



**Centro Nacional de  
Acuicultura e  
Investigaciones Marinas**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL  
FACULTAD DE INGENIERIA MARÍTIMA Y CIENCIAS DEL MAR  
CENTRO NACIONAL DE ACUICULTURA E INVESTIGACIONES MARINAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA ACUICULTURA MARINA**

**DESCRIPCIÓN DEL CICLO DE VIDA TEMPRANO, EVALUACIÓN DE DIETAS  
MONOALGALES, BIALGALES Y SELECCIÓN DE SUSTRATOS PARA LA  
FIJACIÓN DE LA OSTRAS DE ROCA *Striostrea prismatica* (GRAY, 1825)**

**TESIS DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:  
MÁSTER EN CIENCIAS DE LA ACUICULTURA MARINA**

**PRESENTADO POR:**

**DANIEL FORTUNATO RODRÍGUEZ PESANTES**

**TUTORES:**

**STANISLAUS SONNENHOLZNER SCHOLD**

**CÉSAR LODEIROS SEIJO**

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

**2020**



## DEDICATORIA

A Dios creador de todas las cosas por permitirme gozar de mi familia a pesar de mis errores.

A mis padres Bertha y Segundo, que con su ejemplo de humildad y esfuerzo supieron sembrar los valores necesarios para luchar por los objetivos.

A mi esposa Katty y mis dos hijos Dayra y Sebastián por su apoyo permanente y constituirse en la razón principal para seguir esforzándome y hacer efectivo cada logro.

Daniel

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

---

Stanislaus Sonnenholzner Ph. D.

Director

---

Ph. D.

Vocal

---

Ph. D.

Vocal

## DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

---

Daniel Fortunato Rodríguez Pesantes

## RESUMEN

En la actualidad la única especie de moluscos cultivada en el Ecuador es la ostra del Japón *Crassostrea gigas*, actividad que es realizada a pequeña escala por agrupaciones pesqueras como alternativa a la extracción. Esto ha conducido a palpar la necesidad de promover la producción acuícola de moluscos nativos como por ejemplo la ostra de roca *Striostrea prismatica*, o a su vez destinar esfuerzos para restaurar sus poblaciones. Sin embargo, no existen trabajos dirigidos a la producción de semillas en laboratorio.

Considerando los principales aspectos que gobiernan la madurez gonadal de *Striostrea prismatica* y basado en estudios previos para conseguir la reproducción inducida, se extrajeron ejemplares de los bancos naturales de la bahía de Ayangue, Santa Elena, Ecuador (1° 59.0' S; 80° 45.58' O) en marzo y abril 2017 cuando la temperatura oscila generalmente entre 26-27°C. Posterior a ello y utilizando técnicas probadas se obtuvo el desove (desección y shock térmico  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ), describiendo de forma cronológica el desarrollo embrionario y larvario de la especie. La fecundación se realizó en proporción 10:1 (espermatozoide:ovocito). El primer cuerpo polar se observó 15 min después de que los gametos entraron en contacto (fertilización), luego, la primera escisión celular tuvo lugar a los 90 min. Transcurriendo así los sucesivos cambios embriológicos hasta las 19h post-fertilización (PF) en que >90% de larvas tempranas con bisagra recta (larva D) fueron desarrollándose. 24 h PF se inició el crecimiento larval de la prodisoconcha, notándose recién el umbo en larvas de siete días de edad, aunque fue al día 9 PF cuando las larvas veliger se volvieron marcadamente umbonadas, observándose además un color rojizo distal hacia la zona ventral en las larvas.

El día 12 PF, la pigmentación rojiza fue más marcada hasta que finalmente se tornó difusa, desapareciendo al día 18 PF. El día 20 PF, las larvas umbonadas avanzadas mostraron mancha ocular y en el día 22 un pie ciliado. En ese momento, las larvas pediveliger tenían un comportamiento de reptación, y fue cuando se transfirieron a sistemas diseñados para el asentamiento. Las primeras postlarvas cementadas observadas con formación de disoconcha midieron  $482,2 \pm 19,7 \mu\text{m}$ , a los 3 días postmetamorfosis -PM- (25 postfertilización). Las postlarvas cementadas continuaron su crecimiento alcanzando una longitud media de concha de  $764,8 \pm 37,2 \mu\text{m}$  después de 9 días PM. Las semillas alcanzaron 5 mm a los 50 días PF, pudiendo manipularlas con facilidad para transferirse a los sistemas de engorde en el mar.

Paralelamente, se evaluaron siete dietas en un primer experimento, todos ellos como tratamientos monoalgales más un control bialgal. Luego con las dietas de mejor desempeño se realizaron mezclas bialgales evaluadas con larvas de un segundo desove. En el primer experimento las microalgas *Pavlova lutheri*, *Tisochrysis lutea*, *Chaetoceros gracilis* y mezcla control (*T. lutea*+*Ch. gracilis*) resultaron mejores en supervivencia (36-40%), tasa de crecimiento diario ( $4,3$ - $5,6 \mu\text{m/day}$ ), pero solo este último tratamiento resultó con un porcentaje significativo de larvas oculadas (44,8%). Los demás tratamientos monoespecíficos (*Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis chuii* y *Nannochloropsis*) generaron altas mortalidades y una baja tasa de crecimiento diario. Luego, en la evaluación de dietas bialgales, la mezcla control y la mezcla *Pavlova lutheri* + *Chaetoceros gracilis* resultaron iguales estadísticamente en supervivencia, crecimiento, pero no en cantidad de animales oculados siendo superior la mezcla control (44,7%), lo que ratificó lo observado en el experimento monoalgal.

Para el asentamiento, se desafiaron larvas pedivelíger a cinco sustratos distintos en composición (caucho, papel lija, concha molida en dos tamaños y policarbonato), mostrándose las valvas molidas de la misma especie en tamaño de 10 mm<sup>2</sup> como las de mejor aceptación (19%), por el contrario, el sustrato de peor desempeño fue el plástico policarbonato. Los resultados indican que la tradicional dieta compuesta por un flagelado y una diatomea (*Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros gracilis*) satisface las necesidades nutricionales de las larvas, no obstante, se observó que es necesaria la adición de *Pavlova lutheri* para complementar el perfil de ácidos grasos requeridos por las larvas de ostra nativa en los primeros días del desarrollo larvario (mayor demanda de DHA en las larvas iniciales y la necesidad de EPA desde la fase umbonada temprana). *S. prismatica* además mostró tener capacidad de sintetizar ácidos grasos esenciales a partir de otros por desaturación.

Finalmente, se sugiere evaluar otras alternativas para optimizar el proceso de asentamiento, en este experimento a pesar que se obtuvo resultados con trozos de valvas de 10 mm<sup>2</sup>, la proporción de animales fijados por partícula no asegura la supervivencia de los mismos y limita incluso la velocidad de crecimiento, por lo que se considera que no se ha optimizado la tecnología en esta fase, recomendándose estudios exhaustivos de sustratos dependientes de la talla de partícula y peso específico junto con técnicas de inducción a la metamorfosis para optimizar esta importante y clave fase de la producción de semillas de *Striostrea prismatica*.

## ÍNDICE

CAPÍTULO 1 .....	1
1.1.Introducción.....	1
1.2.Objetivo general .....	3
1.3.Objetivos específicos.....	3
1.4.Marco teórico. ....	4
CAPÍTULO 2 .....	13
La acuicultura en el Ecuador .....	13
2.1. Reseña de la acuicultura en el Ecuador.....	13
2.2. Antecedentes del Cultivo de especies no tradicionales en el Ecuador.....	14
CAPÍTULO 3 .....	19
<i>Striostrea prismatica</i> .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3.1. Descripción de <i>Striostrea prismatica</i> .....	19
CAPÍTULO 4 .....	23
4.1. Alimento vivo y perfil nutricional.....	17
4.2. Principales problemas asociados a deficiencias en la dieta .....	25
CAPÍTULO 5 .....	26
<i>Materiales y métodos</i> .....	26
5.1. Cultivo de microalgas .....	26
5.2. Reproductores de <i>Striostrea prismatica</i> .....	27
5.2.1. Inducción al desove.....	28
5.3. Descripción embrionaria y larvaria de <i>Striostrea prismatica</i> .....	28

5.4. Producción de larvas veligers para experimentos de dietas.....	29
5.5. Condiciones de cultivo de los experimentos monoalgales.....	30
5.6. Condiciones de cultivo de los experimentos bialgales.....	31
5.7. Muestreos en los experimentos de dietas mono y bialgales.....	32
5.8. Evaluación de sustratos para la Metamorfosis y Asentamiento.....	33
5.9. Perfil de ácidos grasos: Microalgas y larvas de <i>Striostrea prismatica</i> .....	34
5.10. Análisis estadístico.....	35
CAPÍTULO 6.....	36
<i>Resultados y discusión</i> .....	36
6.1. Descripción embrionaria de <i>Striostrea prismatica</i> .....	36
6.2. Descripción larvaria de <i>Striostrea prismatica</i> .....	27
6.3. Evaluación de dietas: Experimentos monoalgales.....	41
6.4. Evaluación de dietas: Experimentos bialgales .....	48
6.4.1. Efecto de dietas bialgales sobre el crecimiento y supervivencia de larvas de <i>S. prismatica</i> desde larva velíger “D” hasta estadio umbonado temprano (Fase I) .....	48
6.4.2 Efecto de dietas bialgales sobre el crecimiento y supervivencia de larvas de <i>S. prismatica</i> desde estadio umbonado temprano hasta larvas con mancha ocular (Fase II).....	50
6.5 Evaluación de sustratos para el asentamiento .....	53
6.6. Perfil de ácidos grasos .....	56
6.6.1 Microalgas.....	56
6.6.2. Larvas.....	59

CAPÍTULO 7.....	62
Conclusión.....	62

## ABREVIATURAS

AA= Ácido araquidónico

ANOVA= análisis de varianza de una vía

BCE= Banco Central del Ecuador

cell<sup>-1</sup>= células (microalgas)

CENAIM= Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas

Cg= *Chaetoceros gracilis*

Cm= *Chaetoceros muelleri*

día<sup>-1</sup>= día

TCD= Tasa de crecimiento diario

DHA= Ácido Docosahecanoico

DE= desviación estándar

DV= axis dorso-ventral

EE= error estandar

ESPOL= Escuela Superior Politécnica del Litoral

EPA= Ácido eicosapentanoico

FAME's= ésteres metílicos de ácidos grasos

FAO= La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

AMF= agua de mar filtrada

g= gramo

GF/F= Filtros de fibra de vidrio Whatman, para retención de partículas pequeñas

h= hora

Ha= Hectárea

INSAT= ácidos grasos insaturados

Kg= Kilogramo

L= litro

M= molar

mg= miligramo

min= minuto

mL= mililitro

mm= milímetros

mm<sup>2</sup>= milímetros cuadrados

MUFA= ácidos grasos monoinsaturados

m<sup>2</sup>= metros cuadrados

N= *Nannochloropsis* sp.

n= número (número de réplicas)

ND= No determinado/No detectado

NF=No fijación

PF= Post-fertilización

pg= picogramo

Pl=*Pavlova lutheri*

Pl+Cg=*Pavlova lutheri* + *Chaetoceros gracilis*

PUFA= ácidos grasos poliinsaturados

PM= post-metamorfosis

SAFA= ácidos grasos saturados

SENESCYT= Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación

SSRP= subsecretaría recursos pesqueros

s<sup>-1</sup>= segundo (fracción de minuto)

t = tiempo

Tch= *Tetraselmis chuii*

Tl= *Tisochrysis lutea*

Tl+Cg= *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros gracilis* (Dieta control)

TM= Tonelada métrica

Ts= *Tetraselmis suecica*

T. inicial= tamaño al inicio del experimento

T. final= tamaño al final del experimento

USD= Dólares Americanos

UPS= unidades prácticas de salinidad

UV= Luz ultravioleta

WSSV= white spot syndrome virus

μmol photons= foton micro moles

μm= micras-micrómetro

°C= Grados celsius

## Índice de figuras

Fig.1. Estadístico comparativo entre la producción de especies acuícolas y la extracción pesquera. (Adaptado de documento FAO, 2019).....	5
Figura 2. Estadístico comparativo global entre la producción de peces, moluscos y crustáceos en función del tiempo. (Adaptado de documento FAO, 2019).....	6
Figura 3. Producción actual acuícola por continentes (Adaptado de documento FAO, 2019).....	7
Figura 4. Producción de moluscos por grupos.....	8
Figura 5. Distribución de la ostra de roca.....	19
Figura 6. Valvas señalando estructuras internas de organismo adulto de <i>Striostrea prismatica</i> : rasgos principales.....	20
Figura 7. Morfología interna de valvas en juveniles de <i>Striostrea prismatica</i> obtenidos en laboratorio.....	20
Figura 8. Componentes considerados para la medición de longitudes de <i>Striostrea prismatica</i> .....	21
Figura 9. Diseño experimental que muestra la procedencia de las larvas de <i>S. prismatica</i> para cada evaluación (mono, bialgal y asentamiento). El color negro muestra el primer desove y el color gris el segundo desove.....	30
Figura 10. Sustratos utilizados en experimento de asentamiento de la ostra nativa.....	32
Figura 11. Desarrollo embrionario de <i>Striostrea prismatica</i> hasta trocofora larva-D.....	35
Figura 12. Desarrollo larval y postlarval de <i>Striostrea prismatica</i> hasta la etapa semillas.....	37
Figura 13. Supervivencia y crecimiento de larvas de <i>Striostrea prismatica</i> durante la fase I del experimento monoalgal.....	40
Figura 14. Supervivencia y crecimiento de larvas de <i>Striostrea prismatica</i> durante la fase II del experimento monoalgal.....	42

Figura 15. Supervivencia y crecimiento de larvas de <i>Striostrea prismatica</i> durante la fase I del experimento bialgal.....	43
Figura 16. Supervivencia y crecimiento de larvas de <i>Striostrea prismatica</i> durante la fase II del experimento bialgal.....	48
Figura 17. Semillas metamorfoseadas sobre los distintos sustratos evaluados.....	50

## Índice de tablas

Tabla I. <i>Top</i> 20 de los principales Países productores acuícolas, se muestra la cantidad de producto producido en el 2017 (TM= toneladas métricas) y su porcentaje de participación (Adaptado de documento FAO, 2019).....	9
Tabla II. Principales especies acuícolas producidas en el Ecuador (expresado en toneladas métricas por año) (Adaptado de documento FAO, 2019).....	14
Tabla III. Microalgas utilizadas en los experimentos, con su código experimental, tamaño celular, tamaño de apéndices-flagelos y masa seca.....	26
Tabla IV. Ración alimenticia diaria de microalgas en el experimento monoalgal, expresada en mg de masa seca por L.....	Apéndice
Tabla V. Ración alimenticia diaria de microalgas en el experimento bialgal, expresada en mg de masa seca por L.....	Apéndice
Tabla VI. Longitud media de la concha $\pm$ EE, supervivencia $\pm$ EE y tasa de crecimiento de larvas de <i>Striostrea prismatica</i> alimentadas con diferentes dietas monoespecíficas desde el día 8 (Fase 1) hasta el día 20 (Fase 2).....	46
Tabla VII. Longitud media de concha $\pm$ EE, supervivencia $\pm$ EE y tasa de crecimiento de larvas de <i>Striostrea prismatica</i> alimentadas con diferentes mezclas bialgales desde el día 8 (Fase 1) hasta el día 20 (Fase 2).....	47
Tabla VIII. Tamaño dorso-ventral ( $\mu\text{m} \pm$ EE) y asentamiento ( $\% \pm$ EE) de larvas pedivelíger de <i>S. prismatica</i> sometidas a diferentes tipos de sustrato.....	49
Tabla IX. Composición de ácidos grasos de las microalgas utilizadas en los experimentos.....	49
Tabla X. Composición de ácidos grasos de <i>Striostrea prismatica</i> al día 1, 8 y 22 PF.....	53

## CAPÍTULO 1

### 1.1. Introducción

La ostra de roca *Striostrea prismatica* (Gray, 1825) está reportada geográficamente en las costas del Pacífico tropical americano, asociada con sustratos rocosos inter y submareales entre Baja California en México y Máncora en Perú (1), donde a través del tiempo ha sido sustento para muchas de las comunidades que viven cerca de la línea costera (2). En Ecuador se encuentra en toda la costa, desde Esmeraldas hasta Data de Posorja y aunque es considerada como un recurso importante es una especie poco estudiada.

México, es el único país que posee registros continuos de la extracción de *Striostrea prismatica*, considerándola como una especie amenazada y sujeta a fuerte presión de captura lo que ha obligado al establecimiento de vedas (3). En nuestro País, a la fecha no existen reportes cuantitativos continuos y adecuados de su extracción, que permitan diagnosticar el estado de sus poblaciones, no obstante, la disminución de la talla de extracción y la baja en la abundancia, con el consecuente mayor esfuerzo pesquero expuesto por sus extractores, conducen a dilucidar que los bancos se encuentran en una fase de explotación crítica (2).

Debido a la poca información disponible del recurso y la alta importancia biológica-económica, la necesidad de restaurar sus poblaciones y/o establecer producción acuícola, el CENAIM-ESPOL inició una serie de investigaciones conducentes a la producción de semillas de *Striostrea prismatica*, en este sentido Loo & Sonnenhlzner (4) estudiaron la reproducción de la especie en poblaciones de Ayangué

(Provincia de Santa Elena) y Playas (Provincia de Guayas) en Ecuador, estableciendo que la temperatura y salinidad son factores influyentes. Estos elementos básicos fueron utilizados por Arguello-Guevara et al. (2) para determinar una estrategia de acondicionamiento reproductivo en el laboratorio. Posteriormente estas técnicas permitieron caracterizar el desarrollo embrionario, larvario y la producción de semillas hasta 5 mm, estableciendo los métodos iniciales del cultivo (5); no obstante, se necesita más investigación con la finalidad de optimizar la producción masiva de semillas de *Striostrea prismatica*.

Al igual que con otras especies acuícolas, la elección de las microalgas para ser utilizadas como alimento en el cultivo larvario de moluscos influye en gran medida sobre el éxito de esta fase, siendo la selección de éstas determinantes en el crecimiento y la supervivencia (6)(7)(8)(9)(10)(11). Es también muy importante considerar una variedad de factores previo a elegir especies de microalgas para alimentación larvaria, entre estos, la tasa de crecimiento, el tamaño de las células, composición nutricional, digestibilidad y pigmentación (12)(13). En larvicultura de moluscos los géneros de microalgas más comunes utilizados son *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Tisochrysis*, *Pavlova*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* y *Thalassiosira* (14)(15)(8), cuya variabilidad en la calidad nutricional se encuentra en su composición bioquímica (16). En relación con esto, la importancia de los ácidos grasos esenciales Eicosapentaenoico (EPA), docosahexaenoico (DHA) y Araquidónico (AA) así como su influencia sobre el crecimiento y supervivencia de larvas de bivalvos ha sido demostrada a través del tiempo en varias investigaciones(17)(18)(19)(20)(21). Las mismas que conciden al afirmar que al igual que con todos los animales acuáticos, los lípidos son la principal fuente de energía para las larvas de bivalvos (dentro de esta fracción: los ácidos grasos), definidas como factores clave para determinar el rendimiento larval (22) (23).

Otro factor importante para el establecimiento de un protocolo de producción de semillas de moluscos bivalvos es el uso de sustratos adecuados para la fijación durante la metamorfosis, situación que es catalogada como una de las principales causas que dificultan la actividad comercial de bivalvos (24).

## 1.2. Objetivo general

Evaluar el efecto de dietas monoalgales y bialgales en la supervivencia y el desarrollo de larvas, así como, cinco diferentes sustratos para el asentamiento de larvas en la búsqueda de procedimientos óptimos para la producción masiva de *S. prismatica* para fines de acuicultura o restauración ecológica.

## 1.3. Objetivos específicos

- a) Describir el ciclo de vida temprano de la ostra de roca.
- b) Determinar el efecto de dietas monoalgales y bialgales sobre la supervivencia y el desarrollo larvario.
- c) Evaluar diferentes sustratos para el asentamiento de larvas competentes de *Striostrea prismatica*.
- d) Determinar el perfil de ácidos grasos en microalgas y larvas en tres días específicos y su interacción en el desarrollo larvario de la ostra nativa.

#### 1.4. Marco teórico.

Los invertebrados en general representan más del 99% de la diversidad animal, no obstante, según Lydeard (25) atraen pocos esfuerzos de investigación. Dentro de este grupo, los moluscos bivalvos se destacan por ser uno de los más grandes, diversos e importantes, constituyéndose en un filo rico que contiene abundantes especies que han colonizado con éxito una variedad de hábitats (26). Existen actualmente más de 50.000 especies descritas, siendo alrededor de 30.000 encontradas en el mar (27). Su reporte de distribución los incluye como habitantes típicos de los esteros, desembocaduras de ríos, lagunas costeras y de todas aquellas formaciones litorales en las que se mezclan las aguas marinas con las continentales.

Los bivalvos tienen características biológicas específicas del grupo, por ejemplo: poseen un caparazón con dos valvas laterales, generalmente simétricas, las mismas que están unidas por una charnela y ligamentos que se cierran por acción de uno o dos músculos aductores. Son de hábitat mayormente marinos, pocos son de agua dulce (28) y se los puede encontrar enterrados en fondos blandos, fijos de superficies y estructuras rígidas o libres sobre los fondos, incluso algunas especies perforan el sustrato (roca o madera) y otras más son comensales o parásitas (26).

Tienen simetría fundamentalmente bilateral formando dos valvas calcificadas, las cuales se encuentran articuladas dorsalmente entre sí y encierran por completo al cuerpo blando. La forma de la concha es muy variable, siendo un factor importante para ello el sitio, tipo y forma del sustrato sobre el cual se desarrolla. Por ejemplo, la ostra de piedra *Striostrea prismatica* posee la valva derecha, dorsal o superior aplanada y la izquierda, ventral o inferior es cóncava o excavada (29).

Desde el punto de vista de producción acuícola, cumplen un rol muy importante como fuente de proteína barata y es el sector que mantiene un permanente aumento en el tiempo. La acuicultura en 2014 alcanzó un hito cuando la contribución del sector acuícola superó por primera vez la del pescado capturado en el medio natural (Fig. 1). Dentro de este rubro la producción de bivalvos tiene una trascendencia importante, consistiendo su explotación sustento económico de muchos países donde se realiza la actividad.

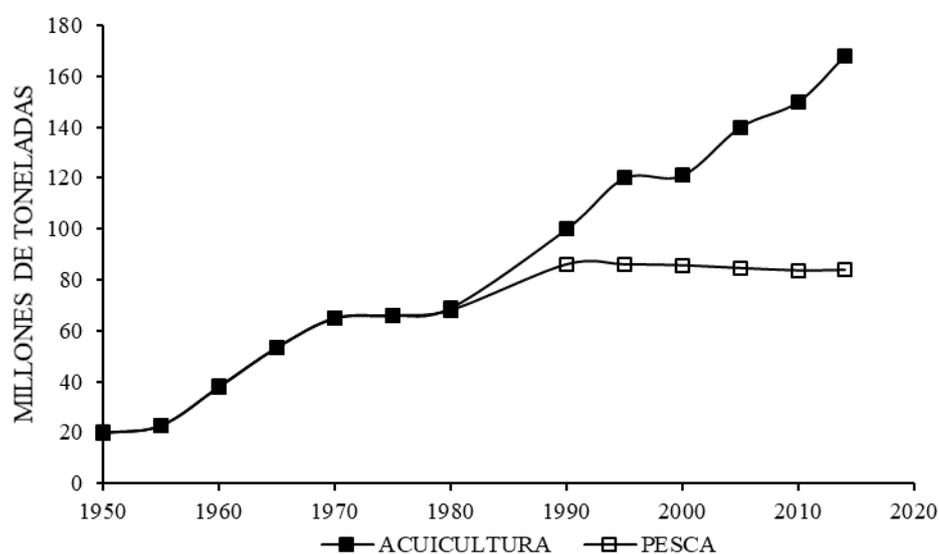


Figura 1. Estadístico comparativo entre la producción de especies acuícolas y la extracción pesquera. (Adaptado de documento FAO, 2019)

En el 2018 la FAO reportó que, en el año 2016, la producción acuícola ascendió a 80 millones de toneladas, (231.600 millones de USD) desglosadas como sigue:

- 54,1 millones de toneladas de peces (138.500 millones de USD).
- 17,1 millones de toneladas de moluscos (29.200 millones de USD).

- 7,9 millones de toneladas de crustáceos (57.100 millones de USD).

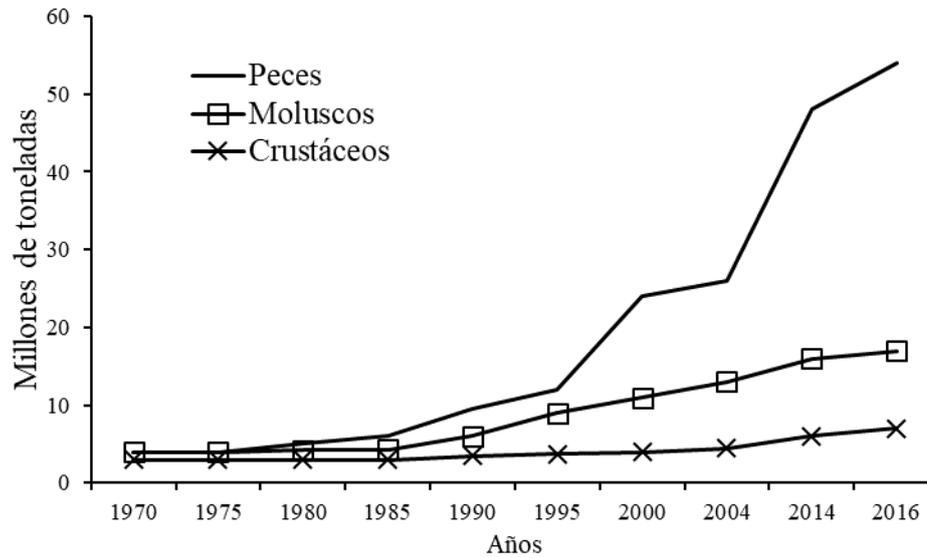


Figura 2. Estadístico comparativo global entre la producción de peces, moluscos y crustáceos en función del tiempo. (Adaptado de documento FAO, 2019).

Los peces cultivados son evidentemente quienes encabezan la producción acuícola; no obstante, la tendencia en la producción de moluscos y otros productos marinos se incrementa a través el tiempo (Fig. 2). Ello consolida la importancia del cultivo de moluscos bivalvos cuya dominancia la establecen los Países Asiáticos como se muestra en la Fig. 3.

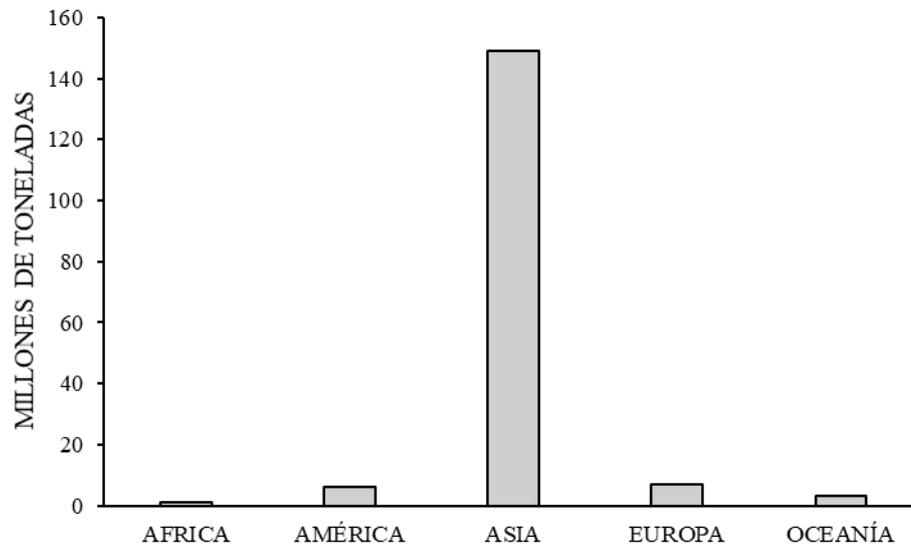


Figura 3. Producción actual acuícola de moluscos por continentes (Adaptado de documento FAO, 2019).

Dentro de este grupo de moluscos, los ostreidos son quienes contribuyen con un porcentaje importante del global producido (Aprox. 36%), seguido de las almejas con un 35% de participación, y por último las vieiras y los mejillones con un aporte aproximado el 14% cada uno. Los moluscos utilizados para la producción de mabes y perlas contribuyen con un 0,01% de todo lo producido (en el año 2017). Los volúmenes producidos de ostreidos y los otros grupos producidos se muestran en la Fig. 4.

La producción a escala global esta dominada por Asia, con aproximadamente un 90% de participación, es decir, que sólo un 10% es producido en los otros continentes. La tabla 1 muestra lo expuesto y señala un *top 20* de los países con mayor producción por acuicultura (al 2017).

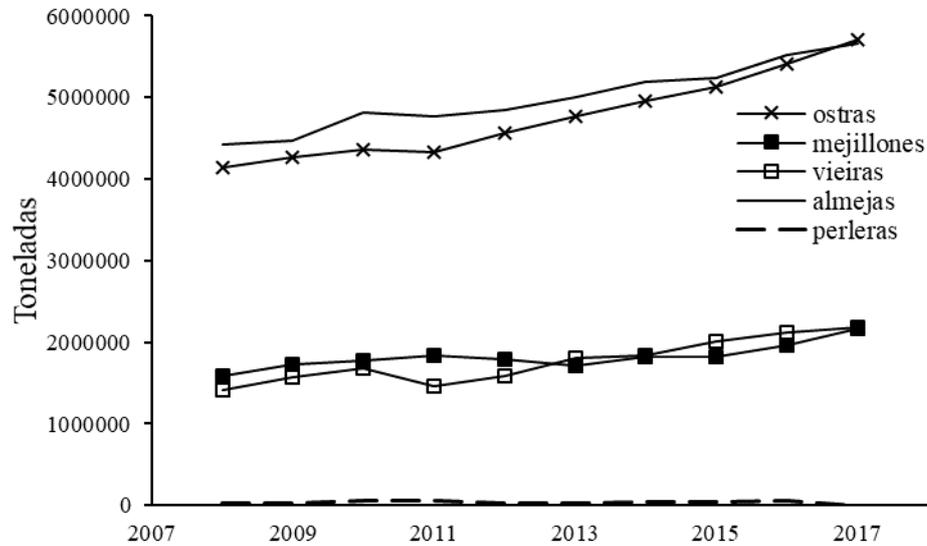


Figura 4. Producción de moluscos por grupos (Adaptado de documento FAO, 2019).

Externamente existen registros de exportación desde Nicaragua hacia El Salvador y los EE. UU. Lo cual motiva el estudio de la especie en la presente investigación buscando dilucidar aspectos ontogénicos tempranos que conlleven a a una explotación masiva que finalmente desencadene en el autosustento de la especie y el crecimiento económico de la región.

Tabla 1. *Top 20* de los principales Países productores acuícolas, se muestra la cantidad de producto producido en el 2017 (TM= toneladas métricas) y su porcentaje de participación (Adaptado de documento FAO, 2019).

Puesto	País	TM	%
			Participación
1	China	47,611,840	62,1%
2	India	5,235,017	6,8%
3	Indonesia	4,379,970	5,7%
4	Viet Nam	3,438,378	4,5%
5	Bangladesh	2,060,408	2,7%
6	Noruega	1,380,839	1,8%
7	Egipto	1,174,831	1,5%
8	Chile	1,045,790	1,4%
9	Myanmar	998,906	1,3%
10	Tailandia	897,096	1,2%
11	Filipinas	781,798	1,0%
12	Japón	703,935	0,9%
13	Brasil	574,53	0,7%
14	Corea del Sur	479,36	0,6%
15	Ecuador	426,41	0,6%
16	EE.UU	425,973	0,6%
17	Irán	346,118	0,5%
18	Nigeria	316,727	0,4%
19	Taiwán	313,372	0,4%
20	España	289,82	0,4%

A lo largo de su distribución *S. prismatica* presenta tallas máximas entre 100-130 mm en Costa Rica (30), colonizando la zona intermareal y sublitoral a no más de 10 metros de profundidad (31)(32), en Ecuador se han observado ejemplares de más del

doble de longitud (observaciones por buceo). En México en cambio (33) reportan tallas que van de 50 a 176 mm.

*Striostrea prismatica* es filtradora por excelencia, la especie presenta sexos diferenciados, aunque el sexo puede variar entre uno y otro desove, pudiendo un año desovar como hembra y el otro como macho. En este sentido, los periodos de desove han mostrado ser muy diversos en las distintas regiones estudiadas, así por ejemplo en Costa Rica se encontró periodos de desove entre agosto y marzo (30); mientras en México ocurren en periodos de descenso de salinidad y un incremento de temperatura, es decir, entre junio-septiembre (34)(35)(36).

A escala experimental en laboratorio Loosanoff y Davis (37) iniciaron con el desarrollo de métodos que potenciaban las condiciones naturales, determinando los parámetros óptimos que favorecían el éxito del cultivo en moluscos bivalvos, considerando además factores biológicos, técnicos, ambientales y económicos, donde es primordial un buen manejo de parámetros de calidad de agua (7), además de una alimentación que satisfaga las necesidades nutricionales, la misma que se han basado comúnmente en una o más especies de microalgas (38), que sobre todo aporten un alto contenido de ácidos grasos esenciales, siendo los géneros más comunes para la alimentación: *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* y *Thalassiosira* (14)(8).

En el Ecuador *C. gigas* es el único molusco producido, por lo tanto, ningún otro bivalvo es registrado dentro de las actividades acuícolas en nuestro País. Ello justifica el interés por desarrollar paquetes productivos con moluscos nativos de interés en toda la región. Además, no existen reportes cuantitativos que demuestren la explotación pesquera de *S. prismatica* en Ecuador; sin embargo, en la región es uno de los moluscos más consumidos satisfaciendo la demanda local de las poblaciones

costeras y el turismo, lo que ha contribuido a que su extracción sin regulación esté llegando poco a poco al declive de sus bancos. Un estudio realizado en Ayangue demostró un total 350 ostras (0,88 organismos por m<sup>2</sup>) en cuatro sitios de captura en un área de cobertura de 400 m<sup>2</sup> (39), lo cual es un efecto negativo directo de la extracción, este mismo efecto influye también sobre el mantenimiento de la especie, pues afecta la tasa de fecundación que como en la mayoría de los bivalvos es externa (40).

En otros Países ocurre el mismo problema, por ejemplo, en Perú la ostra de roca ha sido consumida desde tiempos inmemoriales, además de ello sus valvas se han utilizado para confección de utensilios (32); en México se constituyó en su momento en una importante pesquería (33), incluso en Costa Rica su excesiva extracción ha llevado a la casi desaparición de este rubro (29). A pesar de lo expuesto son escasas las investigaciones dirigidas a la producción de semillas. En nuestro País, se han conseguido avances importantes, entre ellos, establecer un acondicionamiento reproductivo fisiológico adecuado y la consecuente inducción del desove (2), determinando el comportamiento de madurez gonadal anual de la especie (4). Seguidamente Lodeiros et al. (5) en su descripción consiguió el desove de siete hembras que produjeron 200 millones de ovocitos competentes para la fertilización, con un rango de 26 a 50 millones de ovocitos por hembra. Esto demostró que *S. prismatica* es un buen engendrador para la producción de semillas en criaderos.

Si bien, algunos estudios y esfuerzos para inducir la reproducción de *S. prismatica* se han realizado con descripciones de los procesos embrionarios y larvarios (2), estos estudios se desarrollaron por debajo de lo óptimo ya que el desarrollo larvario no alcanzó la etapa postlarval y semillas, o la semilla producida fue escasa (5).

El requerimiento lipídico-nutricional en el proceso de cultivo de la ostra nativa se desconoce, a pesar de que la influencia de la composición lipídica de las microalgas en el desarrollo larvario de moluscos ha sido ampliamente descrita (41)(42)(43)(14)(6)(21). Demostrándose la importancia de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) 20:5(n-3) (EPA) y 22:6(n-3) (DHA), por ejemplo, en *Crassostrea gigas* (44), *Ostrea edulis* (20), *Mytilus galloprovincialis* (21), *Perna perna* (23) y *Nodipecten nodosus* (45). Otro ácido graso importante en larvarios de moluscos es el 20:4(n-6) (AA) que también ha sido asociado con larvas de mayor crecimiento, supervivencia y con menor estrés (46). Resumiendo, el crecimiento larval y la supervivencia dependen directamente de la calidad de las reservas grasas proveídas en las dietas (11).

En *S. prismatica* el proceso embrionario donde se desarrollan cambios morfológicos tempranos termina con la aparición de la larva “D” y este ocurre en alrededor de 24 horas (5), luego de ello el desarrollo larvario se extiende hasta los 22 días post fertilización hasta alcanzar semillas de 5 mm en 60 días aproximadamente. Esta etapa del desarrollo larvario no cuenta con mayores aportes en la fisiología y las necesidades de alimentación (demanda lipídica), ni mucho menos como es la dinámica de esta durante el proceso larvario. Sumado a ello, la evaluación de sustratos para la metamorfosis tampoco se ha descrito, siendo esta etapa considerada el cuello de botella de toda operación acuícola (24), la misma que consiste en el cambio de morfología de las larvas para dejar de ser libres nadadoras y pasar a ser bentónicas. El éxito en este proceso depende de las reservas lipídicas de las larvas (47)(48), la calidad físico-química del agua y las características superficiales del sustrato (49).

Con esta investigación se plantea resolver las interrogantes más sobresalientes del desarrollo embriogénico y larval de la especie, y luego comparar la eficiencia de siete dietas microalgales y su relación con la supervivencia y el crecimiento de *Striostrea*

*prismatica*, contrastando el perfil de ácidos grasos esenciales para este estado crítico de su ciclo vital, todo esto con la consecuente generación de información aplicable y cuyos resultados conduzcan a ampliar la acuicultura y/o empezar procesos de repoblación de esta especie de importante consumo en nuestro País.

## CAPÍTULO 2

### La acuicultura en el Ecuador

#### 2.1. Reseña de la acuicultura en el Ecuador

La acuicultura en el Ecuador tuvo su origen a finales de los años 60, cuando nativos costeros observaron buen crecimiento de camarones en pozas naturales de zonas salinas y de influencia estuarina. A partir de ese momento es evidente el crecimiento exponencial de la explotación acuícola de camarón (50), a tal punto que, en 1.982, el país se constituyó en el primer exportador mundial de camarón *Penaeus vannamei* con una producción de más de 11.400 TM (51). Este mismo autor reporta en 1.983 aproximadamente 35.000 Ha en producción y otras 10.000 en construcción, con una productividad promedio de 500 kg/Ha/año (52).

La superficie de las camaroneras ascendió a 175.660 Ha entre 1969 y 2006 (53), y según datos de la cámara nacional de acuicultura ya en julio de 1999 Ecuador contaba con 2015 camaroneras, alcanzando una producción cercana a 154.000 TM (54). Recientemente (2019) se exportaron 633,890 TM de camarón lo que significó 3.653 millones de dólares (Cámara Nacional de Acuicultura, 2019), estos datos estadísticos son muy significativos y denotan el crecimiento evolutivo e importante de la

acuicultura del camarón en nuestro País. En este mismo sentido, dado al éxito del camarón y las condiciones idóneas para la actividad acuícola en el país, a través del tiempo ha existido cierto interés de ampliarla con otras especies; sin embargo, aún no se ha conseguido superar la expectativa y el ingreso económico que genera el cultivo de camarón (Tabla II).

Tabla II. Principales especies acuícolas producidas en el Ecuador (expresado en toneladas métricas por año) (Adaptado de documento FAO, 2019).

Especie	Años						
	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
<i>Oreochromis niloticus</i>	48000	39818	23920	23900	17400	22620	23050
<i>Aequidens rivulatus</i>	2	2	2	2	2	-----	-----
<i>Piaractus brachypomus</i>	900	935	960	1000	1000	35	40
<i>Dormitator latifrons</i>	100	100	100	100	500	25	-----
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	500	500	3200	3200	4500	6051	6000
<i>Rachycentron canadum</i>	-----	-----	-----	-----	-----	347	350
<i>Penaeus vannamei</i>	260000	281100	304000	340000	403000	422000	435000
<i>Crassostrea gigas</i>	-----	-----	-----	-----	3	8	10

----- Ese año no se registraron producciones.

## 2.2. Antecedentes del Cultivo de especies no tradicionales en el Ecuador

Debido a la aparición de enfermedades devastadoras en el sector camaronero, los acuicultores se vieron obligados a evaluar nuevas opciones de cultivo. Dentro de estas especies estuvo la tilapia roja; con esta especie introducida se buscó recuperar el sector en 1.992 cuando el Síndrome de Taura definido como una alteración sistémica

de origen infeccioso, causada por el virus del mismo nombre -TSV- (55) afectó la industria camaronera, la misma que se aceleró con la catastrófica enfermedad de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés). Ante estos sucesos se optaron estrategias para mitigar los efectos del WSSV, como por ejemplo realizar policultivos de tilapia y camarón, lo cual, se realizó con relativo éxito, aunque con criterios divididos como el de Massaut & Rodríguez (56) quienes observaron competencia por el alimento afectando el crecimiento del crustáceo. Sin embargo, y a pesar de todo ello Ecuador llegó a constituirse también en un productor importante de tilapia en la región, siendo el 2.007 el año récord en producción de tilapia, exportando 12.390 TM lo que generó más de USD 77 millones, lamentablemente a partir de allí las producciones han decrecido paulatinamente a 2.115 TM generando casi USD 12 millones en el 2.016 (Cámara Nacional de Acuacultura, 2017), hasta llegar en la actualidad a producciones de 832,4 TM que generaron USD 4,21 millones en 2.018 (Cámara Nacional de Acuacultura, 2019)

Además de la tilapia roja se han introducido otras especies. Históricamente la primera fue la trucha arco iris en los años 30 (*Onchorynchus mykiss*) la misma que no prosperó en los ríos ecuatorianos, teniendo que reintroducirla, ahora si con éxito en los años 40, junto con la trucha marrón (*Salmo trutta*), que no logró adaptarse a los ríos andinos. En los años setenta en cambio se introdujo la trucha habana (*Salvelinus fontinalis*) que tampoco tuvo éxito, al momento, en todos los sistemas hidrográficos de altura del Ecuador habita únicamente la trucha arco iris (57).

Aunque con menor relevancia, también se ha considerado la producción acuícola en agua dulce. Saénz (58) afirma que en el 2.008 se contaba con 1.000 piscicultores en Ecuador, siendo la mayoría relativos a cultivos artesanales en la Amazonía, donde se cultiva a pequeña escala tilapia, chame, cachama y paiche, esta última especie luego de diversos ensayos de cultivo muestra resultados alentadores (59). Así mismo, el

cultivo del Chame (*Dormitator latifrons*) ha mostrado algunos avances en la región costa, particularmente Chone, además de ello se reporta actividad en Esmeraldas, Guayas y Los Ríos (60). En este sentido, Delgado (61) sustentan ese registro informando que en el 2.012 se exportaron 276,05 TM generando un ingreso de \$1,5 millones, la actividad inclusive ha aportado en su máximo apogeo con 124 millones de dólares al PIB del país. Actualmente la acuicultura de agua dulce tiene su mayor desarrollo en la región interandina, básicamente con los centros de cultivo de la trucha Arco Iris.

Según López-Alvarado (62) entre las especies con las que se ha buscado diversificar la acuicultura se encuentran *Penaeus stylirostris* (camarón blanco), *Sciaenops ocellatus* (corvina roja), *Seriola rivoliana* (huayaípe), *Cherax quadricarinatus* (langosta australiana o redclaw), *Procambarus clarkii* (cangrejo rojo americano), *Xiphophorus hellerii* (cola de espada o xipho), *Gambusia affinis* (pez mosquito) y *Poecilia reticulata* (guppy), estas dos últimas son especies empleadas en la acuariofilia, cuya introducción fue motivada por un proyecto para el control biológico de mosquitos en las provincias del Guayas, El Oro y Manabí; en este mismo sentido, la alta diversidad de peces que habitan las zonas Napo y Pastaza, ha contribuido para que algunas especies sean comercializadas y exportadas para la acuariofilia en los Estados Unidos y Europa (57).

De los países considerados megadiversos de la región, Nava-Flores et al. (59) reportaron que México con 27 especies y Brasil con 22, son los que explotan mayor diversidad de organismos a escala experimental y productiva; contrario a ello, Ecuador, que comparte la cuenca amazónica y su biodiversidad, no registra un desarrollo acuícola importante con especies locales. De su parte el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, desde su creación en los años 90 ha aportado continuamente con investigaciones dirigidas a la domesticación de especies

de interés comercial y cultural, entre estas, las especies de moluscos *Crassostrea gigas* (introducida), *Argopecten ventricosus*, *Nodipecten subnodosus*, *Spondylus limbatus*, *Spondylus crassisquama*, *Pteria sterna*; los peces *Seriola rivoliana*, *Paralichthys woolmani*, *Centropomus* sp., *Rachycentron canadum* (introducida) y los equinodermos *Isostichopus fuscus*, *Holoturia thelii* y *Tripneustes depressus*.

### 2.3. Experiencias en el cultivo de moluscos bivalvos

En el Ecuador la primera especie de molusco producida a nivel de laboratorio fue *Crassostrea gigas* (63) en 1.990. A partir de allí CENAIME ha trabajado para proveer al sector de paquetes productivos con especies de bivalvos de importante consumo. Inicialmente, se trabajó en conseguir la tecnología de producción de *C. gigas* y el scallop *A. ventricosus* mediante el mantenimiento y maduración de reproductores, producción de semillas y cultivo de juveniles en camaronera y mar. Se logró cerrar el ciclo y establecer el protocolo de producción de semillas desarrollando el engorde de ostras en sistemas de policultivo ostra-camarón en los años 90, así como sistemas de mar. En el 2.006 el Programa de Manejo de Recursos Costeros (PMRC) contrato al CENAIME para desarrollar la metodología de producción de semillas de *Spondylus* sp., gracias a ello se logró documentar los estadios larvarios.

Desde esta perspectiva a partir del año 2.014 y como parte del proyecto “Desarrollo de protocolos de domesticación para el uso sostenible para nuevas especies marinas para consumo de alimentos y repoblación de bancos naturales” ejecutado por el CENAIME y financiado por la SENESCYT se han conseguido resultados muy importantes y alentadores con las especies nativas *Striostrea prismatica* (2)(4)(64)(5), *Nodipecten subnodosus* (65)(66) y *Pteria sterna* (67), cuyos avances se encuentran disponibles en revistas especializadas. Así mismo, se han desarrollado ensayos de

factibilidad de cultivo con *C. gigas* en sistemas de cultivo suspendido (68), reservorios de camaronera y zonas de influencia estuarina (69) con muy buenos resultados.

En la actualidad, se está desarrollando acuicultura de bivalvos a pequeña escala (*Crassostrea gigas*), gracias a la iniciativa de dependencias del estado quienes formaron varias cooperativas para la producción de moluscos. Es importante destacar que esta iniciativa la ejecutan pequeños grupos de pescadores como alternativa a su principal actividad, contando incluso con apoyo técnico y económico de instituciones educativas y gubernamentales. Esta actividad de engorde se lleva a cabo en sistemas de cultivo suspendido (*long line*) expandiéndose por varios sectores de la costa del Ecuador, y cuyos resultados han cumplido las expectativas a tal punto que hasta el momento (2.020) han incrementado la cantidad de líneas de cultivo en funcionamiento y existen proyectos que ampliarán la producción del molusco desde la producción de semillas (laboratorio) hasta el engorde (implementación de líneas de cultivo).

Desde otra perspectiva y con la finalidad de restaurar bancos naturales de especies icónicas culturales, se han desarrollado estrategias para la producción de semillas de *Spondylus limbatus* (49)(70)(71) y *Spondylus crassisquama*. De esta primera se inició la introducción de organismos cementando juveniles en la reserva marina El Pelado, en la Provincia de Santa Elena, Ecuador y la segunda se encuentra en fase exploratoria evaluando actualmente dietas en juveniles producidos en CENAIM bajo condiciones controladas de laboratorio y condiciones de mar abierto.

## CAPÍTULO 3

### *Striostrea prismatica*

#### 3.1. Descripción de *Striostrea prismatica*

*Ostrea iridescens*, *Crassostrea iridescens*, *Crassostrea prismatica* o *Striostrea prismatica* son sinónimos de la ostra nativa, la misma que habita bajos rocosos e intermareales de alta producción de energía en el Pacífico tropical oriental, desde Baja California en México hasta Tumbes en Perú (1). En Ecuador se reporta a nivel de toda la costa (Fig. 5), donde representa uno de los recursos pesqueros más importantes de extracción (64).

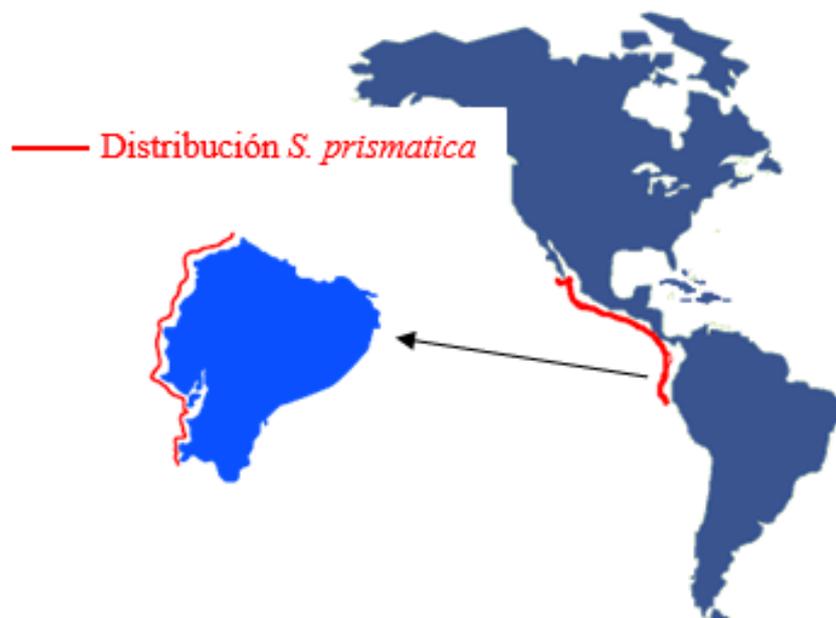


Figura 5. Distribución de la ostra de roca en el Pacífico Tropical oriental.

La superficie externa de la concha tiene textura subcórnea, de color púrpura o bronceado, con líneas concéntricas formadas por láminas provistas de finas y numerosas estrías radiales. La superficie interna es de textura densa, la valva derecha posee coloración aporcelanada blanquecina, excepto en la huella del músculo aductor la misma que varía de tono blanquesino a café rojizo, a menudo con un lustre iridiscente o metálico. En cambio, la valva izquierda tiene la huella del músculo aductor grande reniforme, de color variable desde blanquesino hasta café rojizo (Fig. 6).

La ostra nativa se distingue fácilmente por su gran tamaño, ausencia de costillas extensas, existencia de denticulos (cómatas) internos lateral a la charnela y sobre los amplios márgenes. Esta especie para llevar a cabo su ciclo biológico necesita sustratos sólidos que les permitan fijarse para crecer, desarrollarse y reproducirse (1).

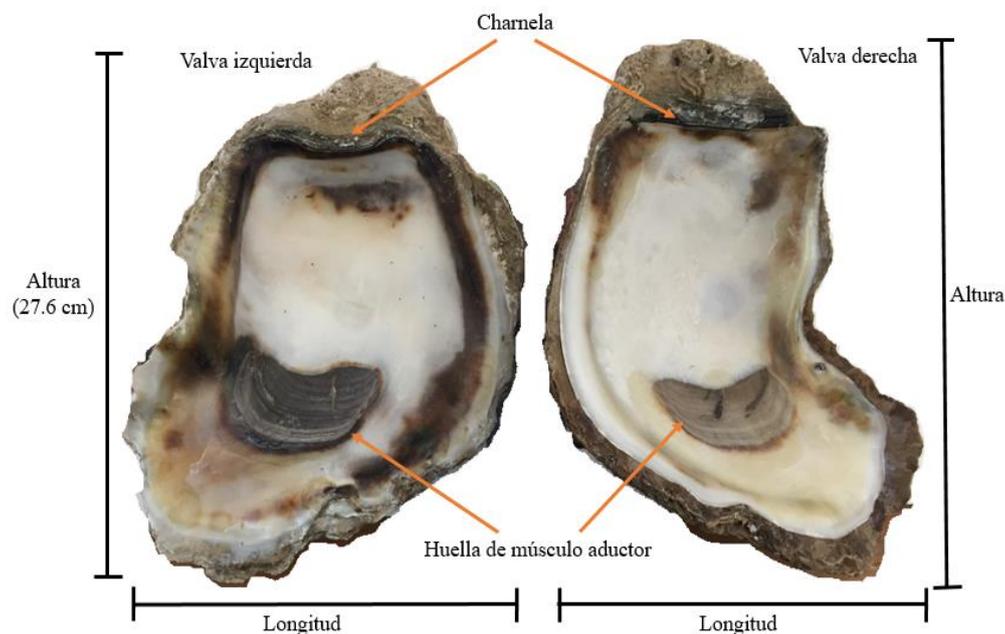


Figura 6. Vista interna de las valvas de organismo adulto de *Striostrea prismatica*: rasgos principales.

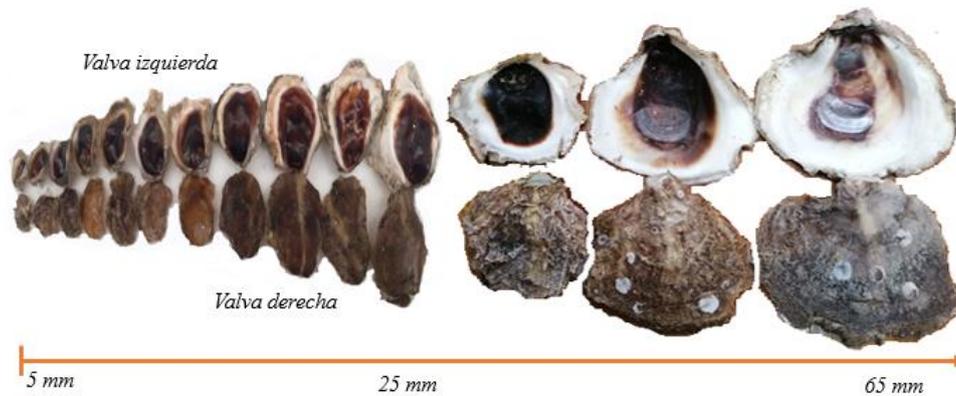


Figura 7. La figura muestra el tono café-rojizo en el interior de la valva izquierda (pegada al sustrato) en juveniles de *S. prismatica* obtenidos en laboratorio CENAIM.

En juveniles producidos en laboratorio, la superficie interna de la concha donde descansa el tejido blando es de tono café a café rojizo (Observación personal, Fig. 7), y la otra valva en cambio posee un brillo irisdecete, el mismo que también caracteriza a la especie para su descripción. Aunque estudios moleculares se sugieren debido a las diferencias entre las valvas de las ostras extraídas de manera artesanal y comercializadas bajo el nombre de ostra nativa, lo que se atribuye como especie putativa a *Striostrea prismatica*.

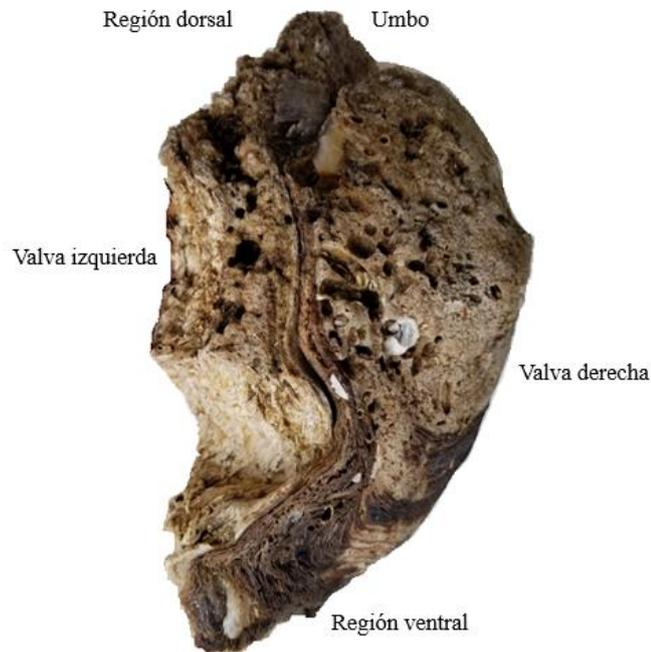


Figura 8. La figura muestra un ejemplar de *S. prismatica*, en el mismo se detalla los componentes considerados para la medición de longitudes.

### 3.2. Taxonomía

La clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Animalia

Filo: Mollusca

Clase: Bivalvia Linnaeus, 1758

Orden: Ostreoida Férussac, 1822

Familia: Ostreidae Rafinesque, 1815

Género: *Striostrea* Vialov, 1936

Especie: *Striostrea prismatica* Gray, 1825

Sinónimos: *Ostrea prismatica* Gray, 1825

*Ostrea iridescens* Hanley, 1854

*Crassostrea iridescens* Hanley, 1854

## CAPÍTULO 4

### Alimento vivo y perfil nutricional

#### 4.1 Importancia de las Microalgas y requerimiento nutricional de larvas de moluscos bivalvos.

A escala global, las microalgas son parte imprescindible en la acuicultura al ser una de las fuentes alimenticias más importantes, constituyéndose de este modo en alimento vivo para rotíferos, copépodos, artemia, peces, moluscos, crustáceos y equinodermos dado su valor nutricional y su habilidad para sintetizar y acumular grandes cantidades de ácidos grasos esenciales (72), vitaminas, minerales, sales, pigmentos y lípidos (73). Esta composición nutricional es maleable, debido que en su producción se podría modificar los ácidos grasos alterando las condiciones del cultivo (74)(75), estas condiciones pueden ser, entre otras la composición del medio de cultivo, aeración, disponibilidad de carbono, luz, fotoperiodo, temperatura de cultivo y pH (76).

La intensidad lumínica es uno de los principales parámetros a considerar en un cultivo (77). Por otro lado, la temperatura aumenta proporcionalmente la producción algal, por encima de lo ideal, aumenta la respiración y la fotorrespiración reduce la productividad global (78). Cada microalga necesita un rango determinado de pH que permita un crecimiento óptimo, que puede controlarse con un sistema automatizado de inyección de CO<sub>2</sub> (78), en este punto es importante considerar los costos asociados al uso de CO<sub>2</sub>. Finalmente, el nitrógeno es el nutriente más importante para las

microalgas (después del carbono) y se incorpora como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o como amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (79). Sumado a lo expuesto la aeración y la salinidad son también variables influyentes en la producción de biomasa algal, por lo que su control es también realizado.

Existen varias microalgas señaladas como adecuadas para el uso en la alimentación en el cultivo de moluscos bivalvos. Sin embargo, se debe considerar que, para una ingestión y digestión adecuada, características como la talla, morfología y el perfil nutricional (ácidos grasos) son influyentes, ante lo cual se requiere de estudios previos para poder formular dietas óptimas (22)(80)(81)(11). De esta manera, la búsqueda de dietas microalgales con elevado valor nutricional para el desarrollo larvario de moluscos bivalvos, es uno de los principales pasos para establecer un protocolo de producción de semillas (6)(7). Lo expuesto demuestra la estrecha relación que existe entre los moluscos bivalvos y su principal alimento: las microalgas.

Las microalgas para la evaluación de las dietas fueron *Tetraselmis chuii* (Tch), *T. suecica* (Ts), *Tisochrysis lutea* (Tl), *Pavlova lutheri* (Pl), *Chaetoceros gracilis* (Cg), *Chaetoceros muelleri* (Cm) y *Nannochloropsis* sp. (N), las cuales han sido ampliamente utilizadas en el cultivo de moluscos bivalvos (80). En ellas se ha relevado el aporte de ácidos grasos esenciales sobre todo en esta fase crítica y muy susceptible a afectaciones epizoóticas.

Actualmente, no existe información relativa a evaluación de dietas en larvas de *S. prismatica*. No obstante, Llor (64) evaluó las microalgas *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis maculata* en juveniles y Arguello et al. (2) acondicionaron reproductores en laboratorio para su posterior inducción al desove

utilizando *Ch. gracilis* e *I. galbana*. Ello justifica esta investigación como aporte para la consecución de semillas en condiciones controladas.

#### 4.2. Principales problemas en el cultivo de moluscos asociados a deficiencias en la dieta

Como ya se expuso anteriormente Loosanoff y Davis (37) empezaron con el desarrollo de métodos que potenciaban las condiciones naturales, considerando factores biológicos, técnicos, ambientales y económicos (78). En base a lo descrito hasta ahora, la elección de las microalgas cultivadas para ser utilizadas como alimento en el desarrollo larvario de moluscos es importante, y aseguraría el éxito de esta fase (6)(7). Durante la larvicultura, altas tasas de mortalidad han sido registradas debido a la no digestión, en algunos casos por la composición de la pared celular de algunas microalgas (82)(83). Otras veces el perfil de los ácidos grasos, que son los que influyen directamente en el crecimiento de los moluscos, por ejemplo, DHA, EPA y AA (84)(85)(86).

En *Mytilus edulis*, Vivanco et al. (87) registraron mortalidades masivas evidenciando deficiencia nutricional en las microalgas aisladas y dietas artificiales. Esto, se ha observado también en juveniles de *Ruditapes philippinarum* alimentados con dieta seca y microalgas vivas. En cambio, juveniles de *C. gigas* y *Ostrea edulis* necesitaron un 30% a 50% de microalga viva para equilibrar el desempeño (88). Esto ha llevado a que autores sugieran combinaciones de diferentes especies de microalgas, asegurando de esta forma proveer un mejor balance nutricional que permitan un buen crecimiento, lo que probablemente no se conseguiría con la administración de una dieta compuesta solo por una especie (89)(90).

La facilidad para la ingestión de las microalgas se relaciona además con las características físicas (tamaño, forma, motilidad, presencia de flagelos y espinas), tal y como lo han descrito (91)(92), quienes han señalado que estas características son probablemente la causa de la poca o nula aceptación de ciertas microalgas. Todas las variables expuestas han conducido a cierta especificidad, ya que las larvas de distintos moluscos muestran preferencia por una u otra microalga, como por ejemplo *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* en larvas de *C. gigas* (6), *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis suecica* en larvas de *M. galloprovincialis* (93) y *Pavlova lutheri* con *I. galbana* en larvas de *P. sterna* (94).

## CAPÍTULO 5

### Materiales y métodos

#### 5.1. Cultivo de microalgas

El cultivo se realizó en agua de mar filtrada (0,45  $\mu\text{m}$ ) e irradiada con luz UV (AMF), bajo condiciones de luz fluorescente permanente (47-67  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y aeración constante. Se Utilizó el medio f/2 (Guillard, 1975), enriquecido con metasilicato de sodio al 1% sólo para el cultivo de las diatomeas. La temperatura y salinidad fue  $20 \pm 0,5$  °C y  $34 \pm 0$  ppt, respectivamente ( $\pm$  DE). Para determinar la ración de dieta y equiparar la biomasa de alimento suministrado, se estimó la materia seca de las microalgas. En vista de ello se filtraron 200 mL de cada cultivo monoalgal en fase exponencial de crecimiento a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F utilizando un equipo Millipore de vacío. Las algas retenidas fueron lavadas con 4 mL de formiato amónico (0,5 M) para eliminar las sales, y luego se sometieron a deshidratación en una estufa universal MEMMERT, (modelo UF110PLUS) a 60 °C hasta conseguir peso

constante. El peso se determinó en una balanza analítica Metler Toledo, modelo M5205DU (0,001 g de precisión).

Su selección se realizó de acuerdo con el tamaño (entre 2,8 y 5  $\mu\text{m}$  para la fase I y entre 6 y 9  $\mu\text{m}$  en la fase II), garantizando que no sea una variable que afecte la ingestión en las larvas tanto tempranas como tardías (22). Una submuestra fue fijada con formol al 3,7 % para realizar las medidas de las células con la ayuda de un microscopio óptico a 100X, usando una cámara fotográfica digital y el software Nahwoo iworks 2.0. Estas características (masa, talla de la célula, apéndices-flagelos y quetas) son mostradas en la tabla III.

Tabla III. Microalgas utilizadas en los experimentos, con su código experimental, tamaño celular, tamaño de apéndices-flagelos y masa seca.

Clase	Género/especie	Código	Tamaño ( $\mu\text{m}$ cell <sup>-1</sup> )	Tamaño apéndices y flagelos	Masa seca celular (pg)
Clorophyceae	<i>Tetraselmis chuii</i>	<i>Tch</i>	8,8 $\pm$ 1,4	10,7 $\pm$ 1,0	178
	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Ts</i>	8,9 $\pm$ 1,3	12,1 $\pm$ 0,9	166
Prymnesiophyceae	<i>Tisochrysis lutea</i>	<i>Tl</i>	5,0 $\pm$ 0,5	ND	40
	<i>Pavlova lutheri</i>	<i>Pl</i>	5,0 $\pm$ 0,6	ND	53
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros gracillis</i>	<i>Cg</i>	6,6 $\pm$ 0,7	15,1 $\pm$ 1,5	62
	<i>Chaetoceros muelleri</i>	<i>Cm</i>	7,0 $\pm$ 1,2	29,6 $\pm$ 6,1	82
Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis</i>	<i>N</i>	2,8 $\pm$ 0,2	ND	13

Promedio  $\pm$  DE, n = 30. ND= No determinado

## 5.2. Reproductores de *Striostrea prismatica*

Quince reproductores de *S. prismatica* [longitud=  $131,9 \pm 23,8$  mm y altura=  $106,4 \pm 16$  mm, ( $\pm$  DE)] fueron obtenidos en marzo 2017, en los bajos naturales de la Bahía de Ayangue ( $1^{\circ}59.0'S$ ;  $80^{\circ}45.58'O$ ), Santa Elena, Ecuador, y transportados en un contenedor isotérmico con AMF hasta las instalaciones del CENAIM. En el laboratorio los animales fueron colocados en un tanque de 500 L, sin alimentación, aeración moderada y flujo continuo con AMF a 34 ppt por 72 h, con la finalidad de depurarlos previo a la inducción al desove.

### 5.2.1. Inducción al desove

Se utilizó el protocolo de inducción descrito por Arguello-Guevara et al. (2), con modificaciones hechas por Lodeiros et al. (5). La inducción se realizó estimulando los organismos mediante desecación por 1,5 h, luego fueron expuestos por 2 ocasiones cada 30 min a *shock* térmico, con cambios bruscos de temperatura de 26 a 30 °C y viceversa. Bajo este mismo procedimiento se realizó un segundo desove en abril 2017 con 15 ejemplares obtenidos en el mismo sitio y bajo similares condiciones para evaluar dietas bialgales. Los gametos liberados, en primera instancia espermatozoides, se produjeron 90 min después del estímulo térmico observando que la adición de esperma aceleró el proceso de desove.

### 5.3. Descripción embrionaria y larvaria de *Striostrea prismatica*

Los gametos se concentraron en diferentes recipientes, y los ovocitos se mezclaron con esperma activo en una proporción de 1:10 (ovocito:esperma). Paralelamente y al comienzo del experimento, se prepararon tres réplicas en beakers de 1 L derivadas del tanque de incubación a una densidad de  $20$  oocitos. $\text{mL}^{-1}$  para estimar el tiempo de las diferentes etapas embriogénicas. Muestras de 1 mL a 5, 10, 15 y 30 min durante las primeras 3h, luego cada 30 min en las 6h siguientes, y luego cada hora, se analizaron para

determinar cada cambio morfológico en la etapa embriogénica hasta obtener larvas trocóforas y larvas D. El tiempo de inicio de cada etapa embrionaria se determinó cuando se observó > 60% de los organismos.

Para la descripción larvaria diariamente se tomaron muestras por triplicado de los tanques en cultivo para registrar el crecimiento y la supervivencia. Se seleccionó una muestra aleatoria de tamaño  $n= 20$  para obtener la longitud promedio de todas las etapas embrionarias y larvarias en cada réplica. Las imágenes se capturaron utilizando una cámara digital (Lanoptik 5MP) acoplada a un microscopio óptico (Olympus CX31) y fueron analizadas con el software iWorks v.2.0. Las larvas se alimentaron con la dieta bialgal *Ch. gracilis* más *T. lutea* durante el cultivo larval con recambios de agua al 100% cada 2 días.

#### 5.4. Producción de larvas veligers para experimentos de dietas

Los huevos fertilizados se incubaron en tanques de 1000 L a una densidad de 20 huevos/mL<sup>-1</sup>, utilizando agua de mar filtrada a 1  $\mu\text{m}$  e irradiada con UV a una temperatura de  $27,1 \pm 1,5^\circ \text{C}$  y una salinidad constante de 34 ppt. Todos los embriones en desarrollo fueron transferidos a tanques de incubación de 1000 L ( $n= 2$ ), con observaciones hechas regularmente para asegurar que el embrión progresara normalmente. Inicialmente, las larvas mixotróficas D producidas 24 h PF se recolectaron a través de un tamiz de 30  $\mu\text{m}$  y se transfirieron a 3 tanques de incubación de 1000 L a una densidad de 6 larvas/ml, donde se cultivaron para tener un stock de larvas requeridas para evaluaciones de dieta monoalgal y evaluación de sustratos de asentamiento. Las larvas D se alimentaron con T1 durante los primeros 2 días PF y luego se alimentaron con la mezcla clásica nombrada en este experimento “control” (una combinación T1 + Cg, como se muestra en Lodeiros et al. (5)). Se realizó un segundo desove y se produjo larvas en las mismas condiciones para la evaluación de las dietas bialgales.

Las evaluaciones iniciaron en el tercer día PF buscando una clasificación selectiva de larvas, asegurando que solo aquellas de más de 70  $\mu\text{m}$  (longitud de concha) se mantuvieran con fines de evaluación.

### 5.5. Condiciones de cultivo de los experimentos monoalgales

Para estos experimentos se estableció un procedimiento de alimentación en base al cálculo previo de masa seca de las microalgas, con valores que van desde 1 a 2,2  $\text{mg/L}^{-1}$  en función de adecuar la ración al desarrollo larvario y mantener la masa homogénea en todas las dietas. El cálculo se realizó cada día antes de alimentar. Los experimentos (monoalgal y bialgal) fueron establecidos en dos fases, siguiendo la descripción general del desarrollo larvario en Lodeiros et al. (5). La fase I, fue establecida desde larvas veliger (3 días PF; larvas 75-77  $\mu\text{m}$ ) hasta el estadio de larvas umbonadas tempranas (día 8 PF) y la fase II desde la fase umbonada (día 11; larvas 120-150  $\mu\text{m}$ ) hasta obtener larvas con mancha ocular (día 20).

En el experimento monoalgal (experimento I) durante la fase I, las larvas veliger provenían de cultivos en tanques de 1000 L previamente alimentados con T1 como se indicó anteriormente, primero se evaluaron T1, P1, N y la dieta de control (T1 + Cg). Para la fase II, las larvas provenían de los mismos tanques de cultivo, pero alimentados con la dieta de control, en esta fase se evaluaron las mismas microalgas, incorporando las especies más grandes: Tch, Ts, Cg y Cm. Todos los experimentos (incluido el bialgal) se realizaron en recipientes cónicos de 50 L llenos de AMF a una densidad inicial de 2 larvas/ml utilizando 3 repeticiones por tratamiento y mantenidas con aeración moderada. Además, el agua de todas las unidades experimentales fue

reemplazada diariamente. La temperatura y la salinidad durante el experimento monoalgal fueron  $26 \pm 1,5$  ° C y  $34 \pm 0,1$  ppt, respectivamente.

#### 5.6. Condiciones de cultivo de los experimentos bialgales

Luego de la evaluación del crecimiento y supervivencia en el experimento monoalgal, se utilizaron las microalgas que mostraron mejor rendimiento (ver más adelante, sección resultados). En vista de ello, se establecieron tratamientos con las mismas condiciones, utilizando la combinación de Tl+Pl en proporciones 1:1, 1:3 y 3:1, y la dieta control para la fase I. Debido a que únicamente el tratamiento Pl resultó con buen crecimiento (obviando Cg que pertenece a la dieta control) y supervivencia en la fase II de evaluación monoalgal, se utilizó para la fase II bialgal en combinación con Cg (Pl+Cg) versus el control (Tl+Cg).

Para este fin, larvas del cultivo (segundo desove) con longitud DV  $77,1 \pm 3,1$  µm del día 3PF (para la fase I) y  $154 \pm 16,6$  µm ( $\pm$  DE) del día 11 (para la fase II) se colectaron en un tamiz con malla 60 y 80 µm respectivamente y fueron transferidas a tanques cilindro-cónicos de 50 L a una densidad de 2 larvas mL<sup>-1</sup>, con aeración moderada y cultivados bajo regímenes bialgales. Los tratamientos y sus réplicas (n=3) fueron asignados completamente al azar siguiendo los mismos procedimientos que en el ensayo de evaluación monoalgal.

Las dietas monoalgales y bialgales se racionaron en proporciones iguales(1:1). Para los desafíos en la fase I monoalgal y bialgal, las larvas veliger provenían de cultivos en tanques de 1000L alimentadas como se indicó previamente. La temperatura y salinidad fueron  $24,5 \pm 0,5$  ° C y  $34 \pm 0,1$  ppt ( $\pm$  DE), respectivamente. La Fig. 9 muestra un esquema representativo del diseño experimental para la evaluación de dietas.

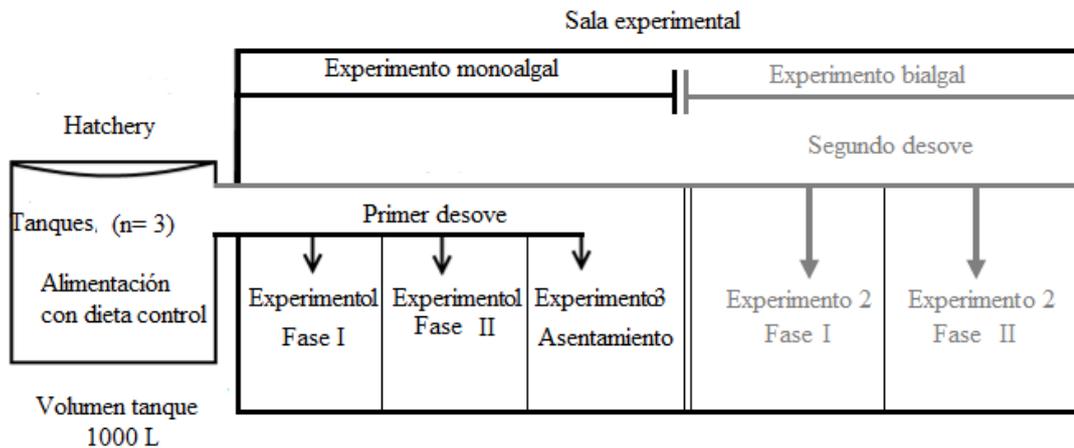


Figura 9. Diseño experimental que muestra la procedencia de las larvas de *S. prismatica* para cada evaluación (mono, bialgal y asentamiento). El color negro muestra el primer desove y el color gris el segundo desove. Dieta control= *T. lutea* + *Ch. gracilis*.

### 5.7. Muestreos biométricos en los experimentos de dietas mono y bialgales

Para evaluar el efecto de las dietas se tomaron muestras interdiarias (cada 48 h) en cada uno de los experimentos y sus tratamientos determinando la longitud y la supervivencia; para esto, las larvas de los tanques de 50L se concentraron en un tamiz, se resuspendieron en un *beaker* de vidrio de 1L, y se tomaron 3 alícuotas de 1 mL con una micropipeta. El número de larvas de cada unidad experimental fue calculado volumétricamente, siendo las muestras obtenidas analizadas al microscopio para estimar la supervivencia, la longitud y presencia de larvas con mancha ocular. Las longitudes de las larvas obtenidas se midieron tomando la dimensión dorso-ventral máxima, es decir, desde el umbo hasta la parte más distante (27). Las capturas de imágenes se realizaron con una cámara LANOPTIK modelo MDX503 conectada a un microscopio trinocular Olympus modelo CX31RTSF, procesándose con el software

Nahwoo iworks 2.0., finalmente para la determinación de la tasa de crecimiento diario -TCD- ( $\mu\text{m día}^{-1}$ ) se usó la relación:

$$\text{TCD} = (\text{T. final} - \text{T. inicial}) / t$$

Donde:

T. final= tamaño al final del experimento ( $\mu\text{m}$ )

T. inicial= tamaño al inicio del experimento ( $\mu\text{m}$ )

t = tiempo (días).

El procedimiento descrito para el recuento, medición y análisis de las larvas fue el mismo para los dos experimentos de dietas.

#### 5.8. Evaluación de sustratos para la Metamorfosis y Asentamiento

Al día 22 PF

cuando las larvas de cultivo estuvieron competentes para sedimentar (presencia de mancha ocular y pie). Organismos de los tanques de cultivo 1000 L (longitud DV=  $298,4 \pm 14,9 \mu\text{m}$ , alimentados con mezcla control) fueron utilizados para evaluar cinco sustratos de diferente composición [valvas de *S. prismatica* molida en  $\varnothing = 1 \text{ cm}^2$ ; valvas de *S. prismatica* molida en  $\varnothing = 0,5 \text{ mm}^2$ ; trozos de papel lija en  $\varnothing = 6,8 \text{ cm}^2$ ; trozos de plástico policarbonato en  $\varnothing = 9,3 \text{ cm}^2$  y caucho molido en  $\varnothing = 0,3 \text{ cm}^2$ , (Figura 10)]. Las larvas pedivelíger se colocaron en contenedores plásticos de 2 L (n=3), a una densidad de 1 larva  $\text{mL}^{-1}$ , el sustrato ocupó el 25% del área basal del recipiente. Recambios diarios se realizaron con AMF al 100%, incluyendo una dosis de alimento diario (15 mil células  $\text{mL}^{-1}$ ) de *Ch. gracilis* y *T. lutea* en proporción 3:1. Las unidades experimentales se mantuvieron con aeración moderada hasta un período de 10 días cuando finalizó el experimento. Para definir la preferencia al tratamiento

evaluado se analizó la cantidad y el tamaño de las postlarvas asentadas. La captura de imágenes para la medición y análisis de las postlarvas se realizó con la cámara LANOPTIK modelo MDX503 conectada a un estéreomicroscopio Olympus modelo SZ2-ILST, y luego procesadas con el software Nahwoo iworks 2.0.

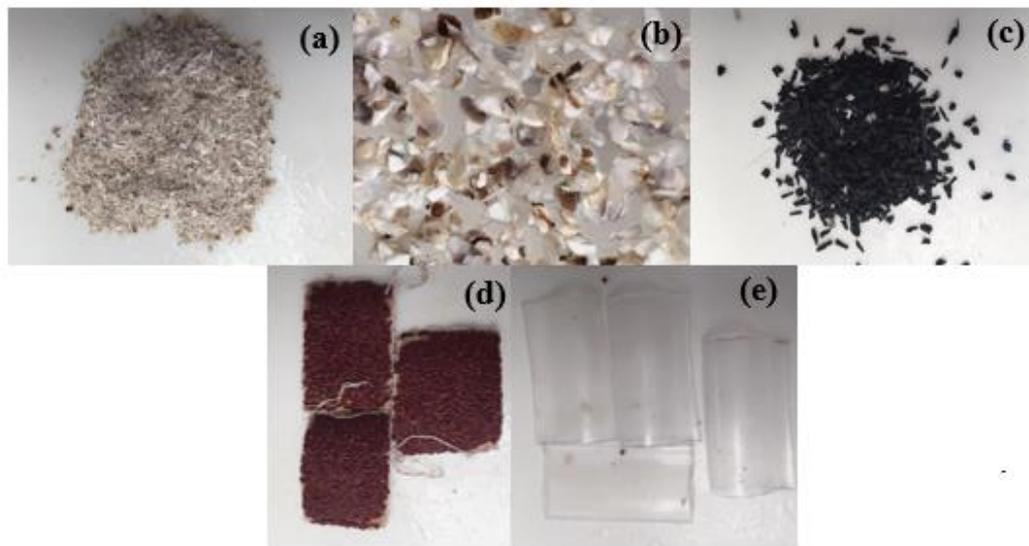


Figura 10. Sustratos utilizados en experimento de asentamiento de la ostra nativa, (a) valvas de *S. prismatica* molida en  $\varnothing =$  de  $0,5 \text{ mm}^2$ , (b) valvas de *S. prismatica* molida en  $\varnothing = 1 \text{ cm}^2$ , (c) caucho molido en  $\varnothing = 0,3 \text{ cm}^2$ , (d) trozos de papel lija en  $\varnothing = 6,8 \text{ cm}^2$ , y (e) trozos de plástico policarbonato en  $\varnothing = 9,3 \text{ cm}^2$ .

#### 5.9. Perfil de ácidos grasos: Microalgas y larvas de *Striostrea prismatica*

Para evaluar la calidad de las dietas en el desarrollo de las larvas, se determinaron los perfiles de ácidos grasos de las siete especies de microalgas buscando tener una referencia más clara acerca de las necesidades nutricionales de las larvas de *S.*

*prismatica*. Para esto, muestras de cultivo de las microalgas (en fase exponencial) y larvas en tres días distintos dentro de su ciclo larval, en el día 1 PF (3.500.000 larvas), 8 PF (2.960.000 larvas) y 22 PF (500.000 larvas) alimentadas con dieta Control excepto las del día 1 PF (se procesaron sin haberse alimentado) se filtraron en colectores de fibra Whatman GF/F utilizando un equipo Millipore de vacío. Luego fueron deshidratadas en estufa a 60 °C por 48 horas.

Posterior a ello, se trasladaron en un contenedor isotérmico protegido de la luz solar hacia un laboratorio privado. La determinación del perfil de ácidos grasos se realizó por cromatografía de gas con detección de ionización de llama (GC-FID) mediante los métodos de referencia Folch, Lees & Stanley (1957) and Ackman (1969 (42). La cuali-cuantificación de los ésteres de metilo y ácidos grasos (FAME's) presentes se realizó por comparación con un estándar de FAME's de origen animal y vegetal.

#### 5.10. Análisis estadístico

En la descripción embrionaria y larvaria todas las variables medidas (longitud, supervivencia y porcentaje de etapa) se expresaron en promedios de tres repeticiones. Para analizar los efectos de los tratamientos en la altura alcanzada, la tasa de crecimiento diario, la supervivencia de las larvas y la proporción de larvas con mancha ocular al final de los experimentos de dietas, así como el efecto de los sustratos utilizados en el porcentaje de asentamiento y el crecimiento de DV de las semillas de *S. prismatica*, se realizó ANOVA de una vía, previa comprobación de normalidad y homogeneidad de varianzas, con las pruebas de Shapiro Wilks y Bartlett, respectivamente. Cuando el caso ameritó se transformó los datos a logaritmo inverso para normalizar los datos. Al encontrar diferencias significativas usando los ANOVAs, se realizó la prueba de Tukey de comparaciones múltiples para detectar diferencias entre los tratamientos. Para todas las pruebas se utilizó un nivel de

significancia  $p < 0,05$ . El análisis estadístico se realizó con el software estadístico R Studio Versión 0.99.489.

## CAPÍTULO 6

### Resultados y discusión

#### 6.1. Descripción embrionaria de *Striostrea prismatica*

La Figura 11 muestra cronológicamente la secuencia de los estadios embriológicos de *Striostrea prismatica*, los mismos que terminan en los estadios larvales de trocofora e inicial D. Los huevos no fertilizados, son inicialmente con forma de pera, pero después de algunos minutos se vuelven esféricos y con un diámetro medio de  $46,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$  (Fig. 11<sup>a</sup>). En el momento que se agregaron los espermatozoides, se reunieron rápidamente alrededor del ovocito para la fertilización (Fig. 11B).

El primer cuerpo polar (que indica fecundación, figura 11C) apareció en el  $78,7 \pm 5,6\%$  de los ovocitos 15 min después de que los gametos entraron en contacto, observando a los 20 min todos los ovocitos con la formación del primer cuerpo polar. La primera escisión celular (Fig. 11D) tuvo lugar dentro de los 90 min después de la fertilización ( $78,7 \pm 5,6\%$ ). La segunda división celular (Fig. 11E) a las 2 h ( $65,7 \pm 12,1\%$ ), la tercera (Fig. 11F) a las 2 h 30 min ( $85,9 \pm 11\%$ ) y la cuarta (Fig. 11G) a las 3 h 30 minutos (100%), formando grupos homogéneos de células, que con las divisiones posteriores alcanzaron una mórula inmóvil a las 4 h (Figura 11H).

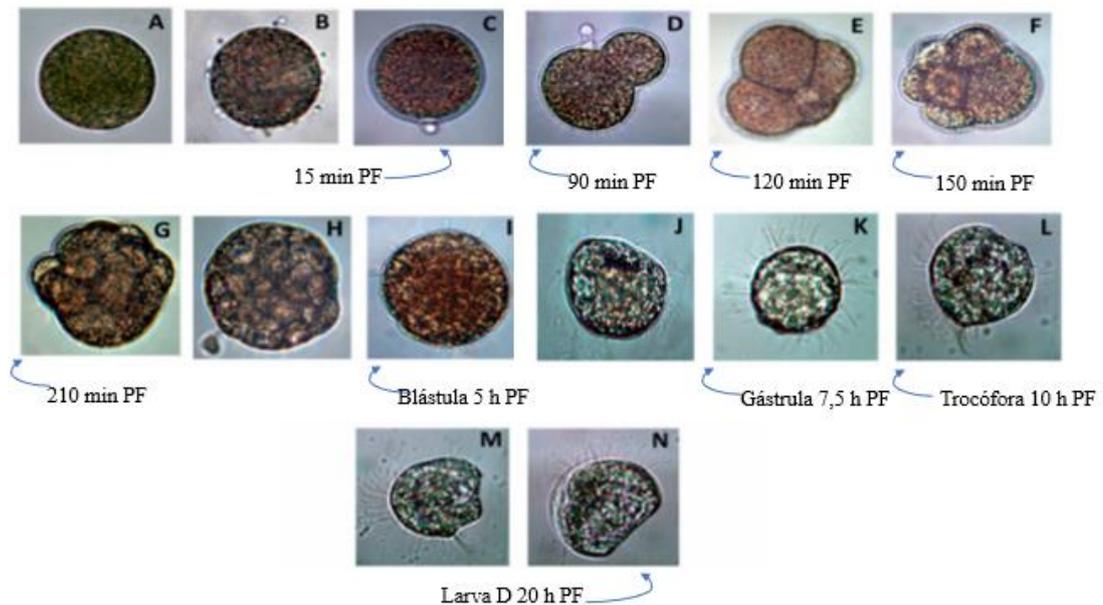


Figura 11. Desarrollo embrionario de *Striostrea prismatica* hasta larva trocófora y larva D. (A) ovocito no fertilizado ( $46,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$ ), (B) ovocito con espermatozoides circundantes, (C) primer cuerpo polar que indica fecundación de ovocitos (15-20 min), (D) primer clivaje de células (1 h 30 min), (E) segunda segmentación celular (2 h), (F) tercera división celular (2 h 30 min) (G) cuarta división celular (3 h 30 min), (H) mórula inmóvil (4 h 00 min), (I) blástula (5 h 00 min), (J) gástrula temprana (6 h 3 min), (K) gástrula tardía (7 h 30 min), (L) larva trocófora temprana ( $52,4 \pm 1,2 \mu\text{m}$ ; 10h), (M) larva trocófora tardía con forma D ( $58,1 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ; 19 h), y (N) larvas en forma de D tempranas calcificadas con prodisoconcha I ( $64,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ; 20 h). Las imágenes tienen diferentes escalas de magnificación para una mejor observación.

Una blástula (Fig. 11I) con movimiento limitado apareció a las 5 h (100%); luego, la blástula sufrió invaginaciones para dar lugar a una gástrula temprana (Fig. 11J) con un movimiento más activo a las 6 h (100%). La gástrula tardía (Fig. 11K; 7 h 30 min) se convirtió en una larva trocófora temprana activa móvil ( $52,4 \pm 1,2 \mu\text{m}$ , Fig. 11L) a las 10 h PF, luego de ello, a las 19 h, el  $90 \pm 5,1\%$  de las larvas en forma de D

tempranas con bisagra rectas comenzaron a notarse en el trocóforo tardío ( $58,1 \pm 0,5$   $\mu\text{m}$ ; Fig. 11M). Finalmente, a las 20 h PF una prodisoconcha temprana en forma de D calcificada estaba completamente desarrollada (Fig. 11N), alcanzando una longitud máxima de  $64,3 \pm 0,3$   $\mu\text{m}$ .

En el presente estudio, se obtuvo una tasa de fertilización de 96%, luego del manejo del desarrollo embrionario y larvario con una supervivencia final de 27% (larvas competentes), con una producción de juveniles de 5 mm en menos de 2 meses después de la fertilización. El hecho de que después del desarrollo embrionario, la formación completa de larvas con prodisoconcha se obtuvo a las 20-24h antes de lo reportado por Arguello-Guevara et al. (2) y que la reducción en el tiempo para obtener las larvas competentes de 32-35 días (obtenido en estudio previo) a 21-22 días, ratifica la optimización del cultivo. En este sentido, se recomienda que estudios de maduración y reproducción inducida estén acompañados de índices fisiológicos (análisis bioquímicos, estrés oxidativo) que puedan establecer la calidad de las larvas producidas (95). Así como también evaluación de tratamientos terapéuticos en huevos podrían brindar más información útil para la optimización del cultivo (65).

## 6.2. Descripción larvaria de *Striostrea prismatica*

La Figura 12 proporciona la descripción de la etapa larval y postlarval hasta la producción de semilla y los tiempos en que ocurrieron.

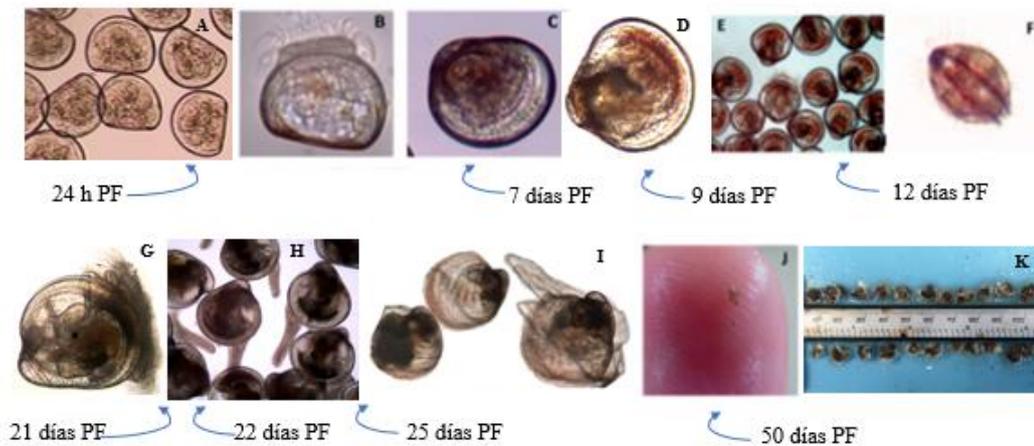


Figura 12. Desarrollo larval y postlarval de *Striostrea prismatica* hasta la etapa de semilla. (A) Larva D con prodisoconcha II ( $66,9 \pm 1,3 \mu\text{m}$ , 24 horas postfertilización); (B) larvas veliger, ( $71,1 \pm 0,5 \mu\text{m}$ , 2 días); (C) larvas veliger umbonadas tempranas ( $125,7 \pm 2 \mu\text{m}$ ; 7 días); (D) larvas umbonadas con tono anaranjado rojizo distal hacia la zona ventral ( $142,6 \pm 8,2 \mu\text{m}$ ; 9 días); (E y F) larvas umbonadas con la mancha distal más marcada hacia la zona ventral ( $178,3 \pm 3,9 \mu\text{m}$ ; 12 días); (G) larvas umbonadas con presencia de mancha ocular ( $289,6 \pm 13,7 \mu\text{m}$ ; 18 días); (H) larvas pediveliger ( $341,6 \pm 4,6 \mu\text{m}$ ; 22 días); (I) postlarva temprana (3 días postfertilización); (J) postlarvas visualmente observables ( $764,8 \pm 37,2 \mu\text{m}$ ); (K) semillas de 5 mm de longitud (28 días postmetamorfosis, 50 días después de la fecundación). Las imágenes tienen diferentes escalas de magnificación para una mejor observación.

La larva con crecimiento prodisoconcha II se identificó en 100% 5 h después de la prodisoconcha I ( $66,9 \pm 1,3 \mu\text{m}$ , Fig. 12 A; 24 horas después de la fertilización), iniciando el crecimiento larval de la concha. Se observaron larvas veliger con un velum bien desarrollado a las 48 h ( $71,1 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ; Fig. 12B). En larvas de 7 días de edad el umbo fue muy notable midiendo las larvas en este momento  $125,7 \pm 2 \mu\text{m}$  en longitud de concha (larvas veliger umbonadas tempranas, Fig. 12C).

El día 9;  $69,4 \pm 12,3\%$  de larvas veliger se volvieron marcadamente umbonadas cuando la longitud de la concha fue  $142,6 \pm 8,2 \mu\text{m}$ , y se observó un color rojizo distal a la zona ventral en todas estas larvas (Fig. 12D). El día 12, la pigmentación rojiza fue más marcada en todas las larvas que medían  $178,3 \pm 3,9 \mu\text{m}$  (Fig. 12E, F), luego la mancha roja distal se tornó difusa y desapareció hacia el día 18. El día 20, las larvas umbonadas avanzadas mostraron una mancha ocular ( $289,6 \pm 13,7 \mu\text{m}$ ), ya en el día 21, 100% de las larvas tenían mancha ocular localizada ( $329,3 \pm 3,9 \mu\text{m}$ ; Fig. 12G), y en el día 22, 100% habían desarrollado un pie ciliado (pediveliger;  $341,6 \pm 4,6 \mu\text{m}$ ; Fig. 12H).

En ese momento, las larvas pediveliger tenían un comportamiento de reptación, y presencia de doble anillo evidente, lo que indica que se encontraban en la etapa competente para la metamorfosis, entonces se transfirieron a sistemas circulares con fragmentos de conchas para el asentamiento, la metamorfosis y el desarrollo postlarval. Las primeras postlarvas cementadas observadas con formación de discoconcha tenían  $482,2 \pm 19,7 \mu\text{m}$ , a los 3 días postmetamorfosis (25 posfertilización, Fig.12I).

Las postlarvas cementadas continuaron su crecimiento alcanzando una longitud media de concha de  $764,8 \pm 37,2 \text{ mm}$  después de 9 días (Fig. 12J). Las ostras podrían manejarse fácilmente cuando alcanzaron una talla de  $4,9 \pm 0,3 \text{ mm}$  a los 28 días (50 días después de la fertilización, Fig. 12K) y podrían transferirse a los sistemas de engorde en el mar. Todo el seguimiento del desarrollo larvario fue en animales alimentados con régimen control (TI+Cg), como se expuso anteriormente.

Las etapas descritas para el desarrollo embrionario, larvario y postlarval fueron similares a otras especies de ostras o bivalvos, alcanzando la etapa larval competente a  $340 \mu\text{m}$ , excediendo notablemente el rango de 210 a  $300 \mu\text{m}$  reportado para la

mayoría de los bivalvos (27)(96); por lo tanto, las larvas competentes de *Striostrea prismatica* alcanzan un tamaño mayor que la mayoría de las ostras y son similares a *Ostrea angasi* (97). Una característica que parece ser específica de las larvas de *Striostrea prismatica* es la aparición de una mancha roja hacia el borde ventral de las larvas de umbonato tardío, que se convirtió en difusa cuando apareció la mancha ocular. La presencia de larvas con mancha ocular generalmente se considera como un índice previo a la metamorfosis de larvas competentes; sin embargo, en este estudio, las larvas de mancha ocular no mostraron capacidad de asentamiento, porque permanecieron muy activas nadando hasta que desarrollaron el pie ciliado (2 días después).

Otro índice utilizado para la capacidad de asentamiento es la aparición doble anillo, que indica la formación de la disoconcha. En este estudio, la aparición del anillo doble era escasa, por lo que la simple observación de larvas con mancha ocular no se recomienda para *Striostrea prismatica* como índice de haber alcanzado la competencia para la metamorfosis, sino más bien cuando se observa el pie desarrollado.

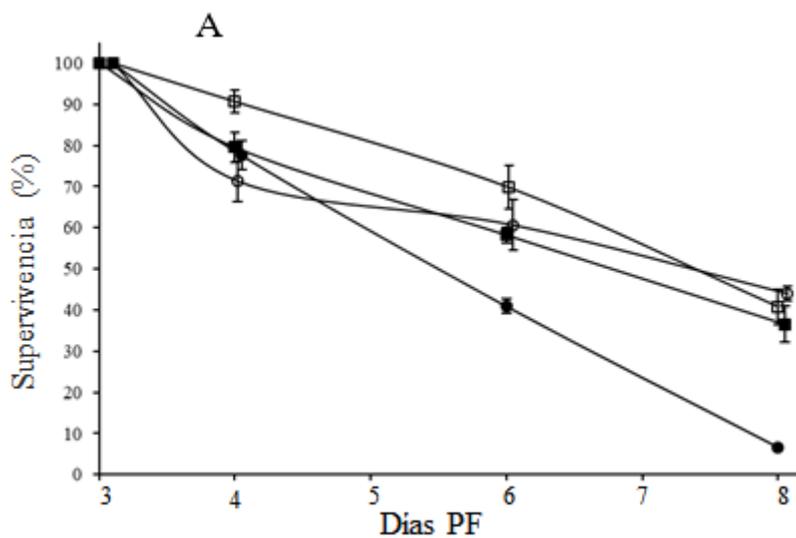
### 6.3. Evaluación de dietas: Experimento I monoalgal

#### 6.3.1 Efecto de dietas mono-específicas sobre el crecimiento y supervivencia de larvas de *S. prismatica* desde larva velíger “D” hasta estadio umbonado temprano (Fase I)

En observaciones microscópicas directas (100X) se detectó la presencia de células de microalgas enteras de *T. lutea*, *P. lutheri*, *T.suecica*, *Ch. muelleri* y *Ch. gracilis* en la glándula digestiva, y poca presencia de las microalgas *Nannochloropsis* y *T. chuii*, tanto en la fase I como en la fase II. La supervivencia

(Fig. 13 A) de las larvas mostró un descenso progresivo en todos los tratamientos. Al final de la fase I los tratamientos *P. lutheri*, *T. lutea* y control (*T. lutea*+*Ch. gracilis*), mantuvieron una supervivencia significativa mayor ( $44,0 \pm 1,8$ ;  $40,8 \pm 4,3$  y  $36,6 \pm 4,4\%$ , respectivamente) en comparación con *Nannochloropsis* ( $6,7 \pm 0,6$ ) ( $\pm$ EE).

El crecimiento (Fig. 13B) de las larvas fue de forma continua en el control y PI durante la fase I, las cuales alcanzan tallas estadísticamente iguales de  $103,4 \pm 2,1$  y  $101,3 \pm 2,2 \mu\text{m}$ ; a diferencia de T1 que fue menor hasta el día seis, cuando se desarrolla un crecimiento acelerado logrando alcanzar e inclusive sobrepasar significativamente las tallas de las demás dietas ( $109,3 \pm 1,9 \mu\text{m}$ ). El crecimiento con la dieta N fue prácticamente nulo durante el experimento. Este comportamiento generó una tasa de crecimiento significativamente mayor para T1 ( $6,8 \mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$ ), seguida del control y PI ( $5,2$  y  $5,6 \mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$ ) y mínima para N ( $1,1 \mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$ ).



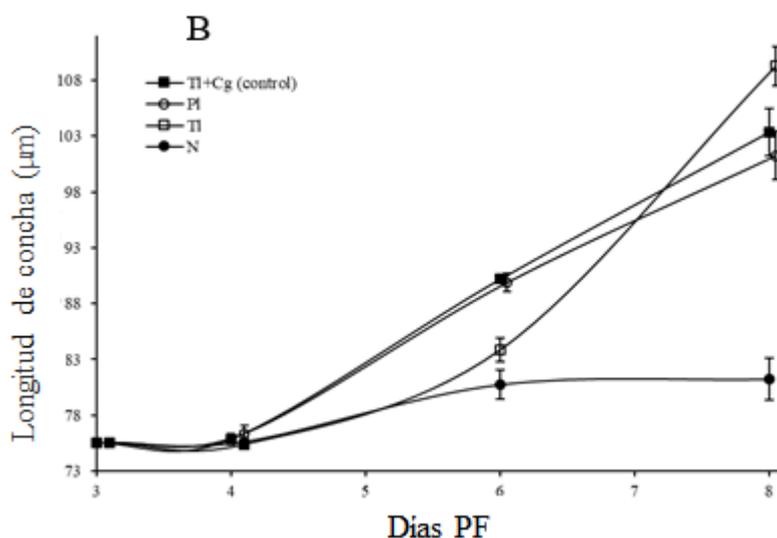


Figura 13. Supervivencia y crecimiento dorsoventral de larvas de *S. prismatica* durante la fase I del experimento monoalgal. Figura 13 A. Supervivencia (%) de larvas expuestas a 4 tratamientos. Figura 13B. Crecimiento en la longitud dorsoventral de la concha a la misma exposición. Las barras verticales indican el error estándar. TI + Cg = control (*Ch. gracilis* + *T. lutea*), P1 = *P. lutheri*, TI = *T. lutea* y N = *Nannochloropsis* sp.

Entre las microalgas probadas, *Nannochloropsis* sp. (con la concentración más alta de EPA en este experimento) mostró un rendimiento larvario bajo. Se observaron resultados similares en la alimentación larval de *Pteria sterna* y *Argopecten ventricosus*, ya que, aunque ingirieron las células de microalgas, no mostraron evidencia de digestión, lo que plantea la hipótesis de que la pared celular de glucógeno de fibrosa rígida de esta microalga es un factor limitante para la digestión de las larvas (92) (82) lo que valida un posible uso de *Nannochloropsis* sp. en etapas más avanzadas en moluscos.

Es posible que las larvas de *S. prismatica* no posean enzimas digestivas específicas eficientes para la digestión de *Nannochloropsis* sp, lo que justifica descartarla como alimento para las larvas de *S. prismatica*. A pesar de esto, existen reportes de un mejor rendimiento cuando se usa en combinación con otra microalga (98). Además, su calidad nutricional en general parece ser limitada considerando la falta de ácidos grasos esenciales como DHA, AA y otros ácidos grasos importantes como 16:2 (n-4), 20:0, 18:3 (n-3), 18:4 (n-3) y 22:4 (n-6) como se observó en este estudio y también reportó Volkman et al. (99).

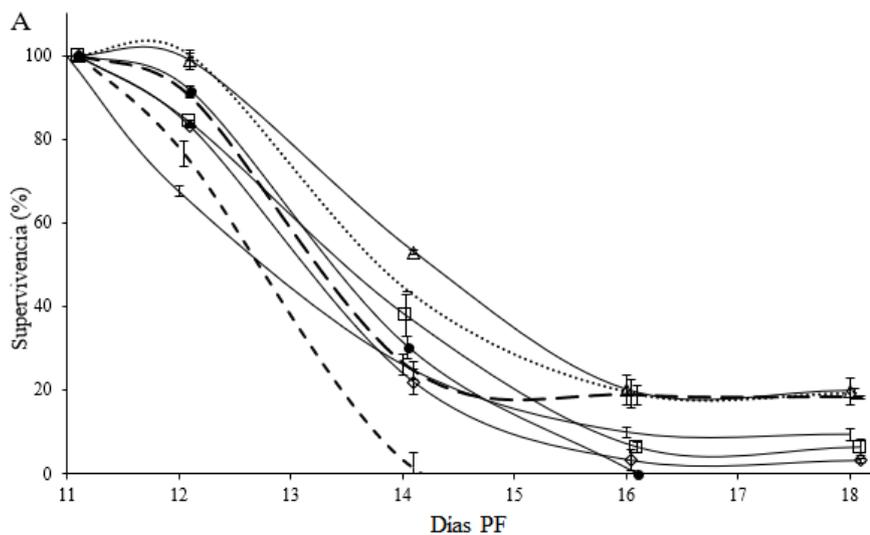
Entre las microalgas utilizadas como dietas monoalgales en la fase I, el mejor crecimiento se registró con *T. lutea* (rica en DHA), lo que también permitió una supervivencia de larvas del 41%, que fue estadísticamente similar a la supervivencia máxima alcanzada (44% para *P. lutheri*, rica en DHA también) e incluso fue superior a la supervivencia observada con la dieta bialgal utilizada como control que incluye el 75% de estas microalgas en combinación con *Ch. gracilis* (rico en EPA), aunque contenía cantidades bajas de EPA (pero más altas en comparación con *P. lutheri*). Este hallazgo demuestra una mayor importancia de DHA con respecto a EPA en los primeros 6-8 días de cultivo larvario, que incluso coincide con lo declarado por Farías & Uriarte (15).

6.3.2. Efecto de dietas mono-específicas sobre el crecimiento y supervivencia de larvas de *S. prismatica* desde estadio umbonado temprano hasta larvas con mancha ocular (Fase II)

El desarrollo larvario de *S. prismatica* se vio influenciado por el tipo de dieta, tanto monoalgal como bialgal. En los experimentos las microalgas ensayadas han sido ampliamente utilizadas en el cultivo de moluscos bivalvos (80), y su selección se realizó considerando principalmente el tamaño, para garantizar que no se constituya

en una variable que afecte la ingestión de las larvas tanto tempranas como tardías (22).

La supervivencia disminuye abruptamente llegando a la mortalidad total en los tratamientos con las microalgas *Nannochloropsis* y *T. chuii* al día 3 y 5 del experimento (14 y 16 del desarrollo larvario respectivamente); sin embargo, se estabiliza al día 5 en los demás tratamientos, obteniéndose valores de 18-19% para *Ch. gracilis*, *T. lutea* y *P. lutheri*, significativamente mayores a las supervivencias alcanzadas por los demás tratamientos (control, *T. suecica* y *Ch. muelleri*) (Fig. 14 A). La mortalidad total de las larvas alimentadas con *T. chuii* fue detectada al 5<sup>to</sup> día del experimento (16 del desarrollo larvario).



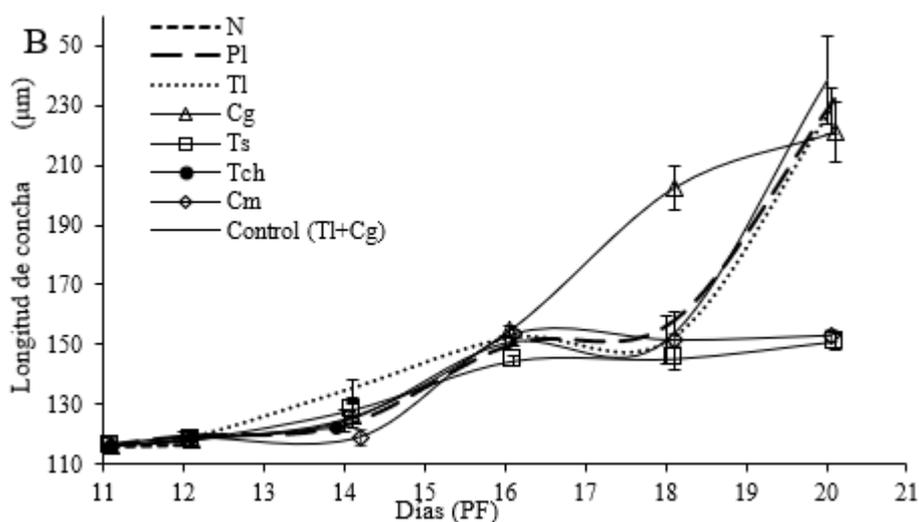


Figura 14. Supervivencia y crecimiento dorsoventral de larvas de *S. prismatica* durante la fase II del experimento monoalgal. Figura 14 A. Supervivencia (%) de larvas expuestas a 8 tratamientos. Figura 14B. Crecimiento en la longitud dorsoventral de la concha a la misma exposición. Las barras verticales indican el error estándar. Tl+Cg = control (*T. lutea* + *Ch. gracilis*), Pl = *P. lutheri*, Tl = *T. lutea*, N = *Nannochloropsis* sp., Cg = *Ch. gracilis*, Ts = *T. suecica*, Tch = *T. chuii* y Cm = *Ch. muelleri*.

En el crecimiento, se conformó un grupo significativamente igual en los tratamientos control, Pl, Tl y Cg con valores de 11-13  $\mu\text{m día}^{-1}$ , significativamente mayores al de Ts y Cm, que alcanzaron tasas de 4  $\mu\text{m día}^{-1}$  (Fig. 14B). En el día 20 PF, se decidió finalizar el experimento al observar larvas con un porcentaje significativo de mancha ocular bajo el tratamiento control, con un 44,8%, mayor significativamente que las observadas en las dietas Pl, Tl y Cg (15,8; 10,0 y 7,7 %). En larvas alimentadas con las dietas N, Ts y Cm no se observó mancha ocular (Tabla VI). Este patrón fue estadísticamente igual en el crecimiento y la TCD.

Tabla VI. Longitud media de la concha  $\pm$  EE, supervivencia  $\pm$  EE y tasa de crecimiento de larvas de *S. prismatica* alimentadas con diferentes dietas monoespecíficas desde el día 8 (Fase 1) y el día 20 (Fase 2).

Dietas	Longitud concha ( $\mu\text{m}$ )	Supervivencia (%)	Tasa crecimiento ( $\mu\text{m}/\text{día}^{-1}$ )	% larvas oculadas	Fase experimental
Control	103,3 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	36,5 $\pm$ 4,4 <sup>a</sup>	5,6 <sup>a</sup>	-	1
<i>P. lutheri</i>	101,2 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	44 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	5,1 <sup>ab</sup>	-	1
<i>T. lutea</i>	109,3 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	40,8 $\pm$ 4,3 <sup>a</sup>	6,7 <sup>a</sup>	-	1
<i>Nannochloropsis</i>	81,2 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>	6,7 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	1,1 <sup>b</sup>	-	1
Control	238,3 $\pm$ 14,7 <sup>a</sup>	9,3 $\pm$ 1,2 <sup>ab</sup>	13,5 <sup>a</sup>	44,8 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup>	2
<i>P. lutheri</i>	231,9 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	18,2 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	12,8 <sup>a</sup>	15,8 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>	2
<i>T. lutea</i>	228,0 $\pm$ 7,5 <sup>a</sup>	19,1 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	12,4 <sup>a</sup>	7,7 $\pm$ 0,7 <sup>bc</sup>	2
<i>Ch. gracilis</i>	220,9 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	19,7 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	11,6 <sup>a</sup>	10 $\pm$ 4,4 <sup>b</sup>	2
<i>T. suecica</i>	151,1 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>	6,2 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>	3,9 <sup>b</sup>	0	2
<i>Ch. muelleri</i>	153,1 $\pm$ 2,6 <sup>b</sup>	3,1 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	4,0 <sup>b</sup>	0	2

Las diferentes letras superpuestas indican diferencias significativas entre los tratamientos. ( $p < 0,05$ ). Los tratamientos *T. suecica* y *Ch. muelleri* no resultaron con larvas oculadas al día 20.

*T. lutea* fue la dieta monoalgal con mayor rendimiento (crecimiento y supervivencia) en la fase II, junto con *P. lutheri* y *Ch. gracilis*. No obstante, el porcentaje de larvas con mancha ocular que señalan el inicio al estado competente para la metamorfosis fue estadísticamente menor (7-15%) al acontecido con la dieta control (45%), lo cual sugiere que la mezcla de las microalgas genera un mayor desarrollo.

El consumo de las diatomeas fue diferencial, teniendo mayor rendimiento *Ch. gracilis* que *Ch. muelleri*, probablemente debido a que ya los apéndices de *Ch. gracilis* no constituyen una limitante para su ingestión, en las larvas que alcanzaron un tamaño de 120-130  $\mu\text{m}$ , en la fase II (día 14 PF) pero si los de *Ch. muelleri* que poseen apéndices de más del doble que los de *C. gracilis* ( $29,6 \pm 6,1 \mu\text{m}$ ). Aunque se observó ingestión de *Ch. muelleri*, el desarrollo de las larvas fue limitado, pues no llegaron a obtener mancha ocular al día 20 PF; lo que podría estar asociado con problemas de ingestión y un consiguiente efecto negativo debido al no aprovechamiento de EPA. *Ch. muelleri* fue la tercera microalga con la mejor proporción de EPA, y la única con AA, pero a baja concentración (1.1%). Contenidos similares fueron registrados por (73); distinto en cambio para las larvas de *Ruditapes decussatus* quienes mostraron mejor desempeño cuando fueron alimentadas con esta microalga (11). Ello indica que la contribución de EPA está directamente correlacionada con el mejor desempeño en la fase de asentamiento, lo mismo que informaron (100) en larvas de *M. galloprovincialis*.

#### 6.4. Evaluación de dietas: Experimento II bialgal

##### 6.4.1. Efecto de dietas bialgales sobre el crecimiento y supervivencia de larvas de *S. prismatica* desde larva velíger "D" hasta estadio umbonado temprano (Fase I)

Independientemente de las dietas bialgales y las raciones utilizadas, la supervivencia no mostro cambios significativos hasta el día 6 del experimento, cuando decae notablemente, siendo la dieta control (T1+Cg), con menor pendiente de decaimiento alcanzando  $50,1 \pm 1,8\%$  de supervivencia, significativamente superior al resto de las dietas que mostraron valores de 14-25% (Fig. 15A). Así mismo el crecimiento fue similar durante el transcurso del experimento. La tasa de crecimiento fue superior con la dieta control fue mayor y la mezcla T1+P1 fue la menor ( $5,2$  y  $3,8 \mu\text{m}/\text{día}^{-1}$ , respectivamente) (Fig. 15B).

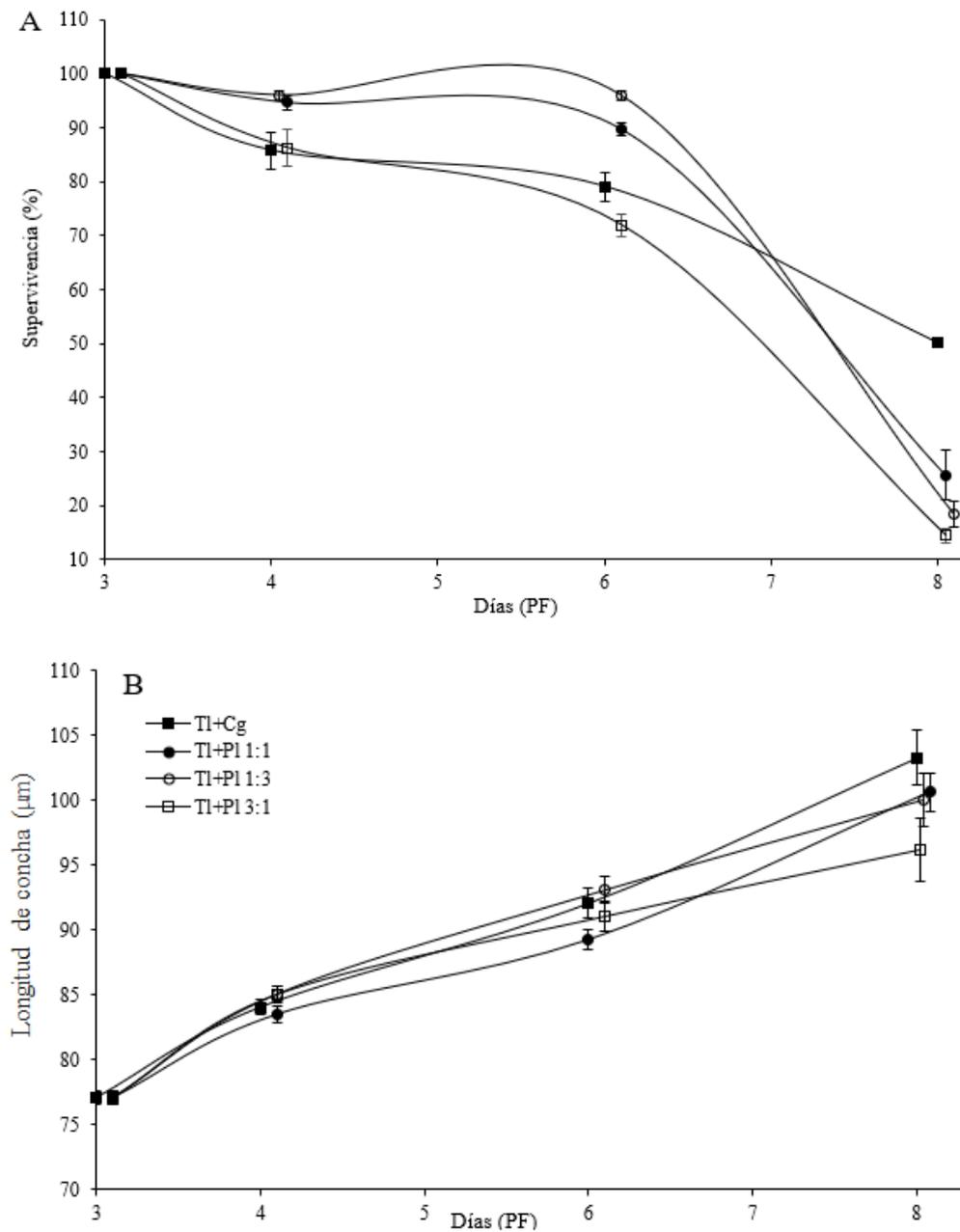


Figura 15. Supervivencia y crecimiento dorsoventral de larvas de *S. prismatica* durante la fase I del experimento bialgal. Figura 15A. Supervivencia (%) de larvas expuestas a 4 mezclas. Figura 15B. Crecimiento en la longitud dorso-ventral de la concha a la misma exposición. Las barras verticales indican el error estándar. Tl+Cg

= control (*Ch. gracilis* + *T. lutea*), Tl+Pl 1:1; 1:3 y 3:1 = *T. lutea* + *P. lutheri* en diferentes proporciones.

La dieta control con mayor rendimiento, particularmente por generar mayor supervivencia al final del experimento en la etapa I, debido a una menor mortalidad y crecimiento sostenido entre el día seis y ocho PF, probablemente se explica por una mejor aceptación de la microalga Cg, al final de la etapa. Esto condiciona, al menos utilizar la dieta monoalgal *T. lutea* en los primeros seis días del desarrollo larvario, y no la bialgal control, lo cual está soportado por su mayor tasa de crecimiento ( $6,8 \mu\text{m día}^{-1}$ ) comparado con la bialgal ( $5,2 \mu\text{m día}^{-1}$ ) en la fase I.

6.4.2 Efecto de dietas bialgales sobre el crecimiento y supervivencia de larvas de *S. prismatica* desde estadio umbonado temprano hasta larvas con mancha ocular (Fase II)

Tabla VII. Longitud media de la concha  $\pm$  EE, supervivencia  $\pm$  EE y tasa de crecimiento de larvas de *S. prismatica* alimentadas con diferentes mezclas bialgales desde el día ocho (Fase 1) hasta el día 20 (Fase 2).

Dietas	Longitud concha ( $\mu\text{m}$ )	Supervivencia (%)	Tasa crecimiento ( $\mu\text{m}/\text{día}^{-1}$ )	% larvas oculadas	Fase experimental
Control	103,2 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	50,1 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	5,2 <sup>a</sup>	-	1
TI+PI 1:1	100,6 $\pm$ 2,3 <sup>ab</sup>	25,7 $\pm$ 1,6 <sup>ab</sup>	4,7 <sup>ab</sup>	-	1
TI+PI 1:3	100,1 $\pm$ 2,1 <sup>ab</sup>	18,4 $\pm$ 2,3 <sup>ab</sup>	4,6 <sup>ab</sup>	-	1
TI+PI 3:1	96,2 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>	14,4 $\pm$ 1,7 <sup>ab</sup>	3,8 <sup>b</sup>	-	1
Control	256,9 $\pm$ 8,1	12,4 $\pm$ 6,5	11,4	44,7 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	2
PI+Cg	247,2 $\pm$ 6,9	13,3 $\pm$ 4,5	10,3	40,9 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	2

TI= *T. lutea*; PI= *Pavlova lutheri*; Cg= *Ch. gracilis*. Las diferentes letras superpuestas indican diferencias significativas entre los tratamientos. ( $p < 0,05$ ). En la fase 2 del bialgal, solo se encontró diferencias significativas en el porcentaje de larvas oculadas al día 20.

Las combinaciones bialgales utilizadas (Control y PI+Cg) mostraron el mismo comportamiento tanto en la supervivencia como en el crecimiento (Fig. 16A y 16B), alcanzando valores estadísticamente iguales en supervivencia (12,4  $\pm$  6,5 y 13,3  $\pm$  4,5 %), crecimiento de concha (257  $\pm$  8,1 y 247,3  $\pm$  6,9  $\mu\text{m}$ ) pero no en el porcentaje de larvas con mancha ocular, el cual fue superior en la dieta control (44,7  $\pm$  1,1 vs 40,9  $\pm$  1,6%) (Tabla VII).

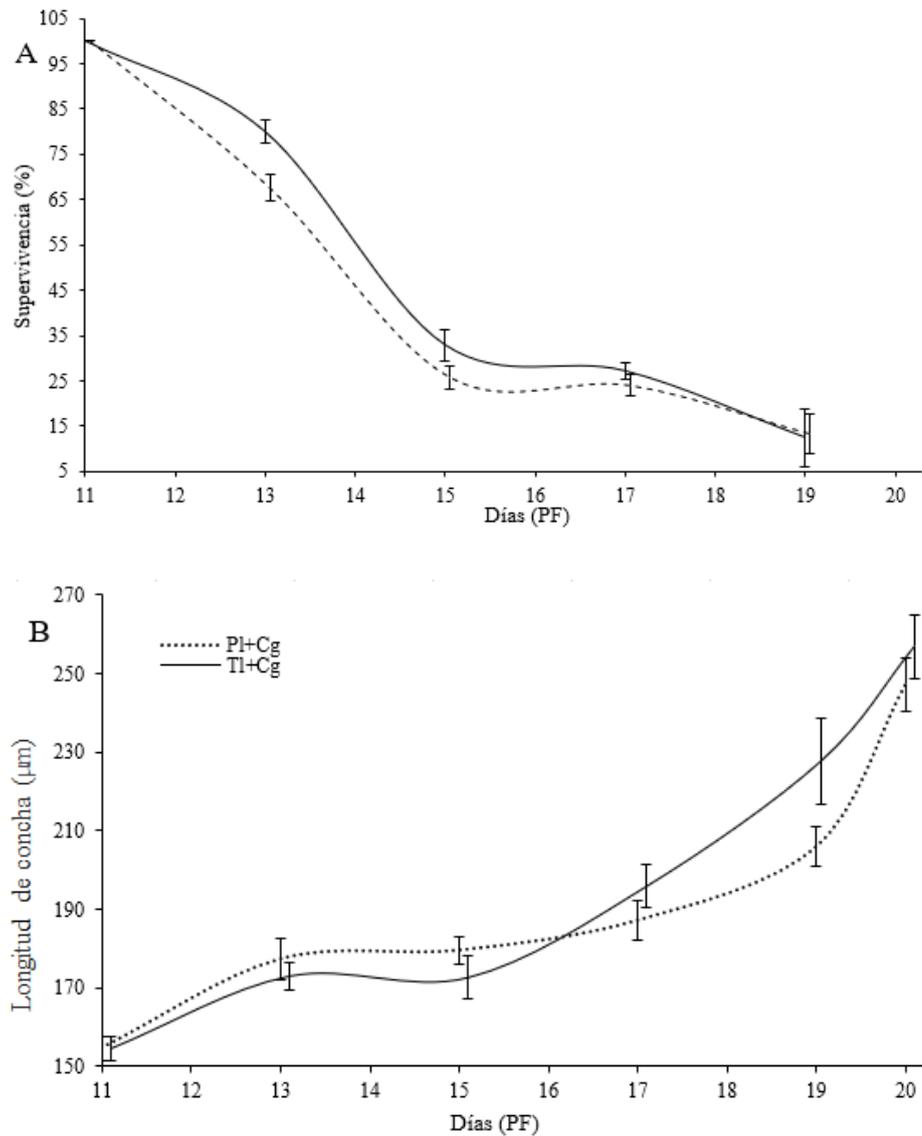


Figura 16. Supervivencia y crecimiento dorsoventral de larvas de *S. prismatica* durante la fase II del experimento bialgal. Figura 16A. Supervivencia (%) de larvas expuestas a 2 mezclas. Figura 16B. Crecimiento en la longitud dorsoventral de la concha antes de la misma exposición. Las barras verticales indican el error estándar. TI+Cg = control (*T. lutea* + *Ch. gracilis*); Pl+Cg = *P. lutheri* + *Ch. gracilis* en proporciones iguales a las sugeridas para el control (5).

Durante la fase II, se usaron mezclas clásicas en la cría de moluscos (101), sin

encontrar diferencias significativas en la supervivencia, la tasa de crecimiento diario o el crecimiento entre *P. lutheri* + *Ch. gracilis* y *T. lutea* + *Ch. gracilis*. La proporción significativamente mayor de larvas con mancha ocular; desde un punto de vista nutricional, se explica solo por la proporción más baja de 20:0; 18:3 (n-3); 18:0; 18:1 (n-9); 18:2 (n-6); DHA y EPA en mezcla PI + Cg. Además, la mezcla de control utilizada proporciona la mayoría de los ácidos grasos, excepto 20:4 (n-6) (AA); sin embargo, este se informa como importante en la fase larval de los bivalvos (46), lo que sugiere que las larvas de *S. prismatica* podría tener la capacidad metabólica de sintetizar estos ácidos grasos de novo a partir de fuentes moleculares. Por lo que sugerimos evaluar a mayor profundidad esta hipótesis.

En este sentido, Farías y Uriarte (15); Sánchez-Lazo y Martínez-Pita (93), sugieren que las larvas bivalvas pueden tener cierta capacidad para obtener AA usando 18:2 (n-6) (ácido linoleico) o 18:3 (n-3) (ácido alfa-linolénico) como precursor. Esto destacaría la importancia de DHA + EPA/AA, coincidiendo con lo informado por Pettersen et al. (100) en las larvas de *M. galloprovincialis*. Estos resultados muestran que *S. prismatica* puede prescindir de AA de la dieta debido a su posible capacidad para obtenerla de otros ácidos grasos (presentes en la dieta control). Un estudio con perfiles de ácidos grasos en la combinación de dieta de algas y las larvas durante el desarrollo de larvas ontogénicas es necesario para dilucidar esta hipótesis.

#### 6.5 Evaluación de sustratos para el asentamiento

Tabla VIII. Tamaño dorso-ventral ( $\mu\text{m} \pm \text{EE}$ ) y asentamiento ( $\% \pm \text{EE}$ ) de larvas pedivelíger de *S. prismatica* sometidas a diferentes tipos de sustrato.

Tratamientos	Asentamiento (%)	Longitud dorso-ventral ( $\mu\text{m}$ )
Concha 10 mm <sup>2</sup>	19 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	1,6 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>
Concha 0,5 mm <sup>2</sup>	4,1 $\pm$ 5,2 <sup>b</sup>	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>
Lija 70 mm <sup>2</sup>	1,3 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	2,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
Policarbonato 70 mm <sup>2</sup>	0	NF
Caucho molido 3 mm <sup>2</sup>	4,2 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>	1,26 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>

Las diferentes letras superpuestas indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). NF=No fijación.

La longitud dorso-ventral de las postlarvas y el porcentaje de metamorfosis se resume en la Tabla VIII. El sustrato de policarbonato no mostró fijación larvaria alguna (Fig. 17). El sustrato de concha de mayor superficie (10 mm<sup>2</sup>) permitió un porcentaje de asentamiento de 19  $\pm$  3,9%, significativamente superior al del resto de los sustratos, siendo éstos por el orden de 5 veces menor conformando un grupo de igualdad significativa con asentamientos de 1,3  $\pm$  0,9; 4,1  $\pm$  5,2 y 4,1  $\pm$  1,8 % para el papel lija, la concha de 0,5 mm<sup>2</sup> y el caucho molido.

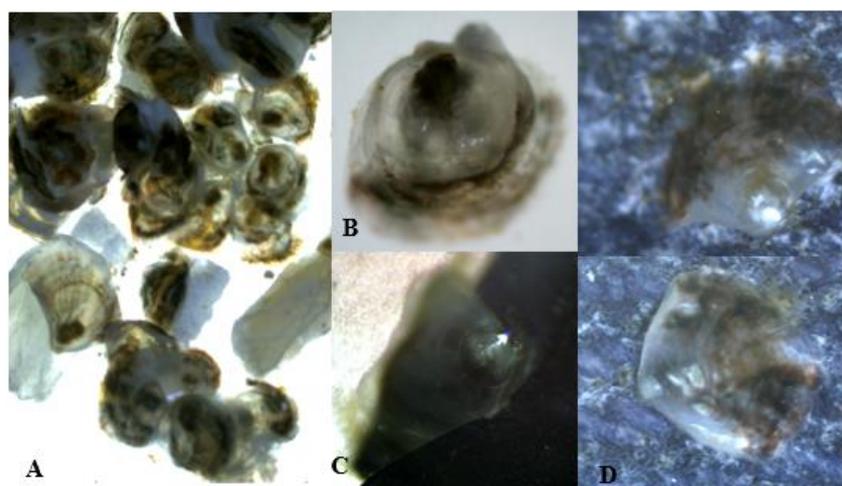


Figura 17. Semillas metamorfasadas sobre los distintos sustratos evaluados, A. valvas molidas de 10 mm<sup>2</sup>, donde se observa claramente varias semillas fijadas en un mismo

trozo de valva; B. semilla asentada sobre una partícula pequeña de valva molida; C. semilla cementada sobre trozo de caucho y D. semillas cementadas sobre papel lija. Las imágenes tienen diferentes escalas de magnificación para una mejor observación.

En cuanto a la longitud, las postlarvas en las lijas fueron las que significativamente tuvieron mayor crecimiento ( $2,3 \pm 0,2$  mm), seguido de la concha de mayor superficie y el caucho molido que conforman un grupo significativamente igual ( $1,7 \pm 0,1$  y  $1,3 \pm 0,1$  mm) pero mayor que la concha de  $0,5 \text{ mm}^2$  de superficie ( $0,9 \pm 0,1$  mm).

En resumen, los tratamientos que asegurarían mayor fijación de postlarvas fueron la concha molida de mayor superficie, éstas 5 veces más que los demás sustratos, incluyendo la misma concha con superficie menor del orden de unas 20 veces menor, o incluso superficies mayores (policarbonato y lijas). Las lijas, fueron las que soportaron mayor crecimiento, probablemente por no tener competencia intraespecífica, alcanzando los 2,4 mm. El uso de partículas pequeñas ( $200\text{-}350 \mu\text{m}$ ) permite obtener semillas de ostras individualizadas, lo cual es deseable pues permite una mejor manipulación de las semillas, a parte de una mejor presentación del producto. Teniendo esto en cuenta, se observó que las conchas con mayor superficie soportaban la fijación de varias semillas, con un promedio de unas 4-8 postlarvas fijadas por partículas (datos estimados en registros fotográficos), lo cual, ya en etapa final dado la competencia intraespecífica, sería una sola ostra, por lo que el resultado de producción final sería equiparable a los demás sustratos (2-5 ostras producidas).

El sustrato de concha de menor superficie ( $0,5 \text{ mm}^2$ ) podría proyectar una fijación individual de *S. prismatica*, dado el tamaño de esta para la fijación de  $340 \mu\text{m}$  (5); sin embargo, mostró postlarvas de menor tamaño lo que evidencia el tamaño de partícula como una limitante a la fijación y formación de disoconcha, probablemente porque necesitan sustratos con menos movilidad que puedan

perturbar las actividades de asentamiento y crecimiento postlarvario, al menos inicial. Esto se encuentra cónsono a su hábitat en la naturaleza, fijadas a grandes rocas y no a sustratos pequeños. En ostreidos, (102), consiguieron el asentamiento de larvas de *Crassostrea gigas* en trozos de concha (0,5 a 1,0 mm) preparados a partir de valvas de 11 especies diferentes de moluscos observando el asentamiento en todas las especies ensayadas, excepto *Patinopecten yessoensis* y *Atrina pinnata*.

Estos resultados no son similares en *S. prismatica*, pues, se observó que las pedivelíger mostraron preferencia por sustratos de mayor tamaño; no obstante, la superficie de los sustratos ensayados jugó un papel muy significativo. El policarbonato no fue aceptado por las pedivelíger, al parecer la composición superficial del sustrato no cumplió las necesidades específicas de los animales a pesar del tamaño, lo mismo ocurrió con el papel lija que, aunque posee una cara rugosa no fue significativamente mejor.

Finalmente, se evaluó un sustrato hecho de caucho molido de 2-3 mm<sup>2</sup> con características particulares que podrían facilitar la individualización de los organismos post-fijación. A pesar de que el porcentaje de organismos fijados en este sustrato fue bajo (4,2%), la fijación es realizada de una forma más unitaria por partícula de caucho, lo cual facilita la individualización de la producción de semilla, esto podría generar un mayor número de semillas individualizadas.

## 6.6. Perfil de ácidos grasos

### 6.6.1. Microalgas

La Tabla IX muestra el perfil de ácidos grasos de las microalgas evaluadas; en general éstas mostraron los ácidos grasos principales: 14:0, 14:1, 16:0, 16:1(n-9), 18:0, 18:1(n-9), 18:2(n-6), 18:3(n-3), 20:5(n-3) y 22:6(n-3); sin embargo, se

encontraron otros en cantidades pequeñas. Las Chlorophyceae, resultaron carentes o con muy bajas concentraciones de 14:0, 14:1, 18:0, 20:5(n-3) y 22:6(n-3), pero en cambio resultaron muy ricas en otros como el 16:0, 16:1(n-9), 18:1(n-9), 18:2(n-6), 18:3(n-3), 16:2(n-4) y el 20:0. *Nannochloropsis* sp., resultó con valores importantes de 12:0, 14:0, 16:0, 16:1(n-9), 18:1(n-9) y 20:5(n-3) pero nula en 22:6(n-3).

Tabla IX. Composición de ácidos grasos de las microalgas utilizadas en los experimentos.

	<i>Pavlova lutheri</i>	<i>Tisochrysis lutea</i>	<i>Nannochloropsis sp.</i>	<i>Chaetoceros gracilis</i>	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Tetraselmis chuii</i>	<i>Chaetoceros muelleri</i>	
12:0	N.D.	N.D.	7,77	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	12:0
14:0	15,12	11,78	7,38	20,26	N.D.	3,30	10,36	14:0
14:1	0,64	1,06	N.D.	7,38N	N.D.	2,52	N.D.	14:1
16:0	23,35	17,59	27,70	21,73	21,08	22,67	43,29	16:0
16:1(n-9)	3,71	4,02	27,32	22,36	7,24	8,19	31,19	16:1(n-9)
16:2(n-4)	0,35	N.D.	N.D.	6,54	11,54	11,29	2,21	16:2(n-4)
18:0	4,73	5,92	1,54	4,35	2,96	1,84	1,68	18:0
18:1(n-9)	19,46	23,28	6,26	4,86	6,55	4,73	1,04	18:1(n-9)
18:2(n-6)	8,88	10,58	2,66	6,16	8,69	5,13	1,57	18:2(n-6)
20:0	1,69	4,33	N.D.	N.D.	3,68	3,12	N.D.	20:0
18:3(n-3)	9,06	11,36	N.D.	8,44	33,03	32,04	0,82	18:3(n-3)
18:4(n-3)	4,41	1,07	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	18:4(n-3)
20:4(n-6) AA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,10	20:4(n-6) AA
20:5(n-3) EPA	0,84	1,01	12,40	5,30	N.D.	1,69	3,89	20:5(n-3) EPA
22:4(n-6)	1,21	0,95	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	22:4(n-6)
22:6(n-3)								22:6(n-3)
DHA	5,01	6,29	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	DHA
Σ n-3	19,63	18,66	12,40	13,74	33,03	33,73	4,71	Σ n-3
Σ n-6	10,07	11,54	5,63	6,16	8,69	5,13	2,67	Σ n-6
Σ n-9	24,14	29,54	33,58	27,22	13,79	15,45	32,23	Σ n-9
n-3/n-6	1,95	1,62	2,20	2,23	3,80	6,58	1,76	n-3/n-6
Σ MUFA	24,14	29,54	33,58	27,22	13,79	15,45	32,23	Σ MUFA
Σ SAFA	45,81	40,26	45,81	46,34	32,96	34,40	58,18	Σ SAFA
Σ PUFA	30,06	30,20	18,03	26,44	53,26	50,15	9,59	Σ PUFA
Σ INSAT	54,19	59,74	51,60	53,66	67,04	65,60	41,82	Σ INSAT
Σ HUFA	7,36	8,25	12,40	5,30	N.D.	1,69	3,89	Σ HUFA

Las microalgas para el análisis fueron tomadas en la fase exponencial de su producción. Los valores están expresados en porcentaje de esteres metílicos de ácidos grasos en relación con lípidos totales. N.D= No detectado.

En general, las microalgas utilizadas en el estudio no presentaron ácido araquidónico (AA), excepto Cm, aunque en muy baja proporción (1.1%). El DHA se encontró en Pl y Tl, en concentraciones de 5,0 y 6,3%. Así mismo, el EPA y el ácido mirístico

(14:0) forman parte constitutiva y en cantidades importantes de las microalgas evaluadas excepto en Ts. Los contenidos más altos de ácidos grasos saturados se obtuvieron en las diatomeas (Cg = 46,3 y Cm= 58,2%), en cambio los ácidos grasos monoinsaturados resultaron con porcentajes altos en todas las microalgas evaluadas. Así mismo, los ácidos grasos poliinsaturados fueron encontrados en porcentajes importantes en todas excepto en *Ch. muelleri*.

Aunque los mayores porcentajes de PUFA e Insaturados resultaron en *T. suecica* y *T. chuii*, se confirma que el tamaño de célula con respecto al estadio larvario contribuye a la poca/nula ingestión de estas clorofíceas, tal y como lo han descrito (91)(103)(82)(22). Además del tamaño celular, los flagelos en *T. chuii* y *T. suecica* midieron  $10,8 \pm 1,0$  y  $12,1 \pm 0,9$   $\mu\text{m}$  respectivamente, lo cual limitaría también la ingestión de estas microalgas.

En líneas generales, exceptuando *Nannochloropsis* por la mala digestibilidad antes discutida, y *Ch. muelleri*, quizás por sus quetas que limitarían su ingestión en larvas de *S. prismatica* ( $29,6 \pm 6,1$   $\mu\text{m}$ ), la calidad nutricional, en cuanto a la presencia de ácidos grasos esenciales, particularmente de DHA en *T. lutea* y *P. lutheri*, coinciden con los mejores resultados obtenidos en las dietas que las contienen. Reportes similares de aceptación se muestran en experimentos con *Crassostrea gigas* (104), *Crassostrea virginica* (105), *Pecten maximus* (106), *Pteria sterna* (82), *Ruditapes decussatus* (11), *Placopecten magellanicus* (107), *Pinctada margaritifera* (108), *Crassostrea nipona* (109) y *Ostrea edulis* (110). En *Mytilus galloprovincialis* se señala las proporciones de DHA de *T. lutea* como un factor que influye fuertemente la supervivencia larval (85).

El EPA fue variable entre las microalgas, siendo mayor su composición en *Nannochloropsis* sp. (12,4%), *Ch. muelleri* (3,9%) y *Ch. gracilis* (5,3%) de estas tres microalgas solo la última mostró buenos resultados al final del segundo

experimento por lo que fue considerada en los ensayos bialgales. Curiosamente *P. lutheri* y *T. lutea* con los más bajos porcentajes de EPA obtuvieron mejores rendimientos en las larvas, lo que hace apoyar estos resultados a la hipótesis de (15) pues el 18:3(n-3) forma parte importante en la constitución bioquímica de *P. lutheri* y *T. lutea*. Esto y que probablemente, los DHA que solo fueron aportados por estas microalgas, particularmente *T. lutea*, aumentan la carga de DHA provenientes del huevo en las larvas mixotróficas al inicio del desarrollo larvario, reforzando la cantidad evolutivamente necesaria y generando mejores rendimientos, que los alcanzados por las otras microalgas en las cuales no se detectaron DHA, lo cual podría ser la razón nutritiva para usar estas microalgas en los primeros días del desarrollo de *S. prismatica* y de otros bivalvos, además de su fácil ingestión y digestión.

#### 6.6.2. Larvas

La composición de ácidos grasos en las larvas de *S. prismatica* en los diferentes momentos del desarrollo larvario se resumen en la Tabla X. Se determinó la presencia de todos los ácidos grasos considerados esenciales para el desarrollo larvario de moluscos: ácido araquidónico, eicosapentanoico y docosahexanoico, que estuvieron presentes en las lavas D mixotróficas (2,7; 5,3 y 6,9%, respectivamente).

En este estadio se encontró también con valores >5% el 16:0, 18:0, 18:1(n-9) y el 18:2(n-6). Al día 8 (larvas umbonadas tempranas) las larvas mostraron mayor proporción de DHA, pero menor en los demás ácidos grasos esenciales; los principales ácidos grasos encontrados fueron el 16:0, 16:2(n-4), 18:0, 18:1(n-9), 18:2(n-6) y el 22:6(n-3). En cambio, a los 22 días PF las larvas pediveliger mostraron similar proporción de EPA, que larvas mixotróficas, pero menor en los demás esenciales. Los ácidos grasos con mayor proporción previo al asentamiento fueron en orden descendente el 16:0, 18:1(n-9), 18:0, 16:1(n-9), 14:0 y el 20:5(n-3).

Tabla X. Composición de ácidos grasos de larvas de *S. prismatica* al día 1, 8 y 22 PF.

	Día 1 (Veliger D)	Día 8 (umbonado temprano)	Día 22 (larvas pediveliger)
14:0	2.43	4.83	6.01
16:0	27.46	19.51	25.36
16:1(n-9)	3.15	3.2	8.73
17:0	1.25	0.93	2.37
16:2(n-4)	2.13	6.02	3.4
18:0	9.43	7.88	12.31
18:1(n-9)	22.76	21.27	13.41
18:2(n-6)	7.95	4.58	3.95
20:0	1.12	2.04	1.5
18:3(n-3)	0.81	4.09	3.26
20:1(n-9)	1.45	2.05	1.61
18:4(n-3)	1.86	2.76	1.07
20:4(n-6) AA	2.68	1.73	1.31
20:5(n-3) EPA	5.31	1.53	5.22
22:4(n-6)	0.54	2.01	0.77
22:4(n-3)	1.69	3.84	2.44
22:6(n-3) DHA	6.90	10.98	3.91
Σ n-3	17.13	23.21	16.83
Σ n-6	11.18	8.32	6.03
Σ n-9	27.36	26.52	24.98
n-3/n-6	1.53	2.79	2.79
Σ MUFA	27.36	26.52	24.98
Σ SAFA	42.20	35.93	48.76
Σ PUFA	30.44	37.55	26.26
Σ INSAT	57.80	64.07	51.24
Σ HUFA	15.00	18.36	13.27

Ácidos grasos menores a 1% no fueron consideradas en la tabla. Los valores están expresados en porcentaje de esteres metílicos de ácidos grasos en relación con lípidos totales. La muestra procesada el día 1 se realizó con larvas mixotróficas (D) sin alimento, las otras dos fueron bajo el régimen control.

La importancia de los ácidos grasos en *S. prismatica*, de acuerdo a estos resultados muestran inicialmente larvas veliger D con cantidades importantes de 16:0, 18:0, 18:1(n-9), 18:2(n-6), 20:5(n-3) y 22:6(n-3) (día 1PF), parecido con lo reportado en *O. edulis* donde en larvas iniciales se reporta como principales el 16:0, 18:0, 20:5(n-

3) y 22:6(n-3) (20); al día 8 (umbonado temprano) los valores de estos aumentaron en unos casos y disminuyeron en otros, los únicos ácidos grasos que aumentaron su concentración fueron el 22:6(n-3) de 6,9 a 10,9%, y el 16:2(n-4) de 2,1 a 6% lo que hace suponer la importancia de estos ácidos grasos en este estadio específico.

En larvas del día 22 (pediveliger) obtuvimos seis ácidos grasos con porcentajes >5%, definiéndolos como de mayor importancia, siendo el 14:0, 16:1(n-9) y 18:0 los que se incrementaron de forma progresiva durante el desarrollo larvario. No obstante, el 16:0, 18:1(n-9) y 22:6(n-3) a pesar de que en el día 8PF disminuyeron en concentración, ya en el día 22 los valores estuvieron parecidos a los iniciales. En síntesis, se podría deducir que los ácidos grasos saturados son la principal fuente de reserva lipídica en la etapa de metamorfosis y asentamiento de *S. prismatica*, éstos incrementaron de 42,2% (día 1 PF) a 48,7% (día 22PF), en cambio los PUFA (26,3%) y los MUFA (24,9%) disminuyeron en relación con la inicial, lo dicho se contrapone a lo reportado para *C. gigas* (111), *R. decussatus* (11) y *V. pullastra* (112).

Lo expuesto lleva a postular la importancia de 16:1 (n-9) (ácido palmitoleico) 16:0 (ácido hexadecanoico), 18:0 (ácido octadecanoico), 18:1 (n-9) (ácido oleico) y 20:5 (n-3) (ácido eicosapentaenoico) como ácidos grasos esenciales en la etapa de metamorfosis y asentamiento. Otros autores informan que 20:5 (n-3) y 22:6 (n-3) son contribuyentes energéticos y estructurales, por ejemplo, en *P. maximus* (113), *O. edulis* (20) y *C. gigantea* (114). Según Da Costa et al. (115), las cepas de microalgas con lípidos altos, sin tener en cuenta la composición cualitativa de los lípidos, no siempre mejoran el rendimiento larvario en los bivalvos. Las relaciones entre el crecimiento y la composición de las microalgas se complican por factores específicos de la dieta, por lo tanto, es probable que las diferencias se deban a la composición bruta de las dietas (116)(16).

## CAPÍTULO 7

### Conclusión

Las dietas mixtas son necesarias para optimizar el crecimiento y la supervivencia en el desarrollo larvario de *S. prismatica*. En consecuencia, se proponen dos alternativas para alimentar las primeras etapas larvarias, utilizando la combinación clásica de microalgas *T. lutea* y *Ch. gracilis*, con una mayor proporción de *T. lutea* en los primeros 6 días (3:1), y luego igualando la proporción 1:1 en los días intermedios de desarrollo larvario hasta la etapa larval umbonada temprana (8-10 PF), y 1:3 en el resto del desarrollo larvario. Otra alternativa que se puede evaluar en futuras investigaciones es incorporar *P. lutheri* en una dieta bialgal con *T. lutea* (1:1), al menos para completar la fase I (6-8 días), y luego incorporar Cg en una dieta mixta en proporciones similares hasta el día 10, cuando la proporción debe cambiarse a 1:1:3 (Pl:Tl:Cg) hasta el estadio de larvas oculadas. La microalga *Nannochloropsis sp* no se recomienda para usarse en cultivo larvario de moluscos, debido a que su calidad nutricional parece ser limitada dada la carencia de ácidos grasos esenciales como el AA, DHA y otros ácidos grasos de importancia como el 14:0, 16:2 (n-4), 20:0, 18:3 (n-3), 18:4 (n-3) y 22:4 (n-6) registrada en este análisis y reportada también por otros autores en cultivos de moluscos.

En síntesis, estos hallazgos muestran que *S. prismatica* podría poseer mecanismos metabólicos para la producción de ácidos grasos esenciales, al menos el ácido araquidónico 20:4(n-6).

Aunque obtuvimos un 20% de larvas pediveliger fijadas a la concha de *S. prismatica* en un 20%, el rendimiento final es bajo, por lo que se considera que no se ha optimizado la tecnología de fase de asentamiento, se recomiendan experimentos

conducentes a la obtención de sustratos adecuados, junto con la inducción a la metamorfosis mediante factores físico-químicos (temperatura etc.), así como químicos (uso de neurotransmisores), en diferentes sustratos, que incluyan el uso de caucho molido, y sustratos con materiales de mayor peso específico, que no puedan ser perturbados con los movimientos cotidianos de flujo de agua en el cultivo. Estudios de sustratos talla dependientes son también aconsejados para optimizar esta importante fase en la producción de semillas de *S. prismatica*.

## Bibliografía

1. Coan E V, Valentich-Scott P. (2012). Bivalve seashells of tropical west America. St Barbar Museum Nat Hist Monogr.;6(4):1–1258.
2. Argüello-Guevara W, Loor A, Sonnenholzner S. (2013). Broodstock Conditioning, Spawning Induction, and Early Larval Development of the Tropical Rock Oyster *Striostrea prismatica* (Gray 1825) . J Shellfish Res.;32(3):665–70.
3. Hernández-covarrubias V, Luis J, Hugo P. (2013). Inferencia multimodelo : cálculo de la talla media de madurez del ostión de roca *Striostrea prismatica* en Nayarit , México. Cienc Pesq.;22:11–8.
4. Loor A, Sonnenholzner S. (2016). Reproductive cycle of the rock oyster, *Striostrea prismatica* (Gray, 1825) from two locations on the southern coast of Ecuador. Aquac Res.;47(5):1432–42.
5. Lodeiros C, Marquez A, Revilla J, Rodríguez D, Sonnenholzner S. (2017). Spat Production of the Rock Oyster *Striostrea prismatica* (Gray, 1825) . J Shellfish Res.;36(3):729–35.
6. Rico-Villa B, Le Coz JR, Mingant C, Robert R. (2006). Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture.;256(1–4):377–88.
7. Uriarte I, Farías A. (1999). The effect of dietary protein content on growth and biochemical composition of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) postlarvae and spat. Aquaculture.;180(1–2):119–27.
8. Brown MR. (2002). Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. Av en Nutr Acuicola VI Memorias ... [Internet].;(Table 1):281–92. Available from: <http://www.nutricionacuicola.uanl.mx/numeros/6/A19.pdf>

9. Ponis E, Probert I, Véron B, Mathieu M, Robert R. (2006). New microalgae for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture.*;253(1–4):618–27.
10. Matias D, Joaquim S, Ramos M, Sobral P, Leitão A. (2011). Biochemical compounds' dynamics during larval development of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758): Effects of mono-specific diets and starvation. *Helgol Mar Res.*;65(3):369–79.
11. Aranda-Burgos JA, Da Costa F, Nóvoa S, Ojea J, Martínez-Patiño D. (2014). Effects of microalgal diet on growth, survival, biochemical and fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* larvae. *Aquaculture [Internet].*;420–421:38–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.032>
12. Ruffell SE, Packull-McCormick SR, McConkey BJ, Müller KM. (2017). Nutritional characteristics of the potential aquaculture feed species *Boeckelovia hooglandii*. *Aquaculture [Internet].*;474:113–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.028>
13. Tang B, Liu B, Wang G, Zhang T, Xiang J. (2006). Effects of various algal diets and starvation on larval growth and survival of *Meretrix meretrix*. *Aquaculture.*;254(1–4):526–33.
14. Knauer J, Southgate PC. (1997). Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a spray-dried freshwater microalga (*Spongiococcum excentricum*) and microencapsulated lipids. *Aquaculture.*;154(3–4):293–303.
15. Farías, A., & Uriarte, I. (2002). Nutrición en Larvicultura de pectínidos: Relevancia de Proteínas y Lípidos. *Avances en Nutrición Acuicola*.
16. Fernández-Pardo A, da Costa F, Rial D, Nóvoa S, Martínez-Patiño D, Vázquez JA. (2016). Use of response surface methodology to determine optimum diets for *Venerupis corrugata* larvae: Effects of ration and microalgal assemblages.

Aquaculture [Internet].;452:283–90. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.005>

17. Waldock MJ, Holland DL. (1984). Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: Polyunsaturated fatty acids. *Lipids*.;19(5):332–6.
18. Delaunay F, Marty Y, Moal J, Samain JF. (1992). Growth and lipid class composition of *Pecten maximus* (L.) larvae grown under hatchery conditions. *J Exp Mar Bio Ecol.*;163(2):209–19.
19. Albentosa M, Beiras R, Camacho AP. (1994). Determination of optimal thermal conditions for growth of clam (*Venerupis pullastra*) seed. *Aquaculture*.;126(3–4):315–28.
20. Labarta U, Fernández-Reiriz MJ, Pérez-Camacho A. (1999). Energy, biochemical substrates and growth in the larval development, metamorphosis and postlarvae of *Ostrea edulis* (L.). *J Exp Mar Bio Ecol.*;238(2):225–42.
21. Sánchez-Lazo C, Martínez-Pita I. (2014). Effects of different mono, bi and trispecific microalgal diets on survival, growth, development, settlement and fatty acid composition of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) larvae. *Aquaculture [Internet]*.;426–427:138–47. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.032>
22. Marshall R, Mckinley S, Pearce CM. (2010). Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves.;33–55.
23. Aarab L, Pérez-Camacho A, Viera-Toledo M del P, de Viçose GC, Fernández-Palacios H, Molina L. (2013). Embryonic development and influence of egg density on early veliger larvae and effects of dietary microalgae on growth of brown mussel *Perna perna* (L. 1758) larvae under laboratory conditions. *Aquac Int.*;21(5):1065–76.
24. García-Lavandeira M, Silva A, Abad M, Pazos AJ, Sánchez JL, Pérez-Parallé

- ML.( 2005). Effects of GABA and epinephrine on the settlement and metamorphosis of the larvae of four species of bivalve molluscs. *J Exp Mar Bio Ecol.*;316(2):149–56.
25. Lydeard C, Cowie RH, Ponder WF, Bogan AE, Bouchet P, Clark SA, et al. (2004). The Global Decline of Nonmarine Mollusks. *Bioscience.*;54(4):321.
  26. Croll RP. (2009). Developing nervous systems in molluscs: Navigating the twists and turns of a complex life cycle. *Brain Behav Evol.*;74(3):164–76.
  27. Gosling, E. (2015). *Marine bivalve molluscs*. John Wiley & Sons.
  28. Haszprunar G. (1992). The first molluscs - small animals. *Bolletino di Zool.*;59(1):1–16.
  29. Campos, J. A., & Fournier, M. L. (1990). El banco de *Ostrea iridescens* (Pterioida: Ostreidae) de Bahía Curú, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 331-333.
  30. Fournier ML. (1992). The reproductive biology of the tropical rocky oyster *Ostrea iridescens* (Bivalvia: Ostreidae) on the Pacific coast of Costa Rica. *Aquaculture.*;101(3–4):371–8.
  31. Ríos-González KG, López-Uriarte E, Chong-Carrillo O, Vega-Villasante F, Chávez-Villalba J. (2018). Rock oyster *Striostrea prismatica* (Gray, 1825): Biology, exploitation and conservation. *Lat Am J Aquat Res.*;46(4):626–44.
  32. Ordinola Zapata, E., Alemán Mejía, S., Montero Rodríguez, P., & Llanos Urbina, J. (2010). La ostra *Crassostrea iridescens* (Hanley) en Tumbes, Perú. Primavera 2007.
  33. Meléndez-galicia C, Estrada-navarrete FD, Hernández-covarrubias V, Arellano-Torres AA, Hernández-Montaña D. (2015). Madurez gonádica del ostión de roca *Crassostrea iridescens*, de la costa de Michoacán , México. *Cienc Pesq.*;23(1):25–36.

34. Cuevas C. A. y Martínez Gro. A. G. (1979). Estudio gonádico de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, *C palmula* Carpenter y *C. iridescens* Hanley , de San Blas, Nayarit, México. ( Bivalvia: Ostreaidae). An Cent Cienc del Mar y Limol Univ Nal Autón México.;6(October 1972):81–98.
35. Frías-Espéricueta MG, Páez-Osuna F, Osuna-López JI. (1997). Seasonal changes in the gonadal state of the oysters *Crassostrea iridescens* and *Crassostrea corteziensis* (Filibranchia: Ostreidae) in the Northwest coast of Mexico. Rev Biol Trop.;45(3):1061–5.
36. Páez-Osuna F, Zazueta-Padilla HM, Osuna-López JI. (1993). Biochemical composition of the oysters *Crassostrea iridescens* Hanley and *Crassostrea corteziensis* Hertlein in the Northwest coast of Mexico: seasonal changes. J Exp Mar Bio Ecol.;170(1):1–9.
37. Loosanoff VL, Davis HC. (1963). Rearing of Bivalve Mollusks. Adv Mar Biol.;1(C):1–136.
38. Uriarte I, Farías A, Castilla JC. (2001). Effect of antibiotic treatment during larval development of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. Aquac Eng.;25(3):139–47.
39. Gonzabay Rodriguez CA. (2014). Incidencia de la Pesca Artesanal en las poblaciones de la Ostra Nativa (*Crassostrea iridescens*) en los arrecifes rocosos de Ayangué, Provincia de Santa Elena.;2(14):137. Available from: [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/6087/1/TESIS%2C Carlos Gonzabay.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/6087/1/TESIS%2C%20Carlos%20Gonzabay.pdf)
40. Walne PR. (1977). Marine mussels; their ecology and physiology. Estuar Coast Mar Sci.;5(1):153–4.
41. Chu FLE, Webb KL, (1987). Hepworth DA, Casey BB. Metamorphosis of larvae of *Crassostrea virginica* fed microencapsulated diets. Aquaculture.;64(3):185–97.

42. Napolitano GE, Ratnayake WMN, Ackman RG. (1988). Fatty acid components of larval *Ostrea edulis* (L.): importance of triacylglycerols as a fatty acid reserve. *Comp Biochem Physiol - Part B, Biochem Mol Biol.*;90(4):875–83.
43. Whyte JNC, Bourne N, Hodgson CA. (1990). Nutritional condition of rock scallop, *Crassadoma gigantea* (Gray), larvae fed mixed algal diets. *Aquaculture.*;86(1):25–40.
44. Langdon CJ, Waldock MJ. (1981). The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J Mar Biol Assoc United Kingdom.*;61(2):431–48.
45. Sühnel S, Lagreze F, Zanette G, Magalhães ARM, Ferreira JF. (2012). Effect of the fatty acid EPA and DHA in the conditioning of the scallop *Nodipecten nodosus* (Linné, 1758). *Aquaculture [Internet].*;330–333:167–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.013>
46. Pernet F, Bricelj VM, Parrish CC. (2005). Effect of varying dietary levels of  $\omega$ 6 polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *J Exp Mar Bio Ecol.*;327(2):115–33.
47. Gallager SM, Mann R. (1986). Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture.*;56(2):105–21.
48. Pernet F, Bricelj VM, Cartier S. (2006). Lipid class dynamics during larval ontogeny of sea scallops, *Placopecten magellanicus*, in relation to metamorphic success and response to antibiotics. *J Exp Mar Bio Ecol.*;329(2):265–80.
49. Loor A, Sonnenholzner S. (2016). Manual de producción de semillas en laboratorio de *Spondylus limbatus.*; MAGAP 1–52.
50. Mock CR. (2009). Report on Penaeid Shrimp Culture Consultation and Visit,

Guayaquil, Ecuador, South America, and Panama, Central America, August 12 To September 20, 1981. *J World Maric Soc.*;13(1-4):165-84.

51. Hirono Y. (2009). Preliminary Report on Shrimp Culture Activities in Ecuador. *J World Maric Soc.*;14(1-4):451-7.
52. Wasielesky W, Atwood H, Stokes A, Browdy CL. (2006). Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture.*;258(1-4):396-403.
53. Bravo M. (2010). Interpretación del estudio multitemporal (Clirsen 1969-2006) de las coberturas de manglar, camaroneras y áreas salinas en la franja costera del ecuador continental.;66. Available from: [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/757/1/Interpretación al estudio multitemproal.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/757/1/Interpretación%20al%20estudio%20multitemproal.pdf)
54. Chávez H. ZG. (2000 ). “Análisis estadístico de la producción camaronera del Ecuador.”;1-7.
55. Cuéllar-Anjel J. Síndrome de taura. Man pruebas diagnóstico para los Anim acuáticos. 2012;1-18.
56. Massaut L, Rodríguez R. (2004). El efecto de la Tilapia sobre la producción de Camarón bajo condiciones de mancha blanca.;2004(4):706.
57. Barriga R. (2012). Lista de Peces de Agua dulce e Intermareales del Ecuador.
58. Andrés J, Sáenz O. (2008). Análisis económico de la producción de tilapia de Ecuador y de la demanda de tilapia de Estados Unidos.;53.
59. Nava-Flores A, Ancona P. (2010). Peces nativos de agua dulce de América del Sur de interés para la acuicultura: Una síntesis del estado de desarrollo tecnológico de su cultivo [Internet]. Vol. 1, FAO. Serie Acuicultura en Latinoamérica.. 200 p. Available from:

<http://www.fao.org/docrep/014/i1773s/i1773s.pdf>

60. Centeno Zambrano AA, Reyes Lucas JH. (2009). Enfermedades del Chame (*Dormitator latifrons*) en cultivo, Tosagua, Manabí, Ecuador.
61. Danilo D, Delgado D. (2018). Producción y exportación del chame en el Ecuador en el período 2013 - 2016. *Rev Obs la Econ Latinoam.*;1–13.
62. López-Alvarado J, Ruiz W. (2014). Desarrollo de la maricultura en el Ecuador: situación actual y perspectivas. *Rev Ciencias del Mar y Limnol [Internet].*;(January 2014). Available from: [https://www.researchgate.net/publication/276206554\\_Desarrollo\\_de\\_la\\_maricultura\\_en\\_el\\_Ecuador\\_situacion\\_actual\\_y\\_perspectivas](https://www.researchgate.net/publication/276206554_Desarrollo_de_la_maricultura_en_el_Ecuador_situacion_actual_y_perspectivas)
63. Alvarez R, Cobo L, Sonnenholzner S, Stern S. (2008). Estado actual de la acuicultura de moluscos bivalvos en Ecuador. *Cultiv y manejo moluscos bivalvos en Am Lat.*;129–33.
64. Loor A. (2012). Influencia de dietas microalgales sobre la tasa de ingestión y crecimiento en juveniles de la ostra de roca. *;(September):*34–6.
65. Revilla J, Márquez A, Rodríguez-Pesantes D, Domínguez-Borbor C, Rodríguez J, Lodeiros C, et al. (2019). Oregano oil as a therapeutic treatment in the production of mixotrophic larvae of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Aquaculture [Internet].*;498(May 2018):422–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.008>
66. Revilla J, Marquez A, Lodeiros C, Sonnenholzner S. (2019). Experimental cultures of giant lion s paw *Nodipecten subnodosus* in equatorial waters of the eastern Pacific: progress in larval development and suspended culture. *Lat Am J Aquat Res.*;47(5):818–25.
67. Lodeiros C, Rodríguez-Pesantes D, Márquez A, Revilla J, Freitas L, Lodeiros-Chacón C, et al. (2018). Growth and survival of the winged pearl oyster *Pteria*

- sterna* (Gould, 1851) in suspended culture in the tropical Eastern Pacific: Influence of environmental factors. *Aquac Res.*;49(2):832–8.
68. Lodeiros C, Rodríguez-Pesantes D, Márquez A, Revilla J, Chávez-Villalba J, Sonnenholzner S. (2018). Suspended cultivation of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the Eastern Tropical Pacific. *Aquac Int.*;26(1):337–47.
  69. Treviño L, Lodeiros C, Vélez-Falcones J, Chávez-Alcivar C, Isea-León F, Bermúdez-Medrandá AE, et al. (2020). Suspended culture evaluation of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in a tropical estuary. *Aquac Res.*;(February).
  70. Loor A, Ortega D, Lodeiros C, Sonnenholzner S. (2016). Early life cycle and effects of microalgal diets on larval development of the spiny rock-scallop, *Spondylus limbatus* (Sowerby II, 1847). *Aquaculture [Internet]*;450:328–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture..08.012>
  71. Marquez A, Lodeiros C, Loor A, Revilla J, Da Costa F, Sonnenholzner S. (2019). Microalgae diet for juveniles of *Spondylus limbatus*. *Aquac Int.*;27(1):323–35.
  72. Patil V, Reitan K, Mortensen L, Källqvist T, Olsen Y, Vogt G, et al. (2005). Microalgae as a source of polyunsaturated fatty acids for aquaculture. *Curr Top plant Biol.*;6(January):57–65.
  73. Ohse S, Bianchini Derner R, Ávila Ozório R, Gordo Corrêa R, Badiale Furlong E, Roberto Cunha PC. (2015). Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. *Idesia (Arica)*;33(1):93–101.
  74. Manuel J, Vega P, Antonio M, Roa C, Sánchez MP. (2010). Effect of culture medium and nutrient concentration on the fatty acid content of *Chaetoceros muelleri*. *Rev Latinoam Biotecnol Ambient y Algal.*;1:6–15.
  75. Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK, Dunstan GA. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture.*;151(1–4):315–31.

76. Miao X, Wu Q, Yang C. (2004). Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. *J Anal Appl Pyrolysis.*;71(2):855–63.
77. Contreras-Flores Ingeniero Bioquímico C, Contreras-flores C, Mario Peñacastro J, Bernardo Flores-cotera Rosa Olivia Cañizares-villanueva L. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Aug.2003;28(8)*.
78. Hernández-Pérez A, Labbé JI. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Rev Biol Mar Oceanogr.*;49(2):157–73.
79. Grobbelaar JU. (2007). Algal Nutrition - Mineral Nutrition. *Handb Microalgal Cult.*;95–115.
80. Brown MR, Blackburn SI. (2013). Live microalgae as feeds in aquaculture hatcheries [Internet]. *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. Woodhead Publishing Limited;. 117–156 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857097460.1.117>
81. Ponis E, Robert R, Parisi G. (2003). Nutritional value of fresh and concentrated algal diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. 2003;221(1–4):491–505.
82. 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) larvae. *Aquaculture.*;230(1–4):417–23.
83. Rivero-Rodríguez S, Beaumont AR, Lora-Vilchis MC. (2007).The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. *Aquaculture.*;263(1–4):199–210.
84. Wikfors GH, T(1984). warog JW, Ukeles R. (1984). Influence of Chemical Composition of Algal Food Sources on Growth of Juvenile Oysters, *Crassostrea Virginica*. *Biol Bull.*;167(1):251–63.

85. Pettersen AK, Turchini GM, Jahangard S, Ingram BA, Sherman CDH. (2010). Effects of different dietary microalgae on survival, growth, settlement and fatty acid composition of blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) larvae. *Aquaculture.*;309(1–4):115–24.
86. Lora-Vilchis MC, Ruiz-Velasco-Cruz E, Reynoso-Granados T, Voltolina D. (2004). Evaluation of five microalgae diets for juvenile pen shells *Atrina maura*. *J World Aquac Soc.*;35(2):232–6.
87. Vivanco G, Oliva D, Abarca A. (2014). Efecto de dietas en base a microalgas tradicionales, nativas y dietas artificiales sobre el crecimiento y supervivencia en larvas velígeras de la almeja taquilla, *Mulinia edulis*. *Rev Biol Mar Oceanogr.*;49(2):339–49.
88. Laing I, Millican PF. (1992). Indoor nursery cultivation of juvenile bivalve molluscs using diets of dried algae. *Aquaculture.*;102(3):231–43.
89. Epifanio CE. (1979). Growth in bivalve molluscs: Nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.). *Aquaculture.*;18(1):1–12.
90. Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. (2006). Open Archive Toulouse Archive Ouverte ( OATAO ) Commercial Applications of Microalgae. *J Biosci Bioengineering.*;101:87–96.
91. Rose RA, Baker SB. (1994). Larval and spat culture of the Western Australian silver- or goldlip pearl oyster, *Pinctada maxima* Jameson (Mollusca: Pteriidae). *Aquaculture.*;126(1–2):35–50.
92. Lora-Vilchis MC, Maeda-Martinez AN. (1997). Ingestion and digestion index of catarina scallop *Argopecten ventricosus-circularis*, Sowerby II, 1842, veliger larvae with ten microalgae species. *Aquac Res.*;28(12):905–10.

93. Sánchez-Lazo C, Martínez-Pita I. (2014). Effects of different mono, bi and trispecific microalgal diets on survival, growth, development, settlement and fatty acid composition of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) larvae. *Aquaculture* [Internet].;426–427:138–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.032>
94. 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) larvae. *Aquaculture*.;230(1–4):417–23.
95. Gallager SM, Mann R, Sasaki GC. (1986). Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture*.;56(2):81–103.
96. Cragg SM. (2016). Biology and Ecology of Scallop Larvae. *Dev Aquac Fish Sci*.;40:31–83.
97. O'Connor S, Moltschaniwskyj N, O'Connor W. (2009). Use of neuroactive catecholamines to chemically induce metamorphosis of hatchery-reared flat oyster, *Ostrea angasi*, larvae. *Aquac Res*.;40(14):1567–77.
98. Hemaiswarya S, Raja R, Kumar RR, Ganesan V, Anbazhagan C. (2011). Microalgae: A sustainable feed source for aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol*.;27(8):1737–46.
99. Volkman JK, Brown MR, Dunstan GA, Jeffrey SW. (1993). The Biochemical Composition of Marine Microalgae From the Class Eustigmatophyceae. *J Phycol*.;29(1):69–78.
100. Pettersen AK, Turchini GM, Jahangard S, Ingram BA, Sherman CDH. (2010). Effects of different dietary microalgae on survival , growth , settlement and fatty acid composition of blue mussel ( *Mytilus galloprovincialis*) larvae. *Aquaculture* [Internet].;309(1–4):115–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.024>

101. Blanchard M, Pechenik JA, Giudicelli E, Connan JP, Robert R. (2008). Competition for food in the larvae of two marine molluscs, *Crepidula fornicata* and *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour.*;21(2):197–205.
102. Vasquez HE, Hashimoto K, Yoshida A, Hara K, Imai CC, Kitamura H, et al. (2013). A glycoprotein in shells of conspecifics induces larval settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One.*;8(12):1–12.
103. Baldwin BS, Newell RI. (1995). Relative importance of different size food particles in the natural diet of oyster larvae (*Crassostrea virginica*). *Mar Ecol Prog Ser.*;120(1–3):135–46.
104. Rico-Villa B, Le Coz JR, Mingant C, Robert R. (2006). Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture.*;256(June):377–88.
105. Babinchak J, Ukeles R. (1979). Epifluorescence microscopy, a technique for the study of feeding in *Crassostrea virginica* veliger larvae. *Mar Biol.*;51(1):69–76.
106. Le Pennec, M., & Rangel-Davalos, C. (1985). Observations en microscopie à épifluorescence de l'ingestion et de la digestion d'algues unicellulaires chez des jeunes larves de *Pecten maximus* (Pectinidae, Bivalvia). *Aquaculture*, 47(1), 39-51.
107. 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):169–80.
108. Martínez-Fernández E, Acosta-Salmón H, Southgate PC. (2006). The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) larvae. *Aquaculture.*;257(1–4):491–503.

109. Wang T, Li Q, Zhang J, Yu R. (2018). Effects of salinity, stocking density, and algal density on growth and survival of Iwagaki oyster *Crassostrea nippona* larvae. *Aquac Int.*;26(4):947–58.
110. González-Araya R, Robert R. (2018). Larval development and fatty acid composition of *Ostrea edulis* (L.) fed four different single diets from conditioning to pre-settlement. *Aquac Res.*;49(5):1768–81.
111. Hur, Y. B., Min, K. S., Kim, T. E., Lee, S. J., & Hur, S. B. (2008). Larvae growth and biochemical composition change of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, larvae during artificial seed production. *Journal of aquaculture*, 21(4), 203-212.
112. Fernández-Reiriz MJ, Pérez-Camacho A, Peteiro LG, Labarta U. (2011). Growth and kinetics of lipids and fatty acids of the clam *Venerupis pullastra* during larval development and postlarvae. *Aquac Nutr.*;17(1):13–23.
113. Delaunay F, Marty Y, Moal J, Samain JF. (1993). The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *J Exp Mar Bio Ecol.*;173(2):163–79.
114. Whyte JNC, Bourne N, Ginther NG, Hodgson CA. (1992). Compositional changes in the larva to juvenile development of the scallop *Crassadoma gigantea* (Gray). *J Exp Mar Bio Ecol.*;163(1):13–29.
115. Da Costa E, Silva J, Mendonça SH, Abreu MH, Domingues MR. (2016). Lipidomic approaches towards deciphering glycolipids from microalgae as a reservoir of bioactive lipids. *Mar Drugs.*;14(5).
116. Knuckey RM, Brown MR, Barrett SM, Hallegraef GM. (2002). Isolation of new nanoplanktonic diatom strains and their evaluation as diets for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture.*;211(1–4):253–74.

117. FAO. 2019. FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2017/FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2017/FAO anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura 2017. Rome/Roma.

## APÉNDICES

Tabla IV. Ración alimenticia diaria de microalgas en el experimento monoalgal, expresada en miligramos de masa seca por litro.

Dieta	Día de cultivo (PF)															
	Fase 1					Fase 2										
	3	4	5	6	7	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
<i>Nannochloropsis sp.</i>	1	1	1	1,5	1,5	2	2	2,2	2,2	2,2	0	0	0	0	0	
<i>Tisochrysis lutea</i>	1	1	1	1,5	1,5	2	2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	
<i>Pavlova lutheri</i>	1	1	1	1,5	1,5	2	2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	
<i>Chaetoceros gracilis</i>	-	-	-	-	-	2	2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	
<i>Chaetoceros muelleri</i>	-	-	-	-	-	2	2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	
<i>Tetraselmis chuii</i>	-	-	-	-	-	2	2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	0	0	
<i>Tetraselmis suecica</i>	-	-	-	-	-	2	2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	
Dieta Control= <i>T. lutea</i>	0,75	0,75	0,75	1,2	1,2	1	1	1,1	1,1	1,1	1,1	0,55	0,55	0,55	0,55	
<i>Ch. gracilis</i>	0,25	0,25	0,25	0,3	0,3	1	1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,65	1,65	1,65	1,65	

-Microalgas no utilizadas en esta fase del experimento. 0= Día en que se dejó de alimentar por la mortalidad masiva de larvas en el tratamiento

Tabla V. Ración alimenticia diaria de microalgas en el experimento bialgal, expresada en miligramos de masa seca por litro.

Dieta	Día de cultivo (PF)															
	Fase 1					Fase 2										
	3	4	5	6	7	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
<i>T. lutea</i> + <i>P. lutheri</i>	0,75	0,75	0,75	1,2	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3:1	0,25	0,25	0,25	0,3	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>T. lutea</i> + <i>P. lutehri</i>	0,5	0,5	0,5	7,25	7,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1:1	0,5	0,5	0,5	7,25	7,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>T. lutea</i> + <i>P. lutheri</i>	0,25	0,25	0,25	0,3	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1:3	0,75	0,75	0,75	1,2	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. lutheri</i>	-	-	-	-	-	1	1	1,1	1,1	1,1	1,1	0,55	0,55	0,55	0,55	
<i>Ch. gracilis</i>	-	-	-	-	-	1	1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,65	1,65	1,65	1,65	
Dieta Control= <i>T. lutea</i>	0,75	0,75	0,75	1,2	1,2	1	1	1,1	1,1	1,1	1,1	0,55	0,55	0,55	0,55	
<i>Ch. gracilis</i>	0,25	0,25	0,25	0,3	0,3	1	1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,65	1,65	1,65	1,65	

La dieta control (*T. lutea*+*Ch. gracilis*) se utilizó en iguales proporciones durante los experimentos mono y bialgal

Tabla conclusión 1. Primera alternativa para dosificar microalgas en el desarrollo larvario de *S. prismatica*.

		Edad larvaria (Días Post fertilización)																					
		1	2	3	4	5	6		7	8	9	10		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Dieta	Ratio	mg/L						ratio	mg/L				ratio	mg/L									
<i>C.gracilis</i>	1	0,25	0,25	0,25	0,3	0,3	0,3	1	1	1	1	1	3	1,5	1,5	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65
<i>T. lutea</i>	3	0,75	0,75	0,75	1,2	1,2	1,2	1	1	1	1	1	1	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

Los valores se expresan en miligramos de masa seca de microalgas por litro

Tabla conclusión 2. Segunda alternativa para dosificar microalgas en el desarrollo larvario de *S. prismatica*.

		Edad larvaria (Días Post fertilización)																					
		1	2	3	4	5	6		7	8	9	10		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Dieta	ratio	mg/L						ratio	mg/L				ratio	mg/L									
<i>P. lutheri</i>	1	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	0,66	0,66	0,66	0,66	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>T. lutea</i>	1	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	0,66	0,66	0,66	0,66	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>C.gracilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	0,66	0,66	0,66	0,66	3	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Los valores se expresan en miligramos de masa seca de microalgas por litro. -En estos días no se utilizó la microalga.

