2012). Desarrollo de Protocolos de Manejo para la Inducción al Desove y Larvicultura de la Ostra Nativa *Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854).
- Lora-Vilchis, MC, M.-M. (1997). La ingestión y el índice de digestión de almeja catarina *Argopecten ventricosus-circularis*, Sowerby II, 1842, larvas véliger con diez especies de microalgas. *Aquac. Res.* 28, 905-910.
- Lucas, A., & Rangel, C. (1983). Detection of the first larval feeding in *Crassostrea gigas*, using the epifluorescence microscope. *Aquaculture*, 30(1–4), 369–374.
- Lucin, O., & del Cisne, M. (2015). Universidad técnica de machala “calidad, pertinencia y calidez” unidad académica de ciencias químicas y de la salud carrera de ingeniería química trabajo de titulación previo a la obtención del título de ingeniera química tema.
- Mackenzie, J. (2001). The Fisheries for Mangrove Cockles, *Anadara* spp., from Mexico to Peru, With Descriptions of Their Habitats and Biology, the Fishermen’s Lives, and the Effects of Shrimp Farming.
- MACKIE (1984). Bivalves. The Mollusca,
- MAGAP. (2015). Manual práctico de producción de concha prieta *Anadara tuberculosa*, en condiciones de laboratorio. 593(4), 23.

- Marquez, A., Lodeiros, & C., Loor, & A., Revilla, & J., Da Costa, F., & Sonnenholzner, & S. (2019). Microalgae diet for juveniles of *Spondylus limbatus*.
- Marshall, R., McKinley, S., & Pearce, C. M. (2010). Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 2(1),
- Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H., & Rangel-Dávalos, C. (2004). Ingestion and digestion of 10 species of microalgae by winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851)
- Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H., & Rangel-Dávalos, C. (2004). Ingestion and digestion of 10 species of microalgae by winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851)
- Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H., & Southgate, P. C. (2006). The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.)
- Mendoza H, A. de la J. & E. P. (2011). Planta Piloto de Cultivo de Microalgas.
- Mora, E., Flores, L., Moreno, J., & Gilbert, G. (2012). La pesquería de la concha prieta (*Anadara tuberculosa* y *Anadara similis*) en los principales puertos de desembarque de Ecuador en el 2011.
- Mora, E, Jurado, J., & Flores, V. Y. (2010). La pesquería de la concha prieta (*Anadara tuberculosa* y *Anadara similis*) the mangrove cockles fishery (*Anadara tuberculosa* and *Anadara similis*) in 2009: fishery indicators and reproductive condition in the south and north zone of Ecuador.
- Mora, E, & Moreno, J. (2007a). Abundancia y estructura poblacional de *Anadara tuberculosa* y *Anadara similis* en las principales áreas de extracción de la costa

ecuatoriana.

Mora, E, & Moreno, J. (2007b). Abundancia y estructura poblacional de *Anadara tuberculosa* y *Anadara similis* en las principales áreas de extracción de la costa ecuatoriana.

Mora, E, & Moreno, J. (2009). Estado de la pesquería del recurso concha (*Anadara tuberculosa* y *A. similis*) en la costa ecuatoriana.

Mora, Elba, & Moreno, J. (2009). La pesquería artesanal del recurso concha (*Anadara tuberculosa* y *A. similis*) en la costa ecuatoriana durante el 2004 the artisanal fishery of mangrove cockle (*Anadara tuberculosa* and *A. similis*) in Ecuadorian coast during.

Mora, Elba, Moreno, J., & Jurado, V. (2009). La pesquería artesanal del recurso concha en las zonas de Esmeraldas y El Oro, durante el 2008 small scale fishery of the mangrove cockle in the areas of Esmeraldas and El Oro during 2008

Mora, Elba, Moreno, J., & Jurado, V. (2011). Un análisis de la pesquería del recurso concha en Ecuador durante el 2010.

Mora Sánchez, E. (1990). Catálogo de bivalvos marinos del Ecuador /. Instituto Nacional de Pesca.

Moreno Cáceres, J., & Gaibor, N. (2019). Situación pesquera artesanal del recurso concha en San Lorenzo y Muisne provincia Esmeraldas durante el 2014.

Moreno, J., Solano, F., & Mendivez, W. (2008). Distribución y abundancia de los recursos pesqueros en las zonas de manglar.

Morgan, F., Barker, G., Briggs, C., Price, R., & Keys, H. (2007). Environmental Domains of Antarctica Version 2.0 Final Report.

- O'Connor, W. A., & Heasman, M. P. (1997). Diet and feeding regimens for larval doughboy scallops, *Mimachlamys asperima*. *Aquaculture*, 158(3–4), 289–303.
- Ordinola, E., Montero, P., & Alemán, S. (2010). El bivalvo concha negra, *Anadara tuberculosa* (SOWERBY).
- Parwadani Aji, L. (2011). Ingestion and digestion of micro-algae concentrates by veliger larvae of the giant clam, *Tridacna noae*. In *Jurnal Penelitian Sains* (Vol. 14).
- Peña, J. (2011). Efecto del tipo de colector sobre el asentamiento de larvas de pectínidos en la costa de Castellón (este de España).
- Percy A. Morris. (1966). *A Field Guide to Pacific Coast Shells, Including Shells of Hawaii and the Gulf of California* (Peterson Field Guide Series)
- Pesca, N. I. (2020). Reporte mensual del recurso *Anadara Tuberculosa* en los primeros puertos de desembarque.
- Quinteros, R.M. & Zea, L. A. (2012). Escuela superior politecnica del litoral "diseño de un sistema de depuración para concha prieta usando acido láctico previa a la obtención del título de: ingeniero acuicultor.
- Reitan, K. I. (2011). Digestion of lipids and carbohydrates from microalgae (*Chaetoceros muelleri* Lemmermann and *Isochrysis aff. galbana* clone T-ISO) in juvenile scallops (*Pecten maximus* L.). A
- Rendón, M. . E. S. y M. M. 2004. (2004). Manejo sustentable y comercialización de concha prieta en cautiverio en Puerto El Morro (Provincia del Guayas), para su exportación hacia España . Facultad de Ciencias Humanísticas y Económicas. ESPOL. Guayaquil.

- Retamales González, R., Panta Vélez, P., & Vélez Cárdenas, J. (2014). Inducción al desove de la Concha Prieta *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) en condiciones de laboratorio. *La Técnica: Revista de Las Agrociencias*.
- Rico-Villa, B., Pouvreau, S., & Robert, R. (2009). Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*.
- Rivas, M., & de Dios, J. (2018). Evaluación del efecto de la temperatura en el desove de la piangua *Anadara tuberculosa* (Bivalva: Arcidae) en condiciones de laboratorio.
- Rivero, S. (2009). CENTROAMERICA Hacia una estrategia regional.
- Rodríguez- Pesantes, D., Lodeiros, C., Márquez, A., Revilla, J., & Sonnenholzner, S. (2020, December 17). Microalgal diet evaluation in the larval development and substrate selection for settlement in the rock oyster *Striostrea prismatica* (Gray, 1825).
- Rose, R. A., & Baker, S. B. (1994). Larval and spat culture of the Western Australian silver- or goldlip pearl oyster, *Pinctada maxima* Jameson (Mollusca: Pteriidae).
- Sánchez-Ortiz, A. C., Luna-González, A., Campa-Córdova, Á. I., Escamilla-Montes, R., Carmen Flores-Miranda, M. Del, & Mazón-Suástegui, J. M. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias de la almeja “pata de mula” (*Anadara tuberculosa*) con potencial probiótico para el cultivo de camarón. *Latin American Journal of Aquatic Research*
- Sandra Joaquim, D. M. y Ó. M. (2008). CULTIVO DE BIVALVOS EN CRIADERO.
- Santos, M. y J. M. (1999). Evaluación de la pesquería de concha prieta en el Archipiélago de Jambelí y Estuario del Río

- Sastry, A. N. (1979). *Reproduction of Marine Invertebrates V5: Molluscs*
- Silva, A. y R. B. (2001). Abundancia y morfometría de *Anadara tuberculosa* y *A. similis* (Mollusca: Bivalvia) en el January 2001.
- Sommer, F., Stibor, H., Sommer, U., & Velimirov, B. (2000). Grazing by mesozooplankton from Kiel Bight, Baltic Sea, on different sized algae and natural seston size fractions. *Marine Ecology Progress Series*, 199, 43–53.
- Southgate, P. C., Braley, R. D., & Miltz, T. A. (flores). Ingestion and digestion of microalgae concentrates by veliger larvae of the giant clam, *Tridacna noae*. *Aquaculture*, 473, 443–448.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96.
- Stuardo José, 1974 Martínez Alfredo. (1974). relaciones entre algunos factores ecológicos y la biología, de poblaciones de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, 1951, de San Blas, Nayarit, México.
- Vásquez H. E., Pacheco S. P., Pérez I. M., Cornejo N. E., C. M. F. y K. K. (2009). Producción artificial de semilla y cultivo de engorde de moluscos bivalvos. *Centro de Desarrollo de La Pesca y La Acuicultura*, 80.
- Velasco, L. (2008). *Biología y cultivo de los pectínidos de interés comercial de Colombia*.
- Velasco, L. A., & Barros, J. (2008). Cultivo de bivalvos en Colombia: ¿utopía o apuesta de futuro?
- Vivanco, G., Oliva, D., & Abarca, A. (2014). Effect of traditional microalgae-based food, native and artificial diets on growth and survival of the taquilla clam veliger larvae,

- Mulinia edulis. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 339–349.
- Walne, P. R. (1970). Present problems in the culture of the larvae of *Ostrea edulis*. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 20(1–4), 514–525.
- Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Robarts, R. D., Caldwell, S. J., & Caldwell, D. E. (1994). Multicellular organization in a degradative biofilm community. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(2), 434–446.
- Zimme-Faust, R. K., & Tamburri, M. N. (1994). Chemical identity and ecological implications of a waterborne, larval settlement cue. *Limnology and Oceanography*, 39(5), 1075–1087. <https://doi.org/10.4319/lo.1994.39.5.1075>

Anexos



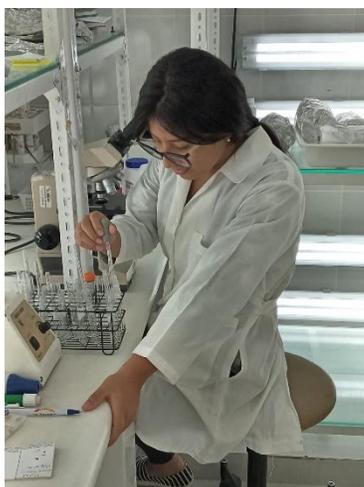
Preparación de tanques para el experimento



Observación y análisis de las larvas.



Recambios al 100%



Conteo de microalgas



Preparación de la sala 2 de experimentación



Recambios de la segunda