

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

**“EFECTO DE LAS MICROALGAS *CHAETOCEROS GRACILIS*,
TETRASELMIS SP. E *ISOCHRYSIS GALBANA* SOBRE LA REPRODUCCIÓN
Y DESARROLLO NAUPLIAR EN COPÉPODOS CALANOIDEOS MARINOS
TROPICALES, *ACARTIA SPP.*”**

TESIS DE GRADO

Previa la obtención del Título de:

INGENIERO EN ACUICULTURA

Presentada por:

SANTIAGO CAMBEFORT FLOREZ

GUAYAQUIL – ECUADOR

AÑO

2009

AGRADECIMIENTO

Al DR. FERNANDO y a los demás profesores, colegas y estudiantes, por su ayuda y colaboración para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

**A MI FAMILIA y a la
Facultad de Ingeniería
Marítima y Ciencias del
Mar (FIMCM).**

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

M.Sc. Jerry Landívar Zambrano
Presidente

Dr. Fernando Arcos Cordero
Director de Tesis

M.Sc. Sonia Guartatanga Argudo
Miembro Principal

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).

Santiago Cambefort Florez

RESUMEN

El presente estudio es elaborado en conjunto con el Laboratorio Achotines con el objetivo de estudiar la posibilidad de crear cultivos continuos de copépodos calanoideos marinos del género *Acartia* y mantenerlos como stock de alimento vivo para el cultivo de peces marinos. El trabajo se concentra específicamente en cuanto a la alimentación y reproducción de los copépodos. Se divide en tres partes: la primera detalla los efectos de diferentes dietas de algas sobre el volumen de desove en copépodos adultos, la segunda evalúa el crecimiento larval y la supervivencia en nauplios de *Acartia* alimentados con diferentes dietas, y la tercera verifica la efectividad de un famoso método de cultivo estático propuesto por el investigador Glenn R. Schipp del Darwin Aquaculture Centre.

El trabajo entero se lleva a cabo en un periodo de aproximadamente 2 meses, durante el cual se realizan varios viajes de recolección de plancton que son aprovechados para estudiar la composición, incidencia y fluctuación de las poblaciones de zooplancton en el estero de Cañas dependiendo de la localización y la época.

Los resultados de la investigación brindan una buena base para futuras investigaciones sobre el cultivo de copépodos marinos de la localidad que es de mucho interés para el desarrollo de la piscicultura marina de Panamá.

ÍNDICE GENERAL

Pág.

ÍNDICE GENERAL -----	I
1. INTRODUCCIÓN -----	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 Aspectos biológicos, morfológicos y ecológicos de los copépodos -----	4
2.2 Importancia de los copépodos en la larvicultura de peces marinos -----	6
2.3 Contenido nutritivo de los copépodos -----	10
2.4 Estudios sobre copépodos calanoideos tropicales en el estero de Cañas, Panamá -----	11
2.5 Metodología para el cultivo estático de copépodos calanoideos, <i>Acartia</i> spp. -----	14
3. JUSTIFICACIÓN -----	16
4. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo General -----	17
4.2 Objetivos Específicos -----	17
5. HIPÓTESIS -----	18
6. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	
6.1 Cultivo de algas -----	19
6.2 Recolección de <i>Acartia</i> spp. -----	22
6.3 Ensayo de alimentación vs producción de huevos -----	24
6.4 Ensayo de alimentación vs desarrollo naupliar -----	26
6.5 Ensayo de cultivo estático -----	27
7. RESULTADOS	
7.1 Cultivo de algas -----	29
7.2 Recolecciones en Cañas -----	29
7.3 Producción de huevos -----	33
7.4 Desarrollo naupliar -----	36
7.5 Cultivo estático -----	41

7.6 Medición de parámetros -----	42
8. DISCUSIÓN TÉCNICA	
8.1 Cultivo de algas -----	44
8.2 Recolecciones en Cañas -----	45
8.3 Producción de huevos -----	47
8.4 Desarrollo naupliar -----	48
8.5 Cultivo estático -----	49
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES -----	51
10. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES -----	53
11. BIBLIOGRAFÍA -----	54
12. ANEXOS -----	57

1. INTRODUCCIÓN

El Laboratorio Achotines de la Comisión Interamericana del Atún Tropical (CIAT) en Panamá, en colaboración con el gobierno panameño, ha estado llevando a cabo una serie de investigaciones centradas en la biología y desarrollo larval del atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y de ciertas especies marinas de importancia local como el pargo de la mancha (*Lutjanus guttatus*). Estudios sobre la reproducción, desove y mantenimiento de larvas se han estado efectuando constantemente a lo largo de los años. Aún no se han desarrollado los métodos de cultivo en su totalidad, aunque se los espera realizar en un futuro cercano. Existen muchas variantes por investigar y descubrir, en especial relacionadas con la alimentación. La complejidad radica en los requerimientos nutricionales específicos que demandan dichas larvas al inicio de sus vidas. Pruebas suministrando rotíferos y *Artemia*, previamente enriquecidos, han dado resultados bajos en supervivencia. Otras pruebas reportan aumento en los niveles de supervivencia al administrar nauplios de copépodos calanoideos *Acartia* como alimento inicial (Doi, 1997). Sin embargo, el cultivo sostenible de copépodos calanoideos *Acartia* en el laboratorio no es tan simple como el de los alimentos vivos tradicionales (rotíferos y *Artemia*).

Josianne G. Stottrup, científica e investigadora trabajando con el Danish Institute for Fisheries and Marine Research en Dinamarca, centro de investigación relacionado con acuicultura, desarrolló exitosamente en 1986, junto con otros investigadores, un método para producir grandes cantidades de *Acartia tonsa* en el laboratorio. Básicamente, la técnica se fundamenta en un sistema de cultivo continuo formado por dos subsistemas de cría y reproducción. Diariamente se recolectan huevos de los tanques de desove y se siembran en los tanques de crecimiento. El mantenimiento es llevado a cabo mediante un régimen alimenticio a base de dietas monoalgales, *Rhodomonas baltica* en adultos e *Isochrysis galbana* en nauplios. Intentos de reproducir dicha metodología en el Laboratorio Achotines se han llevado a cabo, pero sin éxito. Según los expertos, los copépodos adultos parecen adaptarse y reproducirse bien, pero los nauplios presentan problemas en cuanto a desarrollo y supervivencia. Se cree que el problema deriva de la alimentación, y del hecho de que la metodología fue creada en función de copépodos calanoideos de clima templado. Los copépodos exhiben una amplia variedad de hábitos alimenticios, según el sitio en el que vivan.

Otro centro llamado el Darwin Aquaculture Centre (Australia) presentó en 1998 un método simple para el cultivo masivo de copépodos calanoideos tropicales *Acartia* spp, encabezado por el investigador Glenn R. Schipp. A diferencia del método anterior, este se basa en mantener cultivos estáticos por períodos cortos de tiempo utilizando parámetros tropicales y empleando una dieta pluri-algal (mix). Aún no se prueba esta técnica en Achotines, así como tampoco se ha experimentado con una dieta mix de microalgas. La simplicidad del mantenimiento de los cultivos y la baja mano de obra requerida le dan un gran atractivo a este método. Por otra parte, siendo la técnica desarrollada a partir de copépodos calanoideos

“tropicales”, se podría pronosticar un buen resultado si se implementase en cualquier localidad de clima tropical.

Aún así, se desconoce cual es la dieta ideal para el cultivo sostenible de *Acartia* en el área del Pacífico al sur de la península de Azuero, Panamá. En colaboración con el investigador y administrador del departamento de cultivo de plancton del Laboratorio Achotines, Ing. Luis Tejada, se llevarán a cabo ensayos profundizando en cuanto a la alimentación y el efecto que esta tiene sobre la reproducción y desarrollo de *Acartia*. Se recolectarán poblaciones salvajes y serán sometidas a pruebas de alimentación en tanques de 20 litros. Se dispone de 3 especies de microalgas (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis* sp.), las cuales independientemente y en combinación serán brindadas a los copépodos para registrar datos en cuanto a desove y desarrollo naupliar. Luego de aclarar dichos puntos, se analizará la posibilidad de desarrollar un protocolo con el fin de mantener una constante fuente de copépodos calanoideos marinos *Acartia* en cautiverio en el Laboratorio Achotines.

2. ANTECEDENTES

2.1 Aspectos biológicos, morfológicos y ecológicos de los copépodos

Los copépodos de vida libre forman el grupo más extenso de crustáceos pequeños, del Phylum Arthropoda, Clase Crustácea. El grupo es muy diverso, con más de diez mil especies diferentes que ocupan diversos nichos ecológicos. Los copépodos de vida libre habitan tanto en agua marina como en agua dulce, estuarios, lagos salados tierra adentro, etc. Algunos viven hasta en el agua que se estanca en la tierra. Muchos son parasíticos, otros nadan libremente como parte del plancton y otros son bénticos. Pocos copépodos tropicales exceden 2 milímetros de longitud como adultos, aunque algunos otros de agua marina fría alcanzan hasta 10 mm. Los tres grupos principales de copépodos marinos son: los Calanoida, animales planctónicos que nadan; los Cyclopoida, pueden ser planctónicos o parasíticos; los Harpacticoida, que son casi totalmente bénticos.

El cuerpo de los copépodos de vida libre es algo cilíndrico, aunque existen excepciones de esta regla, y está usualmente integrado por tres regiones: la cabeza o céfalo, el tórax y el abdomen. El tronco lo forman tórax y abdomen. La cabeza está fusionada con el primero de los seis segmentos torácicos, y en ocasiones también con el segundo, y tiene 6 pares de apéndices cefálicos. La cabeza y el tórax constituyen la parte anterior denominada cefalotórax o cefalosoma y en cuya superficie ventral se encuentran 5 pares de apéndices torácicos. Durante los lapsos de alimentación de los copépodos calanoideos,

que demoran aproximadamente 10 a 30 segundos, las primeras antenas actúan como sensores para detectar algas; los demás apéndices anteriores forman un campo de flujo que lleva agua hasta el animal. El abdomen está desprovisto de apéndices. Los copépodos de vida libre carecen de branquias y, salvo por los calanoideos y algunas especies parasíticas, no hay corazón ni vasos sanguíneos. Los órganos excretorios son glándulas maxilares.

Los copépodos pasan por etapas de crecimiento muy distintas. Primero emergen de huevos como nauplios, y luego de 6 estadios naupliares de crecimiento (N-I a N-VI) la forma del cuerpo cambia metamórficamente y una serie de estadios de copepodito prosiguen (usualmente 5). La duración del ciclo completo varía de una especie a otra y puede abarcar de una semana hasta más de un año. La cantidad de generaciones por año depende del hábitat de la especie. Luego de los 5 estadios de copepoditos, los individuos se convierten en adultos. Los sexos pueden ser identificados, los animales están listos para iniciar el apareo. La reproducción en los copépodos es sexual. Los copépodos machos son por lo general más pequeños que las hembras que a la vez son mucho más abundantes. Los copépodos están entre los pocos crustáceos pequeños que forman espermatóforos, y la parte inferior del espermiducto está modificada con este fin. Durante la cópula, el macho asegura a la hembra inmovilizando por medio de sus diversos apéndices y transfiere el espermatóforo mediante el quinto apéndice natatorio, o flexionando su urosoma sobre el de la hembra. Los espermatozoides, almacenados en los receptáculos seminales femeninos, van fecundando los óvulos a medida que estos descienden por los oviductos y salen por el gonoporo. Los huevos pueden ser liberados uno por uno (mayor parte de los calanoideos) y en otros casos quedan pegados entre sí

por una sustancia gelatinosa, formando una o dos estructuras semejantes a racimos de uva adheridos al segmento genital (sacos ovígeros u ovisacos).

Los copépodos son ecológicamente importantes. Copépodos calanoideos marinos son grandes consumidores de fitoplancton en el mar, convirtiendo producción primaria (algas) en producción secundaria (tejido animal) y detrito fecal. Se alimentan de algas en suspensión, por lo general diatomeas y otras microalgas microscópicas, y pasan la mayoría del tiempo ya sea comiendo o nadando en la columna de agua. La rapidez de alimentación, crecimiento, reproducción y defecación de los copépodos planctónicos depende de la abundancia y calidad de alga presente. Cuando las especies algales son sumamente nutritivas y abundantes, la rapidez de crecimiento y de producción de heces se maximiza. A concentraciones más bajas de alimento, el crecimiento puede ser igual de rápido con una conversión alimenticia más elevada y una menor cantidad de alimento excretado. A través de la excreción, los copépodos retornan nutrientes solubles al agua y permiten que esos nutrientes sean aprovechados por las algas. Aunque la mayor parte de los copépodos planctónicos viven en los 50 metros superiores del mar, varias especies viven a mayores profundidades, incluso en las zonas batiales. El movimiento vertical está orientado por la luz, por lo que algunas especies exhiben migraciones verticales diarias.

2.2 Importancia de los copépodos en la larvicultura de peces marinos

En la cría de larvas de peces marinos, la calidad alimenticia es un factor clave que determina el temprano desarrollo, posterior crecimiento y salud de los animales. Niveles bajos de supervivencia resultan por larvas mal alimentadas. Las consecuencias por mal

nutrición durante el desarrollo larval de los peces pueden ser obvias, por ejemplo deformidades o mala pigmentación, pero en muchos casos pueden ser complejas (baja tolerancia a temperaturas, mal crecimiento en estadíos futuros, etc.). El mayor obstáculo para iniciar un cultivo de peces marinos es el hecho de que las pequeñas larvas no pueden ser mantenidas con alimentos artificiales, lo que fuera ideal. Por lo tanto, la solución óptima hasta ahora ha sido el desarrollo de sistemas para la producción sostenible de alimentos vivos para larvas de peces marinos.

Muchas especies de peces marinos necesitan consumir alimento vivo en su etapa crítica de alimentación larval, justo después de haber consumido sus reservas vitelinas. En el mar, los alimentos vivos con mayor probabilidad de ser encontrados por larvas de pez debido a su abundancia son los nauplios de copépodos. Los copépodos constituyen la mayor fuente de proteína en los océanos y juegan un papel importante en el temprano desarrollo y crecimiento de un sinnúmero de peces y crustáceos marinos. Son considerados el principal alimento inicial de muchos alevines marinos debido a su abundancia, gran diversidad de especies y rangos de tamaños entre nauplios y adultos (Cabrera et al., 2002). Los copépodos del orden Calanoida, por ejemplo los del género *Acartia*, son básicamente planctónicos. Capturan materia suspendida en la columna de agua, donde justamente son consumidos por larvas de peces marinos pelágicos. Han probado ser importantes en la dieta inicial de muchas larvas pelágicas. La gran variedad de copépodos calanoideos y su importancia como el alimento mayormente consumido por larvas de peces pelágicos en el medio marino ha sugerido la posibilidad de aislar y cultivarlos a fin de resolver los problemas de supervivencia larvaria de peces en los primeros estadíos críticos de desarrollo. En algunos centros relacionados con acuicultura,

ciertas especies del género *Acartia* han sido estudiadas, mantenidas artificialmente en cautiverio y exitosamente cultivadas. Sin embargo, los alimentos vivos tradicionales (rotífero y *Artemia*) predominan en la industria debido a sus bajos costos y fácil producción de alta densidad. Aunque de menor valor nutritivo, estos alimentos vivos han trabajado bien en la larvicultura de muchos peces y crustáceos a través de los años. Las altas densidades utilizadas para el cultivo de rotíferos y *Artemia*, en contraste con las densidades moderadas implementadas en el cultivo de copépodos, ponen en duda la eficiencia de producción resultante al cultivar copépodos calanoideos marinos. A concentraciones altas se observa un incremento en la mortalidad y una baja producción de huevos. Su uso en acuicultura permanece esporádico.

Copépodos harpacticoideos (bénticos) han sido cultivados intensivamente con éxito y utilizados como alimento vivo para el cultivo de muchas larvas de peces marinos bénticos. Esta clase de copépodos tiene los métodos más simples y efectivos para el cultivo en masa. Sin embargo, los harpacticoideos solo funcionan en cuanto a larvas bénticas.

En algunos sistemas acuícolas se recolectan copépodos calanoideos salvajes y se cultivan externamente en grandes unidades extensivas o semi-intensivas que son previamente fertilizadas para promover bloom de algas (método Thai para pargo rojo, *Lutjanus argentimaculatus*). Luego de aproximadamente 2 días, cuando el número de nauplios se eleva, el contenido es presentado a las larvas en su totalidad, ya sea introduciendo las larvas en las unidades o cosechando y presentando en los tanques larvales. Copépodos calanoideos salvajes han sido exitosamente utilizados en el cultivo de diversas especies

de peces marinos utilizando este método. Sin embargo, nunca es conveniente depender de una población zooplanctónica salvaje que naturalmente fluctuará en un momento determinado y limitará la habilidad de mantener un sistema productivo constante (Schipp et al., 1998). También existen los sistemas mesocosmos, los cuales han sido tradicionalmente utilizados para el cultivo de diversas especies de peces marinos en países asiáticos (particularmente Japón y Taiwán), países europeos, Estados Unidos y Ecuador. El método consiste básicamente en fertilizar grandes tanques (10 toneladas o más) y añadir organismos de fito/zooplancton recolectados del mar. Además de presentar la misma desventaja en cuanto a organismos salvajes, no existe un protocolo estándar para criar peces marinos utilizando estos sistemas y estudios reportan índices de supervivencia larval muy variables (Benetti, 1997). Estudios considerables sobre técnicas de cultivo intensivo se necesitan llevar a cabo para que en algún futuro cercano los copépodos calanoideos sean tan comúnmente utilizados como los rotíferos o *Artemia*. Una interesante ventaja de los copépodos calanoideos es que, bajo condiciones apropiadas, algunas especies producen huevos de letargo similares a los de *Artemia*, detalle que les da un gran atractivo comercial.

En el laboratorio, larvas de peces marinos son mantenidas tradicionalmente mediante una dieta de *Artemia salina*, ó *Brachionus plicatilis* (rotíferos) seguido por *Artemia*. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que dietas compuestas por nauplios de copépodos resultan en un mejor desarrollo, crecimiento y supervivencia en muchas especies de larvas de peces marinos. De hecho, ha sido imposible criar larvas de un sinnúmero de peces marinos utilizando rotíferos o *Artemia* como alimento inicial, pero se ha logrado utilizando nauplios de copépodo. Marcus N. (2005) determinó beneficios al

utilizar nauplios de copépodos como alimento alternativo para larvas de lenguado (*Paralichthys lethostigma*). Lo comprobó comparando la supervivencia y el crecimiento en larvas alimentadas con 3 dietas diferentes: 2 dietas monoespecíficas de rotíferos (*B. plicatilis* y *B. rotundiformis*) y una dieta mix de nauplios de *Acartia tonsa* y rotíferos *B. plicatilis* (1:1). Las larvas obtuvieron una supervivencia promedio de 23%, 31% y 71% respectivamente, y demostraron mayor alcance de peso y tamaño con la dieta mix, así indicando que los nauplios de *A. tonsa* son un excelente alimento alternativo para las larvas de lenguado. Otras pruebas con especies marinas como el lenguado (*Scophthalmus maximus*) y el pargo rojo (*Lutjanus campechanus*) han demostrado que al ofrecer dietas mix de zooplancton las larvas consumen más nauplios de copépodos que rotíferos, y se deduce que la preferencia se debe a las diferencias de tamaño y de movimiento natatorio. En Acuicultura, los estudios han demostrado que los copépodos tienen mayor valor nutritivo que *Artemia* porque cubren mejor los requerimientos nutritivos de larvas de peces marinos, además, pueden ser suministrados como nauplios, copepoditos o adultos (Velásquez *et al.*, 2001). Más evidencia de que los copépodos son mayormente preferidos por larvas como alimento vivo que *Artemia* viene del trabajo de Pedersen, 1984, en el cual examinó la digestión en larvas de arenque (*Clupea harengus*) y determinó que los copépodos eran pasados con mayor rapidez a lo largo del sistema digestivo y eran digeridos con mayor eficiencia que *Artemia*. Además, analizando la digestión de las larvas, Pedersen notó una pausa justo antes de entrar los copépodos al estomago, a contrario de *Artemia*, y se dedujo, hipotéticamente, que esto puede, de alguna manera, estar relacionado con la liberación de enzimas digestivas necesarias para el proceso de digestión. Witt *et al.* (1984) y Nellen (1985) implementaron estudios utilizando dietas de *Artemia* suplementadas con plancton salvaje recolectado y obtuvieron mejores resultados

en términos de crecimiento, supervivencia y en el desarrollo de pigmentación en las larvas. Watanabe et al. (1983) indicó que el contenido nutricional de *Artemia* es extremadamente variable y bajo en los ácidos grasos esenciales C₂₀ y C₂₂ de la familia linoléica (omega3). Sin embargo, esta deficiencia puede ser corregida alimentando *Artemia* previamente con una dieta rica en estos ácidos grasos altamente insaturados. Aún así corregido el contenido nutricional, permanece el problema en cuanto a la baja digestibilidad de *Artemia* (Nellen, 1985).

2.3 Contenido nutritivo de los copépodos

Los copépodos son naturalmente ricos en los ácidos grasos de la familia linoléica, y poseen un contenido de proteína de 44 a 52% con un buen perfil de aminoácidos. Otra ventaja de los copépodos es la calidad y cantidad de contenido de enzimas digestivas presentes en los copepoditos y adultos, que juegan un rol importantísimo como alimento de las primeras fases larvales de peces y crustáceos. Su típico movimiento en zig-zag es un importante estímulo de aceptabilidad para muchos peces, los cuales los prefieren antes que a los rotíferos (Velásquez *et al.*, 2001). Muchos peces marinos necesitan consumirlos al inicio de sus vidas para lograr un correcto desarrollo y sobrevivir. Los copépodos calanoideos marinos tienen la composición bioquímica de su dieta reflejada en sus tejidos corporales y en sus reservas, de tal manera que los ácidos grasos como el ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexanoico (DHA), que son esenciales en la dieta de larvas de peces marinos (y otros vertebrados), pueden ser suplementados naturalmente a través de una cadena alimenticia encabezada por fitoplancton luego copépodos herbívoros y por último peces (Rippingale & Payne, 2001). Estos ácidos

grasos, no sintetizados por animales, son indispensables en la dieta de larvas de peces marinos para asegurar un normal desarrollo de sus sistemas nerviosos.

Los copépodos poseen un contenido nutritivo inigualable, superior al de los alimentos vivos tradicionales (rotíferos y *Artemia*). Estudios han comprobado que el suministro de dietas monoalgales en el cultivo de copépodos calanoideos no resulta en un deterioramiento severo del valor nutritivo de los copépodos, al menos en términos de sus ácidos grasos insaturados.

2.4 Estudios sobre copépodos calanoideos tropicales en el estero de Cañas, Panamá

El estero de Cañas, tan solo a 20 minutos en carro del Laboratorio Achotines, ubicado en la costa Pacífica panameña al sur de la península de Azuero, está formado por un estrecho paso entre la alongada isla de Cañas y la costa panameña. Tiene más de un kilómetro de longitud y posee una gran biodiversidad. El gobierno panameño protege esta área como patrimonio natural. En el estero convergen varios ríos que se mezclan con el agua marina, así aportando una gran cantidad de nutrientes y formando un ambiente muy prolífero para las comunidades planctónicas.

Uye, S. (1997), investigador y profesor en la facultad de Ciencias Biológicas Aplicadas de la Universidad de Hiroshima, visitó el Laboratorio Achotines y estudió la ocurrencia y composición taxonómica del zooplancton en el estero de Cañas en la costa Pacífica de Panamá. Reportó la existencia de enormes cantidades de copépodos, principalmente especies de los géneros *Acartia* y *Oithona*. Recomendó el uso de *Acartia* para producción

masiva debido a que se pueden cultivar alimentando con fitoplancton y debido a que son más fecundos que *Oithona*. Estudió el crecimiento y desarrollo de los copépodos *Acartia* del estero de Cañas bajo condiciones de laboratorio en micro cultivos y reportó que el ciclo de vida consiste de 6 estadios naupliares, 5 estadios de copepodito, y adulto. Algunos caracteres morfológicos de cada estadio de desarrollo menciona:

N-I (Cuerpo.- longitud: 120 μm , ancho: 75 μm)

Forma oval. 3 pares de apéndices, primeras antenas, segundas antenas y mandíbulas. Este estadio es de no alimentación, dependiendo del contenido del vitelo. Dura aproximadamente 12 horas.

N-II (Cuerpo.- longitud: 140 μm , ancho: 75 μm)

Cuerpo alargado. El número de apéndices es el mismo (N-I), pero el número de espinas y segmentos de cada apéndice aumenta. Dos espinas caudales se distinguen. Primer estadio de alimentación. Dura entre 12 y 18 horas.

N-III (Cuerpo.- longitud: 150 μm , ancho: 80 μm)

Cuerpo agrandado. El número de apéndices es el mismo. Dura aproximadamente 12 horas.

N-IV (Cuerpo.- longitud: 170 μm , ancho: 85 μm)

Los primeros maxilares en forma rudimentaria. Dura aproximadamente 12 horas.

N-V (Cuerpo.- longitud: 190 μm , ancho: 95 μm)

Los segundos maxilares en forma rudimentaria. Dura aproximadamente 12 horas.

N-VI (Cuerpo.- longitud: 230 μm , ancho: 110 μm)

Pies natatorios empiezan a notarse. Todo el conjunto de estadios naupliares dura aproximadamente 3 días, a una temperatura de 27°C.

C-I (Torso.- longitud: 340 μm , ancho: 110 μm)

El cambio morfológico de N-VI a C-I es bastante remarcable, tanto que se lo considera metamórfico. El torso consiste de una cabeza provista de 6 pares de apéndices (primeras antenas, segundas antenas, mandíbulas, primeros maxilares, segundos maxilares y maxilípedos) y 2 segmentos torácicos, cada uno provisto de un par de pies natatorios. El urosoma consiste de un segmento. El estadio dura menos de 24 horas.

C-II (Torso.- longitud: 460 μm , ancho: 150 μm)

La sección torácica ahora consiste de 3 segmentos, cada uno provisto de un par de patas natatorias. El urosoma ahora consiste de 2 segmentos. Dura menos de 24 horas.

C-III (Torso.- longitud: 550 μm , ancho: 180 μm)

El tórax consiste de 4 segmentos, cada uno con un par de patas natatorias. El urosoma consiste de 3 segmentos.

C-IV (Torso.- longitud: 630 μm , ancho: 210 μm)

Aparece una quinta pata natatoria. El urosoma ahora consiste de 4 segmentos. A partir de este estadio se puede distinguir el sexo de acuerdo a la morfología de la quinta pata natatoria.

C-V (Torso.- longitud: 820 μm las hembras y 800 μm los machos, ancho: 260 μm las hembras y 255 μm los machos)

La morfología es similar a la de C-IV. Hay incremento del 1er segmento.

C-VI, *adulto* (Torso.- longitud: 980 μm las hembras y 850 μm los machos, ancho: 290 μm las hembras y 280 μm los machos)

Concluyó que el mínimo tiempo de vida de huevo a adulto de los copépodos *Acartia* del estero de Cañas es de 8-9 días a 27° centígrados, y que el índice promedio de producción de huevos por día por hembra es de 26,5 huevos.

El mismo año (1997), el investigador Masanori Doi de la Overseas Fisheries Cooperation Fund de Japón (OFCF) llevó a cabo experimentos de cultivo en el Laboratorio Achotines con la misma especie *Acartia* del estero de Cañas. Implementó ensayos de alimentación en adultos utilizando las microalgas *Nannochloropsis* sp., *Tetraselmis* sp. y *Chaetoceros gracilis*, para luego analizar los efectos de cada una sobre el desove. Reportó una gran producción de huevos y nauplios pequeños al utilizar la microalga diatomea *Chaetoceros*, seguida por *Tetraselmis* y por último *Nannochloropsis* con pobres resultados. *Chaetoceros* resultó ser la especie más efectiva para maduración y desove en adultos de *Acartia* del estero de Cañas. Diversos estudios de alimentación en especies de copépodos

calanoideos marinos han delatado una gran aceptación de los copépodos hacia especies de microalgas diatomeas, de forma que los resultados de Doi se corroboran. *Tetraselmis* sp. ha sido utilizada exitosamente como alimento principal en el cultivo del copépodo calanoideo marino *Acartia plumosa*, razón por la cual Doi también la incluyó en los experimentos. *Nannochloropsis*, la cual fue pobremente aceptada y consumida por los copépodos, obtuvo malos resultados probablemente debido a su pequeño tamaño de célula, comparado a los mayores tamaños de *Chaetoceros* y *Tetraselmis*. Abdullahi (1992) señala que en la captura de un gran número de organismos de pequeño tamaño existe posiblemente un mayor gasto de energía que en la captura de organismos de peso o volumen similares a la del predador; lo que podría indicar un menor gasto energético para los copépodos adultos al capturar y alimentarse con microalgas de tamaño celular grande.

2.5 Metodología para el cultivo estático de copépodos calanoideos, *Acartia* spp.

Schipp et al. (1998) desarrolló un método sostenible, altamente productivo y bajo en costos para mantener una población stock de copépodos calanoideos tropicales *Acartia* spp. en el laboratorio del Darwin Aquaculture Centre (Australia). No existe cosecha de huevos en este sistema, los cultivos corren estáticamente. Las altas temperaturas que emplean en su localidad (28-32 °C) dan un rápido tiempo de generación de aproximadamente 5 a 7 días, razón por la cual sus índices de producción exceden los reportados para *Acartia* de clima templado (Stottrup et al., 1986). Los tanques de cultivo son manejados como pequeños mesocosmos o cultivos batch. Una vez sembrados con adultos (50/L), no se los toca hasta que se reproduzcan y generen nueva población, todo en un solo ambiente. Al cabo de 8 días los cultivos son cosechados. La cosecha es filtrada

en un tanque especial de lavado provisto con una malla/drenaje de 200 μm . El filtrado elimina rotíferos y nauplios de copépodos, únicamente dejando adultos y copepoditos que se utilizarán para resembrar los tanques stock y los tanques de producción (si es que existe alguna demanda). Los cultivos stock son mantenidos en tanques de 100 litros y son alimentados diariamente con una dieta mixta de *Rhodomonas* sp., *Tetraselmis* sp. e *Isochrysis* sp. (2:1:1) a una concentración total de 2×10^4 cel/ml. Los tanques de producción son de mayor volumen (1000 L) y se manejan de la misma manera. La salinidad de los tanques es mantenida entre 30-34 ppt. Se aplica aireación suave desde el fondo de los tanques. Limpiando los tanques cada 8 días y utilizando una dieta moderada permite que el mantenimiento diario de varios cultivos de 1000 litros pueda ser completado por una persona en media hora. Para la cosecha, tomará aproximadamente 2 horas de trabajo drenar y filtrar los cultivos.

Una de las principales diferencias entre este sistema de cultivo y el de Stottrup es que los cultivos son resembrados utilizando adultos y copepoditos en vez de huevos o nauplios. Schipp et al. (1998) justifican que no utilizan los huevos debido a que son muy difíciles de separar del detrito del fondo de los tanques. El ciclo de 8 días, además de permitir el engendro de una nueva generación, se valuó como el tiempo óptimo bajo las condiciones climáticas tropicales para maximizar la productividad de los copépodos. Luego de 8 días la calidad de agua se deteriora mucho como consecuencia del sistema estático. Una ventaja que brinda este sistema es que remueve organismos indeseables comúnmente encontrados en plancton recolectado del mar. Son eliminados luego de una o dos generaciones en el laboratorio.

3. JUSTIFICACIÓN

Los copéodos son considerados el alimento vivo ideal en la larvicultura de peces marinos. Surge entonces la imperiosa necesidad de implementar estudios biológicos de las especies de copéodos de mayor interés comercial para de esta forma, en un futuro, poder desarrollar protocolos de cultivo viables para la producción masiva de estos organismos en cautiverio.

Lógicamente, el beneficio se proyectaría hacia todo el sector acuícola marino donde por consecuencia saldrían a relucir nuevos campos para el desarrollo y cultivo de peces marinos tropicales de gran valor comercial. El presente estudio contribuirá a los propios avances investigativos del Laboratorio Achotines y a el continuo desarrollo de la piscicultura marina tropical latinoamericana.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de las microalgas *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis* sp. e *Isochrysis galbana* sobre la reproducción y propagación de copépodos tropicales calanoideos marinos *Acartia* spp.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Evaluar, en condiciones de temperatura e iluminación naturales, el efecto de 4 diferentes dietas algales sobre la producción de huevos en copépodos adultos *Acartia* spp.
- 2) Evaluar, en condiciones de temperatura e iluminación naturales, el efecto de las mismas 4 dietas sobre el crecimiento y desarrollo en nauplios de copépodos *Acartia* spp.
- 3) Verificar mediante pruebas de ensayo y error la posibilidad de mantener pequeños cultivos estáticos de copépodos *Acartia* spp. en el laboratorio como fuente artificial para pruebas posteriores.

5. HIPÓTESIS

El suministro de la microalga diatomea *Chaetoceros gracilis* independientemente como alimento en la dieta de copépodos calanoideos marinos adultos *Acartia* spp. provenientes del estero de Cañas demuestra brindar mejores resultados que las microalgas *Tetraselmis* sp. e *Isochrysis galbana* en cuanto a producción de huevos, mientras que el desarrollo naupliar se encuentra mayormente beneficiado al utilizar independientemente la microalga *Isochrysis galbana* que las microalgas *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis* sp.

6. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

6.1 Cultivo de algas

Previo al inicio de los ensayos, se llevan a cabo diversos cultivos de microalgas en el laboratorio de cultivo de plancton para asegurar la constante disponibilidad de un buen stock de alimento. Se escogen tres especies tomando en cuenta su fácil crecimiento, su adaptabilidad al trópico y sobre todo los valores alimenticios que proporcionan como dieta. Experimentos llevados a cabo anteriormente por distintos autores en cuanto a la alimentación de copépodos calanoideos marinos del estero de Cañas, así como diversos reportes de ensayos de alimentación realizados en el exterior, también brindaron una buena base teórica para definir las especies de microalgas a utilizar.

Especies de microalga:

(1) *Chaetoceros gracilis*.- diatomea solitaria de forma rectangular cuyas dimensiones son de 8-12 x 7-10 μm . Tienen tolerancia a aguas hasta de 40°C. Sus valores nutricionales presentan un 23,94% de proteínas, 8,69% de lípidos y 19,01% de carbohidratos.

(2) *Tetraselmis* sp.- alga móvil, comprimida elipsoidal con 4 flagelos, el extremo posterior agudo y el extremo anterior de 4 lóbulos. Es de un color verde brillante, de 7 μm de diámetro y 10-16 μm de largo. Es una especie eurihalina con capacidad de formar esporas cuyos límites de tolerancia a variables físicas son muy amplios. Contiene 49,22% de proteína, 10,60% de lípidos y 16,38% de carbohidratos.

(3) *Isochrysis galbana*.- microalga pequeña y móvil con una tamaño celular promedio de 5 x 3,5 μm . Es un excelente alimento para los estadios naupliares de copépodos calanoideos, y es rica en el ácido graso insaturado docosahexanoico (DHA) que ha probado ser beneficioso para el crecimiento, desarrollo y supervivencia de larvas de peces marinos. Altos niveles de DHA pueden también producir efectos positivos en la productividad a largo plazo de los copépodos.

Proceso de cultivo:

Buena higiene es esencial para cultivar algas exitosamente. Los cultivos son llevados a cabo en el laboratorio de cultivo de plancton, un ambiente limpio y de condiciones controladas (aire acondicionado, luz artificial, desinfección diaria). El laboratorio cuenta con dos espacios: uno pequeño de condiciones artificiales intensivas (donde se cultiva con recipientes pequeños y carboys) y uno grande de condiciones moderadas (donde se cultiva con cilindros). El cuarto pequeño es de mayor cuidado ya que contiene el banco de cepas, los microscopios y demás equipos delicados.

En general, se utiliza el medio Guillard f/2 como fertilizante. Hay suficiente stock de químicos, elementos traza y vitaminas para la entera duración del proyecto.

Químicos	Cantidad requerida
NaNO ₃	250-500 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	100-250 g
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	250-500 g
Na ₂ EDTA	100-250 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	10-50 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	10-50 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10-50 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	10-50 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	10-50 g
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	10-50 g
Tiamina HCL	5 g
Biotina	500 mg
B ₁₂	500 mg

Además del medio Guillard f/2, se añaden silicatos para el caso de las diatomeas (*Chaetoceros gracilis*). El agua marina que se recolecta para utilizar en los cultivos recibe un tratamiento especial. Es pasada por filtros de arena, de cartucho, de ultravioleta y por último por filtros de bolsa de una micra. Luego, es colocada en total obscuridad por un mínimo de 10 días para eliminar protozoarios y/u organismos pequeños contaminantes. En cuanto a vidriería, se utilizan recipientes (beakers) de 500 ml, previamente autoclavados, y carboys y cilindros de 20 y 80 litros respectivamente. Los carboys y cilindros se lavan y desinfectan con jabón y cloro respectivamente por 24 horas antes de

ser utilizados. Los recipientes son rotulados con fecha de siembra para llevar un control del crecimiento del alga y de la edad de los cultivos.

Previo al arranque de cada ensayo se cuenta con un buen stock de microalgas previamente cultivadas en cilindros y carboys. Se mide la densidad de células de cada carboy/cilindro sembrado para asegurar que se utilice el alga durante o después de su fase exponencial de crecimiento, cuando existe la mayor densidad de células por mililitro y cuando se pueden controlar mejor los volúmenes de alimentación. Cada dos días se hacen conteos de células por ml para ajustar los volúmenes de suministro debido al crecimiento del alga. Los conteos se llevan a cabo con un hemocitómetro tipo Neubauer y un microscopio.

La constante rutina de conteo de densidad y verificación de salud del alga funciona como indicador para ajustar los volúmenes de alimentación a medida que el alga crece y para calcular la densidad de producción necesaria para los experimentos. Los volúmenes diarios de alimento se calculan fácilmente utilizando una simple ecuación que se detalla a continuación:

Ejemplo: el carboy de Tetraselmis que se va a utilizar para alimentar tiene una densidad de 120×10^4 células por mililitro. Cada cubo de ensayo (20L) de Tetraselmis va a ser sembrado con una densidad de algas de 5×10^4 células por mililitro.

- Densidad deseada en cada cubo: 5×10^4 cel/ml

- Volumen de cada cubo: 2×10^4 ml

- Densidad del carboy: 12×10^5 cel/ml

$$(5 \times 10^4 \text{ cel} / 1 \text{ ml}) \times (2 \times 10^4 \text{ ml}) \times (1 \text{ ml} / 12 \times 10^5 \text{ cel}) = 833 \text{ ml.}$$

A cada cubo de ensayo de Tetraselmis hay que añadirle 833 ml del carboy para obtener una densidad de algas de 5×10^4 cel/ml. Luego de dos días el volumen es distinto ya que la densidad de algas del carboy aumenta debido al crecimiento del alga, por lo tanto se vuelve a realizar el mismo procedimiento y se ajustan los volúmenes.

6.2 Recolección de *Acartia* spp.

Descripción de la recolecta:

Un equipo de tres personas viaja al estero de Cañas provistos de un pequeño zodiak con motor y navegan a la parte central de la laguna, donde Uye (1997) confirmó mayor presencia de copépodos calanoideos. Se recolectan muestras en cubos de 20 litros utilizando una red de arrastre de alta densidad (0,5 m de diámetro, 2,8 m de longitud, malla: 30 μ m, receptáculo de 500 ml). Se implementan 5 arrastres horizontales por cubo. Cada arrastre tiene una duración aproximada de 2 minutos, dependiendo de la turbidez del agua. Los cubos son previamente llenados con aproximadamente 15 litros de agua del estero con el propósito de no depositar las muestras en seco. Durante todo el trayecto se

aprovisionan las muestras con aireación mediante una pequeña bomba eléctrica con válvulas, líneas de aire y piedras difusoras.

Transporte y recepción en el laboratorio:

Los cubos son transportados al laboratorio y se procede inmediatamente a filtrar las muestras. Primero se filtran manualmente con una malla de 500 μm para eliminar contaminación por zooplancton de mayor tamaño (larvas de camarón, larvas de pez, etc.), y luego se implementa un segundo filtrado utilizando un tanque cónico especial de lavado de 200 litros.

El tanque cónico funciona como un filtro en el cual las muestras se depositan y enjuagan por aproximadamente 2 horas con un flujo de entrada y salida de agua. Está provisto de un filtro/drenaje con malla de 200 μm que se encarga de eliminar zooplancton pequeño (rotíferos, nauplios de copépodo, etc.) y dejar únicamente copépodos adultos y copepoditos avanzados.

Conteo de la población:


El contenido del tanque cónico es recolectado mediante sifón y distribuido en cubos de 20 litros. Se toma una muestra de 500 ml de cada cubo y se realiza un conteo al microscopio para verificar la densidad de individuos por litro.


6.3 Ensayo de alimentación vs producción de huevos


La gran relación que existe entre la nutrición y la producción de huevos en *Acartia*, así como el efecto que distintas dietas pueden tener sobre la calidad/cantidad de los desoves, influye en forma directa sobre la propagación de la especie. Por lo tanto, para desglosar la interrogante en cuanto a la dieta ideal para dichos motivos, se organiza un esquema experimental utilizando cuatro dietas diferentes en pequeños volúmenes controlados de 20 litros.


Cada dieta esta conformada por tres cubos, un original y dos réplicas, para de esta forma poder llevar un control estadístico de los datos al finalizar el experimento y obtener resultados de mayor precisión.

Esquema experimental:

Dieta A:  = *Chaetoceros* + *Acartia*

Dieta B:  = *Tetraselmis* + *Acartia*

Dieta C:  = *Isochrysis* + *Acartia*

Dieta D:  = [*Chaetoceros* + *Tetraselmis* + *Isochrysis* (2:1:1)] + *Acartia*

Descripción del ensayo:

El experimento dura un período de aproximadamente 7 días. Copéodos adultos son sembrados a una densidad de 50 individuos por litro. Los cubos son colocados en un área externa del laboratorio, bajo techo, con foto periodo natural, y tapados. Las paredes de los cubos son parcialmente traslúcidas. Estudios anteriores (Achatines) han comprobado mayor actividad por parte de los copéodos durante la oscuridad (Ing. Luis Tejada). Suave aireación es colocada desde el fondo mediante líneas de aire con piedras difusoras. La densidad total de microalgas fijada para cada cubo de cada dieta es de 5×10^4 cel/ml. Se alimenta una vez al día con una proporción de alimento específica, así manteniendo la densidad de algas de cada cubo constante.

En la mayoría de las metodologías de cultivo comercial se utilizan densidades de alimentación más bajas ($\pm 2 \times 10^4$ cel/ml) por motivos de eficiencia en cuanto a la conversión alimenticia y la rentabilidad del sistema, pero en este caso plenamente experimental se ignoran tales detalles. Mayor densidad de alimentación resulta en mayor producción de huevos, y mayor producción de huevos proporciona mayor cantidad de datos que por ende brinda mayor precisión en cuanto a los resultados estadísticos finales.

Se lleva a cabo monitoreo de los parámetros principales cada 2 días: temperatura, Ph, salinidad y oxígeno disuelto.

Recolección y conteo de huevos:

Diariamente, mediante sifón, se aspira 1 litro del fondo de cada cubo para recolectar los huevos mezclados con detrito. Cada muestra recolectada es inmediatamente filtrada con una malla de 150 μm para retener copépodos y regresarlos a los cultivos. El volumen de cada muestra es reducido filtrándolo por una malla de 35 μm para luego ser fijado en tubos de ensayo con formol al 5%. Al finalizar el experimento, un conteo de los huevos preservados en los tubos de ensayo y se compara los resultados de cada dieta estadísticamente.

6.4 Ensayo de alimentación vs desarrollo naupliar

El objetivo es evaluar cuál de las dietas proporciona mejores resultados en cuanto a crecimiento y supervivencia de nauplios, desde la eclosión hasta su estadio más avanzado de desarrollo (nauplio VI). Para iniciar se necesita un stock de huevos.

Stock de huevos:

La población stock de copépodos adultos (Cañas), previamente contada, es colocada en un tanque de 400 litros a una densidad de 50 individuos por litro (20,000 copépodos), con alimento y aireación. Se utiliza la dieta con mejores resultados en cuanto a desove

(ensayo anterior) a una densidad total de 5×10^4 cel/ml. El cultivo permanece estático por 24 horas. Al siguiente día, se procede a sifonear 20 litros del fondo del tanque para recolectar los huevos producidos. La recolección es pasada a través de un filtro de malla de 200 micras para retener adultos y aislar el volumen con los huevos. Luego, se toma una muestra y se hace un conteo de los huevos. Una vez revelada la densidad del stock de huevos, se procede inmediatamente a sembrar los cubos de ensayo.

Descripción del ensayo:

El periodo de duración es de aproximadamente 7 días, supuesto tiempo que demora la especie en cruzar por todos sus estadios naupliares (Doi, M., 1997). La cantidad, volumen y disposición de los cubos experimentales se mantiene exactamente igual al sistema anterior. Se utiliza el mismo esquema de dietas implementado en el primer ensayo, así como también la misma densidad de alimentación (5×10^4 cel/ml) con el objetivo de mantener una continuidad y similitud en cuanto a los efectos de cada especie de microalga. La rutina de alimentación y monitoreo de parámetros también se mantiene igual. Cada cubo es sembrado con 3,000 huevos (150/L). La densidad de siembra es mayor para equilibrar la pérdida de individuos ya sea por manipulación (muestreos poblacionales diarios) ó por huevos defectuosos.

Recolección y conteo naupliar:

Diariamente, se recolectan muestras de 500 ml de cada cubo que son reducidas con un filtro de 35 μm y fijadas en tubos de ensayo con formol al 5%. Al finalizar el ensayo, las muestras son contadas y comparadas entre cada dieta.

6.5 Ensayo de cultivo estático

El objetivo es intentar reproducir la metodología del cultivo estático efectuado en el Darwin Aquaculture Centre por el investigador Glenn R. Schipp. Básicamente, se implementan los mismos procedimientos y materiales para poder evaluar la efectividad de dicha técnica en nuestra localidad.

El experimento es llevado a cabo en 3 tanques cónicos oscuros de 100 litros con drenaje central. Los tanques son previamente lavados y luego desinfectados llenándolos con agua dulce y cloro por un periodo de 24 horas. Las líneas de aire y piedras difusoras también son desinfectadas con cloro. Los cultivos son implementados con un régimen alimenticio conformado por una dieta mix de microalgas a base de *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis* sp. e *Isochrysis galbana* (2:1:1), a una concentración total de 2×10^4 células por mililitro. A diferencia del método original, se utiliza la diatomea *Chaetoceros gracilis* en vez de *Rhodomonas baltica* debido a que el laboratorio no posee dicha especie. Los tanques son sembrados con copépodos adultos a una densidad de 50 individuos por litro. Los tanques son llenados hasta aproximadamente el 60% de su volumen para dejarle espacio a los volúmenes diarios de alimentación (microalga). Se suplementa suave aireación desde el fondo mediante líneas de aire con piedras difusoras. Se alimenta una vez al día

manteniendo la misma proporción y densidad de algas. Al cabo de 8 días, los tanques son drenados y cosechados para verificar el estado de propagación de la especie y la efectividad del sistema.

7. RESULTADOS

7.1 Cultivo de algas

Los cultivos de algas fueron llevados exitosamente y con pocos inconvenientes. Se contó con suficiente stock de alimento durante todos los ensayos. Rutinariamente, se monitoreó la densidad de algas de los cultivos para asegurarse siempre de estar alimentando con las proporciones correctas. Cada dos días se recolectaron muestras de los cultivos y se verificaron/contaron con una cámara de Neubauer para ajustar los volúmenes de alimentación y comprobar la condición del alga.

7.2 Recolecciones en Cañas

Se realizaron 4 recolectas durante los meses de septiembre, octubre y noviembre. Los copépodos del género *Acartia* fueron los más representativos en número de toda la población planctónica capturada. Sin embargo, las últimas recolecciones fueron perturbadas por repentinos cambios climáticos de invierno que cambiaron las propiedades del agua del estero y afectaron la distribución del zooplancton.

Primer viaje (13 de septiembre):

Se recolectaron muestras de 20 litros en 6 sectores del estero para comprobar en cual se concentraba mayor cantidad de copépodos calanoideos del género *Acartia*. Una muestra por sector. Se navegó hacia el fondo del estero para iniciar los muestreos de adentro hacia fuera. Desde la primera estación (frente al puerto de la isla Cañas, muy adentrado en el estero) hasta la última estación (justo frente al punto de embarque, a un costado de la boca del estero hacia el mar) hay una distancia aproximada de un kilómetro, y fue a lo largo de ese recorrido que se llevaron a cabo los muestreos. Se implementaron 5 arrastres horizontales de uno o dos minutos, dependiendo de la turbidez del agua, para cada muestra. Los cubos fueron transportados con aireación al laboratorio, donde sus contenidos fueron inspeccionados microscópicamente para verificar en cuál existió mayor incidencia de copépodos calanoideos del género *Acartia*. La muestra de la primera estación fue la que resultó tener mayor cantidad de *Acartia*. En los demás cubos existió menor incidencia de copépodos y mayor contaminación por otras especies de zooplancton. La cantidad de *Acartia* disminuyó notablemente en las muestras cercanas a la boca del estero. Durante la recolecta, se midió la salinidad de cada estación con un espectrofotómetro. La temperatura tuvo que ser medida una hora luego, al llegar al laboratorio, debido a una falla con el termómetro en campo (*Figura 1*).

Figura 1.- parámetros del agua, primera recolección

Estación	Salinidad (ppt)	Temperatura °C
* 1	21,9	30
2	22,1	29,9
3	25,4	29,7
4	29,4	29,3
5	31,5	29,8
6	32,1	29,6
Reservorio Lab.	32	29,8

* *Cubo stock*

El cubo recolectado en la primera estación (cubo stock) brindó suficiente población para iniciar el primer experimento. El contenido fue filtrado con una malla de 500 micras para eliminar la baja contaminación por larvas de peces y camarón. Se tomó una muestra de 500 ml y se la examinó para verificar la efectividad del filtrado. Una vez comprobado, se realizó un conteo de la población stock. Se calculó una densidad stock de aproximadamente 600 copéodos adultos del género *Acartia* por litro. La poca presencia de nauplios y la ausencia de rotíferos permitieron saltar el filtrado en el tanque cónico de lavado y así reducir el manipuleo de la población al mínimo. La muestra vino bastante limpia e iniciamos el primer ensayo inmediatamente.

Segundo viaje (2 de octubre):

Se recolectó población para el segundo ensayo (desarrollo naupliar). Esta vez se llevó un beaker de vidrio de 500 ml para verificar visualmente en las estaciones la presencia o no de copépodos. Se acertó una gran cantidad de población concentrada en la primera estación, igual que la vez anterior, por lo que se decidió hacer todas las recolecciones en el mismo sitio. Se midió una salinidad de 27 ppt, bastante distinta a la de la vez anterior. Se recolectaron tres cubos de 20 litros y se transportaron con aireación al laboratorio de plancton donde se procedió a filtrar sus contenidos. Se utilizó el filtro/malla de 500 micras para eliminar organismos grandes (peces, larvas de camarón, etc.) y se dividió la población total en 2 cubos de 20 litros. Se analizó microscópicamente una muestra de cada cubo y se confirmó alta presencia de copépodos calanoideos del género *Acartia*. Se calculó la densidad de la población y se decidió no realizar el segundo filtrado (tanque cónico) debido a la presencia mínima de rotíferos y zooplancton de menor tamaño. La contaminación por otros organismos mayores fue también de un nivel bajo, por lo que no se le dio mucha importancia y se procedió a iniciar el segundo ensayo de tal manera. Se realizó un conteo de las especies más representativas (*Figura 2*).

Figura 2.- individuos por litro

	<i>Acartia</i>	<i>Oithona</i>	Zoeas
Cubo 1	622	18	140
Cubo 2	546	24	114

Tercer viaje (11 de octubre):

Se recolectaron 4 cubos en la primera estación. Igual que la vez anterior, primero se utilizó un beaker de 500 ml para confirmar la presencia de copépodos en la estación. Al llegar al laboratorio, se verificaron las muestras al microscopio y resultaron estar severamente contaminadas. Alrededor del 50% de la población zooplanctónica recolectada estaba compuesta por zoeas de cangrejo y copépodos cyclopoideos del género *Oithona*. Tanto los copépodos *Oithona* como las zoeas de cangrejo tienen un tamaño similar al de los copépodos *Acartia*, y también tienen movimientos similares, por lo que engañaron la comprobación visual en sitio con el beaker. Se logró separar el zooplancton de mayor tamaño y las larvas de peces y camarón filtrando con una malla de 500 micras, pero permanecieron las zoeas y los cyclopoideos en las muestras. La similitud en tamaño imposibilitó el aislamiento total de los copépodos *Acartia* mediante filtrado físico. Se decidió ignorar el imprevisto y se inició el tercer ensayo inmediatamente.

Cuarto viaje (1 de noviembre):

La distribución de zooplancton del estero fluctuó completamente. Las zoeas de cangrejo pasaron a dominar casi totalmente las poblaciones de zooplancton del estero y el número de copépodos *Acartia* se disminuyó drásticamente al mínimo. En las muestras se comprobó alta presencia de especies zooplanctónicas nuevas, así como también mayor

número de copépodos cyclopoideos. Las propiedades zooplanctónicas del estero cambiaron y no se logró volver a encontrar una buena fuente de copépodos *Acartia*.

7.3 Producción de huevos

Previo al primer viaje de recolección, se limpió y organizó estratégicamente el área de trabajo en el laboratorio de plancton. El día anterior al viaje, cada uno de los 12 cubos de ensayo (3 por dieta) fue llenado con agua dulce y cloro junto con sus respectivas líneas de aire y piedras difusoras. Permanecieron llenos y desinfectándose por 24 horas. Al día siguiente, fueron vaciados y lavados con abundante agua salada para luego ser colocados en sus debidos lugares con sus debidas líneas de aire, listos para ser sembrados.

Una vez lista la población stock, se procedió a calcular los volúmenes de siembra para cada cubo de ensayo. Cada cubo se sembró con una densidad de alimento de 5×10^4 células totales de microalga por mililitro y una densidad de *Acartia* de 50 adultos por litro.

Como rutina diaria, se recolectaron muestras de 1 litro del fondo de cada cubo y se alimentó procurando mantener una densidad de algas constante. Las muestras fueron recolectadas mediante sifón y filtradas con una malla de 150 micras utilizada para separar huevos y retener adultos. Los adultos fueron regresados a los cultivos. Seguido, se pasaron las muestras por un segundo filtrado con una malla de 35 micras utilizada para retener huevos y se recolectaron los contenidos con una pipeta para entonces ser

depositados y fijados en tubos de ensayo con formol al 5%. Al finalizar el ensayo, se contó la cantidad de huevos fijados en cada tubo de ensayo y se elaboró una tabla (*Figura 3*) correspondiente a la cantidad de huevos producidos por cubo por día.

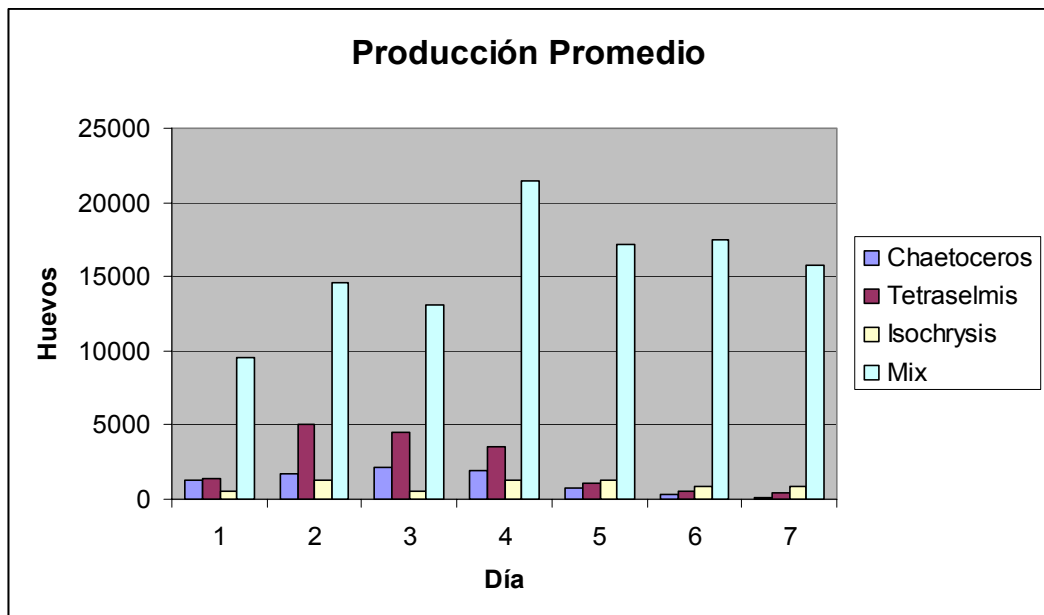
Figura 3.- producción de huevos

PRIMER ENSAYO "DESOLVE"							
CONTEO DE HUEVOS / L							
<i>Cubo/Día</i>	1	2	3	4	5	6	7
A1	1655	1368	2660	864	738	456	208
A2	686	239	546	198	96	95	66
A3	1404	3384	3248	4606	1446	390	162
B1	2006	5826	4056	2550	858	696	664
B2	1744	7774	7848	6432	2100	816	368
B3	487	1614	1776	1494	414	192	120
C1	222	969	528	804	336	186	114
C2	536	873	438	1050	1854	834	1254
C3	830	1929	792	2142	1704	1408	1224
D1	6157	10640	12096	20118	9672	10066	12124
D2	6869	14008	11872	21574	10682	9338	8582
D3	15484	19200	15386	22648	31220	32984	26544

*A = Chaetoceros; B = Tetraselmis; C = Isochrysis; D = Mix

Luego de haber reunido todos los datos, se sacó un promedio por día de los tres cubos de cada dieta y se graficaron los resultados (*Figura 4*).

Figura 4.- gráfica de la producción de huevos por dieta por día



Asumiéndose un índice sexual de 1:1 (500 hembras por cubo) y conociendo el promedio de producción diaria de huevos con la dieta mix (15,584 huevos/día), se calcula que cada hembra alimentada con la dieta mix desovó aproximadamente 31 huevos por día a una temperatura de 26-29° centígrados.

7.4 Desarrollo naupliar

Se sembró un tanque de 400 litros con adultos de *Acartia* a una densidad de 50 por litro. El cultivo se llevo a cabo por 24 horas y se utilizó la dieta mix (ensayo anterior) como alimento para estimular el desove. Al siguiente día, se sifonearon 20 litros del fondo del tanque y se filtró la recolección con una malla de 150 micras para retener los adultos. Se analizó una muestra al microscopio y se contó un total de aproximadamente 15 huevos

por mililitro. El stock de huevos fue exitosamente aislado y se arrancó inmediatamente con el ensayo.

El ensayo fue planeado siguiendo el mismo esquema y utilizando las mismas dietas que en el ensayo anterior. La única diferencia radicó en la siembra, que fue llevada a cabo con huevos en vez de copépodos adultos. Se sembraron 3,000 huevos (200 ml) en cada cubo, o sea, 150 huevos por litro.

Como rutina diaria, se alimentó una vez al día procurando mantener la misma densidad de algas y se sacaron muestras de cada cubo con un beaker de 500 mililitros. Para asegurar muestras homogéneas, se agitó un poco el contenido de los cubos previamente. Seguidamente, se pasó cada muestra por una malla de 35 micras para separar los nauplios y se recolectaron los contenidos con una pipeta para luego depositarlos y fijarlos en tubos de ensayo con formol al 5%. Al final del experimento, se analizaron microscópicamente las muestras y se contó la cantidad de nauplios por cubo por día (*Figura 5*).

Figura 5.- producción de nauplios

# DE NAUPLIOS / L							
Cubo/Día	1	2	3	4	5	6	7
A1	156;108h	38	0	0	0	0	0
A2	176;76h	24	3	0	0	0	0
A3	140;36h	22	0	0	0	0	0
B1	92;24h	20	20	6	0	0	0
B2	104;24h	40	9	10	0	0	0
B3	128;20h	26	21	0	0	0	0
C1	46;8h	62	34;16c	10;2c	0	0	0
C2	68;16h	56	62;22c	10;34c	0;2c	0	0
C3	50;8h	60	32;12c	8;16c	0	0	0
D1	70;16h	92	8	12	0	0	0
D2	94;26h	68	8	33	0	0	0
D3	66;8h	40	6	6	0	0	0

*A = Chaetoceros; B = Tetraselmis; C = Isochrysis; D = Mix

* h = huevos / L; c = copepoditos / L

Se calculó un número promedio de nauplios por día por dieta y se graficó para cada dieta el comportamiento de la propagación en función del tiempo (Figura 6, 7, 8, 9).

Figura 6.- cantidad de nauplios por día alimentados con Chaetoceros

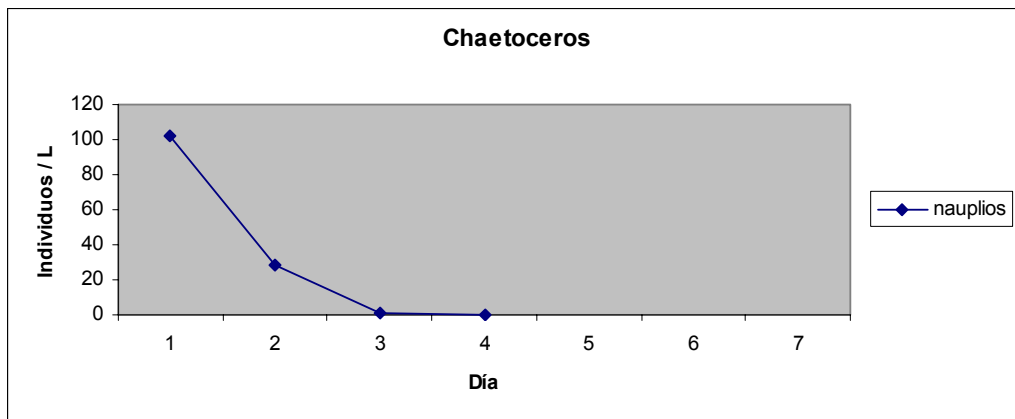


Figura 7.- cantidad de nauplios por día alimentados con Tetraselmis

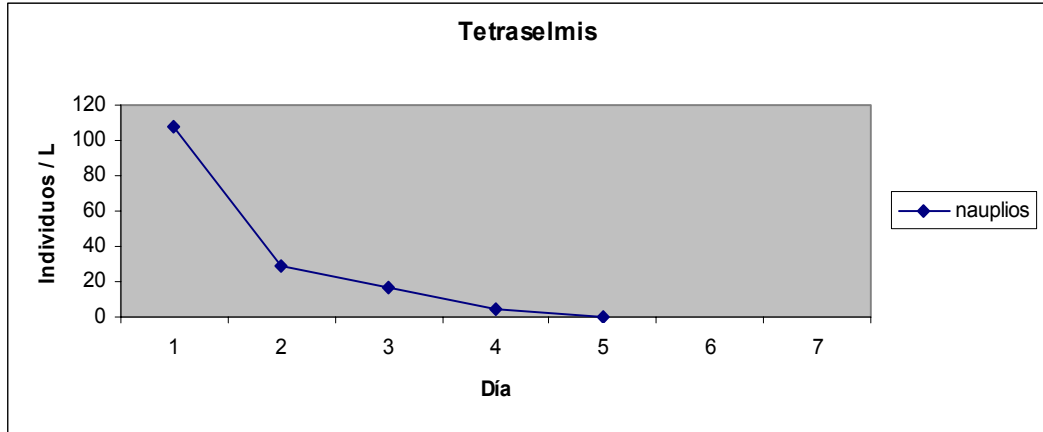


Figura 8.- cantidad de nauplios por día alimentados con Isochrysis

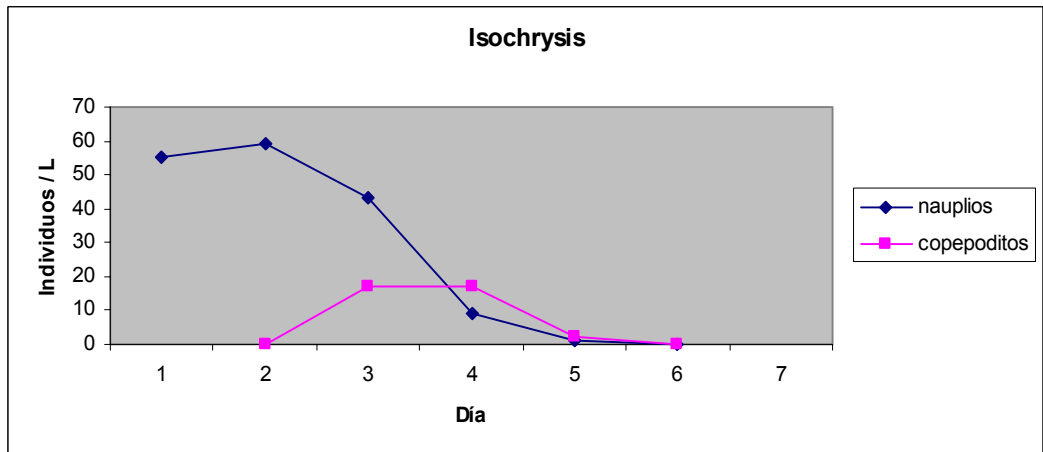
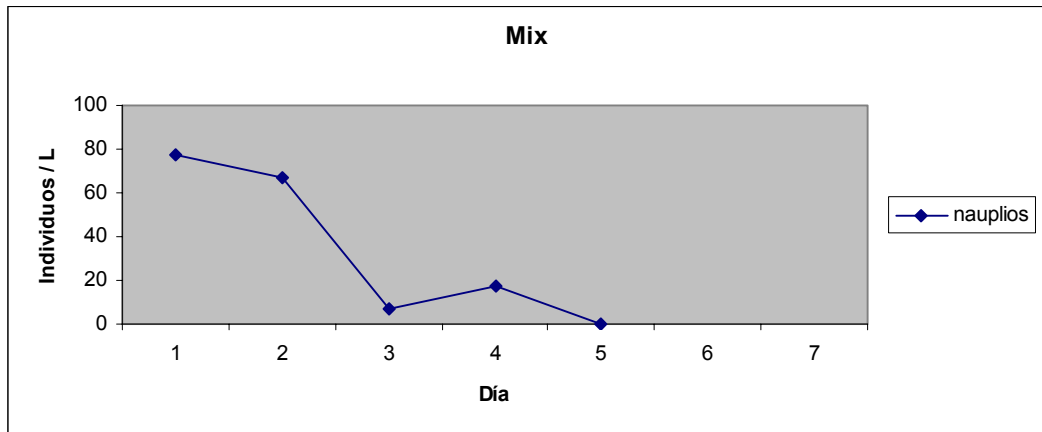
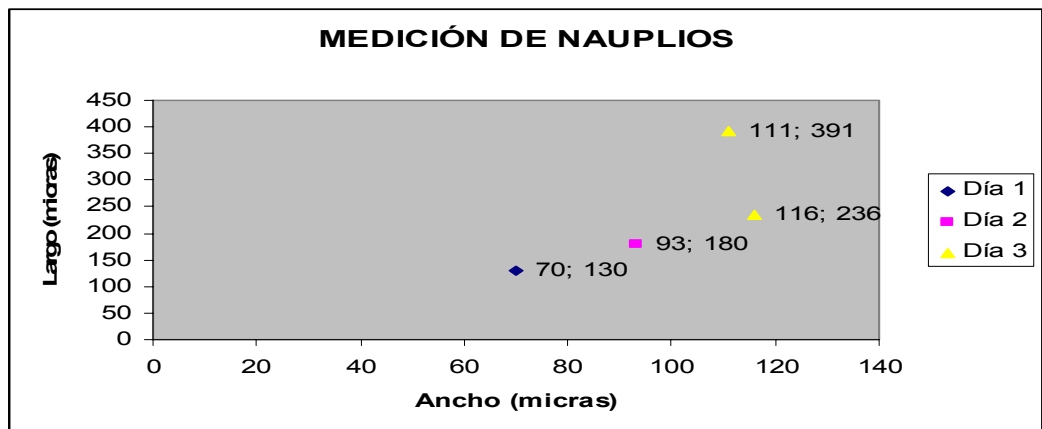


Figura 9.- cantidad de nauplios por día alimentados con dieta mix



Al finalizar el conteo naupliar, se aprovechó para medir la longitud y el ancho promedio de los nauplios y copepoditos recolectados. Utilizando un microscopio y una regla micrométrica, se logró medir las dimensiones de varios nauplios y se graficó el ancho y la longitud promedio de la población por día (Figura 10).

Figura 10.- ancho promedio y largo promedio de los nauplios por día



La dimensión promedio de los copepoditos muestreados esta detallada en “Día 3.” En la gráfica son los de mayor longitud, y ligeramente menor ancho que los nauplios del mismo día.

Como información extra, se recolectaron algunos huevos y adultos con el mismo fin. Los huevos rondaron entre 86-89 micras de diámetro. Los adultos capturados fueron todas hembras, en total 5. Medimos ancho y largo del torso sin incluir el telson y calculamos un promedio de 985 micras de largo y 251 micras de ancho. Algunos midieron poco más de un milímetro de longitud (máx: 1070 μm x 273 μm).

7.5 Cultivo estático

Debido a una baja en la población salvaje de *Acartia* del estero de Cañas fue imposible capturar suficientes copépodos para sembrar los tres tanques de 100 litros propuestos. Únicamente se pudo sembrar 2. Los cultivos fueron preparados con un menor volumen de siembra (60 litros) para dejar lugar a los volúmenes diarios de microalga que serían brindados como alimento. Se sembraron 50 copépodos por litro en cada tanque. Se presentó alta contaminación por zoeas de cangrejo y copépodos cyclopoideos. Diariamente, se alimentó con una densidad constante de mix de microalgas. Al cabo de 8 días se realizó la cosecha y se la examinó. La mayoría de las zoeas de cangrejo murieron y su cantidad disminuyó a menos del 10% del total de la población. Los copepoditos de *Acartia* dominaron en número abarcando aproximadamente el 60% del total de la población. La densidad de adultos de *Acartia* se mantuvo igual a la densidad sembrada,

50 por litro. Se encontraron copépodos cyclopoideos en todos sus estadios de desarrollo, pero su bajo número de individuos no se presentó como una amenaza. Las zoeas de cangrejo sobrevivientes, habiendo alcanzado un mayor tamaño, fueron fáciles de remover filtrando con una malla de 500 micras.

Los tanques fueron lavados y resembrados con la misma población para iniciar un segundo ciclo. Luego de la nueva siembra, se examinó enseguida una muestra que reveló predominancia inicial por parte de los copepoditos de *Acartia*, seguida por adultos de *Acartia* y luego *Oithona*. Sin embargo, la población de copepoditos empezó a caer inmediatamente luego de la siembra y para el tercer día desaparecieron. Los adultos sobrevivieron bien la resiembra, pero no fueron capaces de crear otra nueva generación. No se pudo volver a experimentar con el sistema debido a cambios climáticos y fluctuaciones en las poblaciones zooplanctónicas del estero de Cañas. El estudio se finalizó.

7.6 Medición de parámetros

En todos los ensayos se llevó un control en cuanto al monitoreo de los parámetros físicos del agua de los tanques. Se aplicó una rutina de medición de temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto a cada cubo cada dos días. La temperatura fue el factor que fluctuó más, oscilando entre un rango de 25-29 grados centígrados durante todo el proyecto. La salinidad fue bastante estable manteniéndose cerca de los 31 ppt, y el oxígeno disuelto y el pH se mantuvieron en niveles aceptables. En cada día de medición la diferencia de

niveles de parámetros entre la totalidad de los cubos fue mínima, por lo que se calculó un nivel promedio de cada parámetro para el cultivo entero (los 12 cubos).

MEDICIÓN PROMEDIO DE PARÁMETROS				
PRODUCCIÓN DE HUEVOS				
<i>Parámetro / Día</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>5</i>	<i>7</i>
<i>Temperatura (°C)</i>	26,2	27,2	28,4	28,6
<i>Salinidad (ppt)</i>	31,2	31,3	31,3	31,3
<i>% Saturación O²</i>	91%	89%	84%	80%
<i>pH</i>	8,2	8,1	7,9	7,6

MEDICIÓN PROMEDIO DE PARÁMETROS				
DESARROLLO NAUPLIAR				
<i>Parámetro / Día</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>5</i>	<i>7</i>
<i>Temperatura (°C)</i>	28,5	28,6	28,5	28,3
<i>Salinidad (ppt)</i>	31,4	31,5	31,4	31,3
<i>% Saturación O²</i>	88%	87%	92%	88%
<i>pH</i>	8,3	7,8	7,6	7,5

Durante el tercer ensayo solo se midió la temperatura. Se calculó un promedio de la temperatura de ambos tanques en cada medición.

MEDICIÓN PROMEDIO DE LA TEMPERATURA				
CULTIVO ESTÁTICO				
<i>Día</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>5</i>	<i>7</i>
<i>Temperatura</i>	28,5	27,2	26,1	25,5

Se decidió no medir el pH, la salinidad ni la saturación de oxígeno en el tercer ensayo debido a la estabilidad de dichos parámetros en los ensayos anteriores. Por otra parte, se pronosticó una menor producción de heces y materia orgánica debido a la menor densidad de alimentación implementada en los cultivos estáticos (2×10^4 cel/ml), por ende un menor riesgo en cuanto a acidificación del agua.

8. DISCUSIÓN TÉCNICA

El presente trabajo fue realizado con el propósito de aclarar temas en cuanto a la dieta ideal para el efectivo desarrollo y crecimiento de los copépodos calanoideos *Acartia* spp. en cautiverio. Los cultivos fueron llevados a cabo con animales endémicos de la localidad y en condiciones ambientales naturales para brindar a los organismos un medio lo más análogo posible al nativo y por ende para entender mejor sus ciclos y comportamientos naturales a través del tiempo. Es conocido que los copépodos son animales muy sensibles a los cambios en cuanto a parámetros y propiedades del medio, por lo que justamente a la par de la investigación se prestó atención al tipo de clima que se presentó en el área y a los efectos que este pudo ocasionar indirectamente sobre la especie.

8.1 Cultivo de algas

La microalga *Tetraselmis* sp. probó ser la más resistente a las condiciones de nuestra localidad, y la más duradera en tiempo de vida. Su crecimiento fue llevado a cabo sin problemas tanto en pequeños volúmenes con ambiente controlado (dentro del laboratorio) como en tanques externos de gran volumen (condiciones ambientales).

La diatomea *Chaetoceros gracilis* creció normalmente en condiciones artificiales de laboratorio. Sin embargo, el tiempo de vida de los cultivos fue bastante breve. Los cultivos no demoraban mucho en empezar a degradarse. Las células empezaban a morir gradualmente hasta el punto de que la calidad del alga se deterioraba y no se podía seguir utilizando. Había que descartar cultivos y sembrar nuevos muy a menudo. La célula de este tipo de microalga parece ser de menor resistencia que la de *Tetraselmis*. Aún así, a pesar de su baja durabilidad, pudimos contar con suficiente volumen para suplir a los copépodos durante todo el proyecto.

Algunos problemas se presentaron en cuanto al cultivo de la microalga *Isochrysis galbana*. Esta especie pareció no adaptarse muy bien a las condiciones ambientales del área. Muchos cultivos colapsaron inmediatamente apenas sembrados, otros nunca llegaron a desarrollarse. Únicamente se la logró cultivar en carboys dentro de un cuarto cerrado con intensa luz y temperatura baja. Parece ser que los requerimientos de luz y temperatura para esta especie son bastante específicos y diferentes a los del área. Sin embargo, debido al pequeño tamaño de célula de esta especie y debido a su alta concentración en volúmenes reducidos se la pudo aprovechar sin ningún problema.

8.2 Recolecciones en Cañas

Se asumió una constante disponibilidad de copépodos durante todo el transcurso del proyecto. Sin embargo, repentinas permutaciones climáticas (lluvias intensas, nubosidad)

afectaron la distribución del plancton en el estero y provocaron cambios en las propiedades en cuanto a las especies dominantes y los parámetros generales del ambiente. La población de copépodos *Acartia* disminuyó considerablemente y otras especies de zooplancton pasaron a ser más representativas en número. Esta situación limitó el alcance del estudio e incitó la finalización del mismo. El investigador japonés Masanori Doi (1997) reportó dificultades para continuar su estudio sobre monitoreo de copépodos *Acartia* en el Laboratorio Achotines debido a fuertes lluvias repentinas, justamente durante los meses de octubre y noviembre. La similitud en cuanto al contexto del presente estudio con respecto al de Doi y en cuanto a ambas situaciones climáticas, hace entender mejor la naturaleza propagativa del zooplancton durante los distintos ciclos de distribución planctónicos en el estero de Cañas. Esta información es útil como herramienta de planeamiento para organizar investigaciones posteriores y en fin para conocer mejor los cambios que se dan en este peculiar ecosistema.

En el primer viaje a Cañas, la baja salinidad (21,9 ppt) y la alta concentración de *Acartia* en la estación 1 hizo pensar de una posible preferencia de los copépodos *Acartia* hacia aguas de menor salinidad. Sin embargo, la salinidad fue mayor (27 ppt) en la segunda recolección efectuada en la estación 1 y la concentración de *Acartia* siguió siendo igual de elevada. Por lo tanto, se eliminó la posibilidad y se concluyó que la especie posee un amplio rango de tolerancia hacia este factor. La preferencia de los copépodos *Acartia* hacia este sector del estero de Cañas debe de ser seguramente de otra naturaleza.

En cuanto al manipuleo de las recolecciones, se encontró casi totalmente innecesario utilizar el tanque cónico de lavado como segundo filtro debido a la ausencia de rotíferos

en las muestras y debido a la baja incidencia de zooplancton de menor tamaño que los copépodos *Acartia*. En cuanto a la especie *Acartia*, pocos nauplios y copepoditos fueron observados directamente en las poblaciones salvajes recolectadas, casi únicamente adultos. Estos detalles fueron de gran ventaja para el experimento ya que ayudaron a reducir el manipuleo de los organismos al mínimo. En ningún ensayo existieron serios problemas en cuanto a competencia por parte de otros organismos zooplanctónicos. La presencia de rotíferos en los cultivos de copépodos puede ser fatal debido a su gran actividad y alta fertilidad, pero ventajosamente dicho grupo de zooplancton no estuvo presente en las poblaciones recolectadas.

8.3 Producción de huevos

La mayoría de las metodologías de cultivo intensivo de copépodos sugieren, por lo general, una alimentación a base de dietas monoalgales. Sin embargo, otras metodologías de cultivo, como la de Schipp (1998), reportan buenos efectos de crecimiento y reproducción al alimentar con dietas conformadas por varias especies de microalgas. Hipotéticamente, se sostiene que al utilizar diferentes tipos de algas se brinda una alimentación más completa debido a que se aprovechan los distintos perfiles nutricionales de cada especie algal, y por lo tanto la propagación de la especie será más saludable y eficiente. Naturalmente, cada tipo de microalga se caracteriza por poseer propiedades nutritivas únicas y propias de su especie. La dieta pluri-algal a base de *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis* sp. e *Isochrysis galbana* (2:1:1) fue incluida en los ensayos con el motivo de comprobar dicho punto de vista y además para añadir una variante en cuanto a

las otras dietas monoalgales que serían probadas. La proporción (2:1:1) fue decidida de esta manera siguiendo estudios pasados que reportan una buena aceptación por parte de los copépodos hacia las especies de microalgas diatomeas como *Chaetoceros*, razón por la cual esta especie conforma el mayor porcentaje de las tres en dicha dieta (Doi, 1997). Anteriormente, se reportó una alta producción de huevos en copépodos calanoideos *Acartia* spp. al alimentar con una dieta monoalgal a base de la microalga diatomea *Chaetoceros gracilis*. Esta fue calificada como un excelente alimento para estimular el desove en copépodos calanoideos adultos provenientes del estero de Cañas, Panamá.

Una vez iniciado el ensayo se comprobó la muerte al poco tiempo de la mayoría de las zoeas de cangrejo, por lo que no se le dio mucha importancia a su presencia en los cultivos. Las zoeas son de casi iguales dimensiones que los adultos de *Acartia*, por lo que es prácticamente imposible removerlas por filtrado. Sin embargo, luego de una semana las zoeas sobrevivientes alcanzan suficiente tamaño para ser removidas con una malla filtro de 500 micras. Una ventaja acerca de la contaminación por las zoeas es la ausencia de reproducción, lógicamente por tratarse de organismos en estadios jóvenes.

La presencia de copépodos cyclopoideos del género *Oithona* tampoco representó gran problema. El lento ritmo de actividad y la baja fertilidad de esta especie fueron de poca amenaza competitiva en cuanto a su propagación en los tanques de crecimiento. Los copépodos calanoideos *Acartia* poseen un metabolismo más acelerado. Las hembras de los copépodos cyclopoideos *Oithona* retienen los huevos en sacos, mientras que las hembras de los calanoideos *Acartia* los depositan en el fondo. Esta naturaleza de desove ayudó en gran proporción a que no se mezclasen los huevos de ambas especies en el

fondo de los cubos, así recolectando únicamente huevos de *Acartia*. Los pocos huevos de *Oithona* que se llegaron a mezclar en el fondo con los de *Acartia* pudieron ser diferenciados microscópicamente con facilidad debido a su notable menor tamaño.

Se presentaron temperaturas bajas debido a un pequeño temporal de lluvias y vientos fríos justo al inicio del ensayo. La tormenta demoró aproximadamente un día y luego el clima volvió a la normalidad. El efecto de este cambio climático se puede observar en las lecturas de temperatura. Inician algo bajas el primer día y luego se elevan gradualmente durante el resto del experimento. En cuanto a la producción de huevos, notamos una producción poco elevada en los primeros días y luego superior en los últimos. Esta variación se presentó probablemente debido al efecto de la temperatura sobre el metabolismo de los copépodos.

8.4 Desarrollo naupliar

El objetivo de este ensayo se limitó simplemente al análisis del crecimiento de los nauplios por estadios con el fin de verificar con cuál dieta se podría lograr cerrar el ciclo de desarrollo de los mismos. No se entró en extremo detalle en cuanto a la definición de estadios naupliares por cubo por día. Sin embargo, la información brindada por Uye (1997) en su estudio sobre el ciclo de vida y los caracteres naupliares morfológicos de los copépodos calanoideos del estero de Cañas fue de gran utilidad y ayudó a definir a leves rasgos que estadios naupliares dominaron los cultivos durante cada día del ensayo. Este

análisis fue implementado únicamente a las muestras de la dieta con mejores resultados de propagación.

En el primer día de conteo se notó una desproporción de población entre los cubos de *Chaetoceros* (A1, A2, A3) y los cubos de las demás dietas. Una probabilidad es que haya tenido que ver con algún error en cuanto a la cantidad de huevos sembrados. El conteo del primer día en los cubos con *Chaetoceros* reflejó una densidad de individuos (huevos y nauplios) por litro ligeramente mayor a la supuesta densidad de siembra. Otra probabilidad es que ese día las muestras hayan sido tomadas de un sector de los cubos donde se concentró mayor cantidad de individuos, o sea que resultaron ser muestras poco homogéneas. No se sabe exactamente a qué se debió la anomalía, sin embargo los números se regularon los siguientes días y los resultados finales fueron bastante proporcionados.

8.5 Cultivo estático

El objetivo inicial de este ensayo fue reproducir el método de cultivo estático de Schipp (1998) y verificar con poco detalle analítico la efectividad del sistema en la localidad del laboratorio y con la especie nativa más parecida. Sin embargo, debido a problemas en cuanto a la recolección de organismos de cultivo, el objetivo del ensayo tuvo que tomar una nueva dirección que resultó ser algo interesante. La población stock recolectada en el tercer viaje a Cañas no fue muy numerosa y se encontró severamente contaminada por zoeas de cangrejo y copépodos cyclopoideos del género *Oithona*. Fue imposible separar

físicamente las zoeas y cyclopoideos de los copépodos *Acartia* debido a sus tamaños similares. Esta situación fue poco conveniente en cuanto a los objetivos iniciales, pero sin embargo permitió experimentar en cuanto a un detalle interesante del método de cultivo de Schipp: su capacidad para eliminar organismos indeseables encontrados comúnmente en recolecciones salvajes. Según Schipp, los organismos no deseados como larvas de peces, crustáceos, huevos, etc., son eliminados de los cultivos luego de una o dos generaciones de *Acartia* en el laboratorio. Hipotéticamente, los copépodos *Acartia*, siendo organismos sumamente fértiles de las poblaciones zooplanctónicas salvaje, se reproducen y ganan predominancia de los cultivos automáticamente. Por lo tanto, el ensayo fue llevado a cabo, pero con un nuevo enfoque.

Durante el ensayo se presentó una gran permutación climática (fuertes lluvias, vientos fríos y nubes) que afectó la temperatura de los cultivos. Durante la siembra el clima se presentó estable, lo que se refleja en la temperatura de los cultivos los primeros días. Sin embargo, fuertes lluvias se presentaron a la mitad del experimento y la temperatura decayó en gran escala. Existe la posibilidad de que este cambio haya afectado la velocidad de crecimiento y/o la supervivencia de los nauplios y copepoditos.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1) Según el presente estudio la dieta pluri-algal (mix) a base de las 3 especies de microalga *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis* sp. e *Isochrysis galbana* en una proporción 2:1:1 respectivamente, se destacó del resto de las dietas por provocar un gran efecto estimulante sobre la producción de huevos en los copépodos calanoideos *Acartia* del estero de Cañas. Al parecer, estos copépodos son incitados a una mayor producción de huevos cuando son alimentados con una dieta conformada por varias especies de microalgas que cuando se utiliza únicamente un solo tipo de microalga. Las dietas monoalgales obtuvieron resultados pobres. *Tetraselmis* resultó brindar los mejores resultados en cuanto a las dietas monoalgales, seguida por *Chaetoceros* y por último *Isochrysis*.

2) El desarrollo naupliar resultó ser mayormente beneficiado al alimentar con la microalga *Isochrysis galbana*. Se presentó un mayor índice de supervivencia y alcance de desarrollo en cuanto a los estadios al alimentar con esta especie. Los nauplios lograron crecer y cambiar a estadios de copepodito únicamente en los cubos con *Isochrysis*. Las demás dietas no lograron que los nauplios cruzaran a estadios de copepodito. Sin embargo, la supervivencia del ensayo fue muy pobre en general y los cultivos no demoraron en morir. Se necesita la implementación de más pruebas y ensayos de nuevas dietas para profundizar aún más en

cuanto a la naturaleza naupliar de los copépodos calanoideos del estero de Cañas, Panamá, y para de esta forma poder desglosar con mayor precisión los requerimientos nutritivos de dichos organismos durante su crecimiento y desarrollo naupliar.

3) El sistema de cultivo estático creado por Schipp (1998) demostró efectivamente su habilidad de remover organismos indeseados en los cultivos. Luego de 8 días de cultivo, en ambos tanques, la población de organismos indeseables disminuyó y la población de copépodos calanoideos aumentó (nauplios y copepoditos). Sin embargo, los cultivos no lograron sobrevivir la cosecha y los copépodos murieron rápidamente antes de poder alcanzar la primera generación adulta. El filtrado de la cosecha y/o el cambio de parámetros de los nuevos cultivos afectaron de alguna manera el desarrollo de los animales y provocaron la muerte de los nauplios y copepoditos. Una posibilidad es que los cultivos no hayan estado listos para ser cosechados. Quizás los copepoditos necesitaban llegar a un estado de crecimiento más avanzado y resistente. Otra posibilidad es que el drástico cambio climático que se presentó durante el periodo del ensayo haya afectado negativamente el desarrollo de los animales. Luego de finalizar el ensayo, se implementó un último viaje de muestreo al estero de Cañas y se notó que la distribución del zooplancton había cambiado fuertemente. Los copépodos calanoideos, que en veces anteriores se habían encontrado en grandes cantidades, se habían reducido al mínimo. Esto hizo caer en cuenta sobre la directa relación entre las temporadas climáticas anuales y la propagación de la especie. Se necesita llevar a cabo pruebas posteriores para realmente comprobar si es posible reproducir el método de cultivo estático en nuestra localidad como protocolo de producción masiva de copépodos calanoideos marinos.

10. CROMOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad / Mes	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre
adecuamiento del lab.	X			
pruebas preliminares	X	X X		
cultivo de algas	X X	X X X X X	X X X X X	X
recolección de <i>Acartia</i>		X X	X X	X
ensayo de desove		X X X		
ensayo de desarrollo			X X	
cultivo estático			X X X X	

11. BIBLIOGRAFÍA

1. ABDULLAHI B., 1992. Effects of diet on growth and development of three species of cyclopoid copepods. *Hydrobiologia* 232: 233-241.
2. BENETTI, D.D. (1997). Mesocosm systems for the intensive larval rearing of marine fish. *The Advocate. Global Aquaculture Alliance Technical Magazine* Vol. 4(1): 45-46.
3. CABRERA, T., ROSAS, J., VELÁSQUEZ, A., MILLÁN, J., (2002). Cultivo de copépodos en Venezuela. http://www.panoramaacuicola.com/noticia.php?art_clave=70.
4. DOI, M. (1997). Report of technical cooperation on the seed production of pargo in the Republic of Panama. INTEM Consulting Inc. 2nd floor, Office K Building, 7-22-18 Nishi-shinjuku, Shinjuku-ku, Tokio 160, Japan.
5. MARCUS, N. (2005). Effectiveness of copepod nauplii as a live feed alternative for first feeding of southern flounder larvae. <http://www.hboi.edu/aqua/spawns5.html>

6. NELLEN, W., 1985. Live animal food for larval rearing in aquaculture. Non *Artemia* organisms. In: M. Bilio, H. Rosenthal and C.J. Sinderman (Editors), Realism in Aquaculture: Achievements, Constraints, Perspectives. Proc. World Conference on Aquaculture, Venice, 1981. Eur. Aquacult. Soc., Bredene, Belgium.
7. PEDERSEN, B.H., 1984. The intestinal evacuation rates of larval herring (*Clupea harengus* L.) predated on wild plankton. Dana, 3: 21-30
8. RIPPINGALE, R. J. AND PAYNE, M. F. (2001). Intensive cultivation of a calanoid copepod *Gladioferens imparipes*, a guide to procedures. Aquaculture. 201: 329-342.
9. SCHIPP, G.R., J. M. P. BOSMANS, ET AL. (1998). A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. Aquaculture. 174: 81-88.
10. STOTTRUP, J.G., K. RICHARDSON, E. KIRKEGAARD & N.J. PIHL, 1986. The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. *Aquaculture*, Vol. 52, pp. 87-96.
11. UYE, S. (1997). Report on Culture of Local Copepod Species for Mass Production of Nauplii as Diet for Yellowfin Tuna Larvae. Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University 4-4 Kagamiyama 1 Chome, Higashi-Hiroshima 739, Japan.
12. VELÁSQUEZ, ROSAS, CABRERA, MILLÁN, HERNÁNDEZ, (2001). Efecto de *Tetraselmis chuii*, *Nannochloris oculata* y *Dunaliella salina* sobre el crecimiento

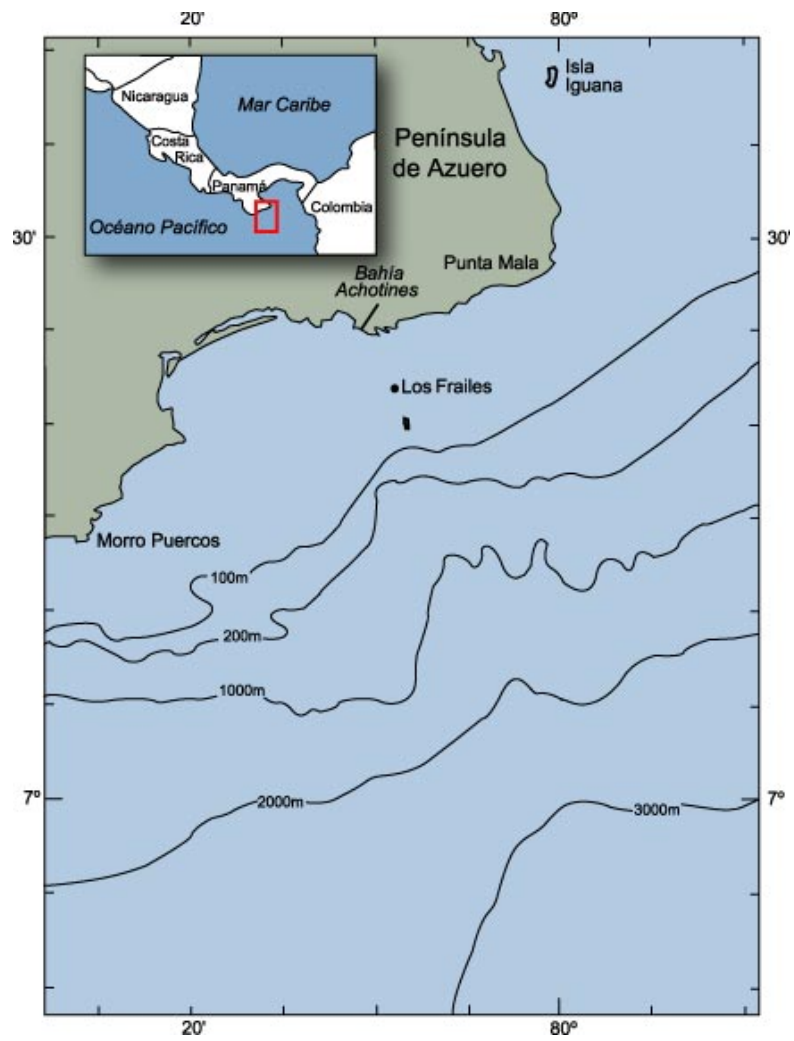
poblacional de *Apocyclops distans* (Copepoda, Cyclopoidae) en diferentes condiciones de temperatura e iluminación. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 36 (2): 189-197.

13. WATANABE, T., KATAJIMA, C. AND FUJITA, S., 1983. Nutritional value of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34: 115-143.
14. WITT, U., QUANTZ, G., KUHLMANN, O. AND KATTNER, G., 1984. Survival and growth of turbot larvae, *Scophthalmus maximus* L. reared on different food organisms with special regard to long-chain polyunsaturated fatty acids. *Aquicult. Eng.*, 3 (3): 177-190.

12. ANEXOS



Vista aérea del Laboratorio



Locación geográfica del Laboratorio



Locación geográfica de la Isla de Cañas



Estero de Cañas (entre la Isla de Cañas y tierra firme)



Red de arrastre



Recolección de las muestras



Transporte de las muestras al Laboratorio



Recepción en el Laboratorio de Plancton



Tanques de filtraje y lavado



Filtros especiales de 500 y 100 micras

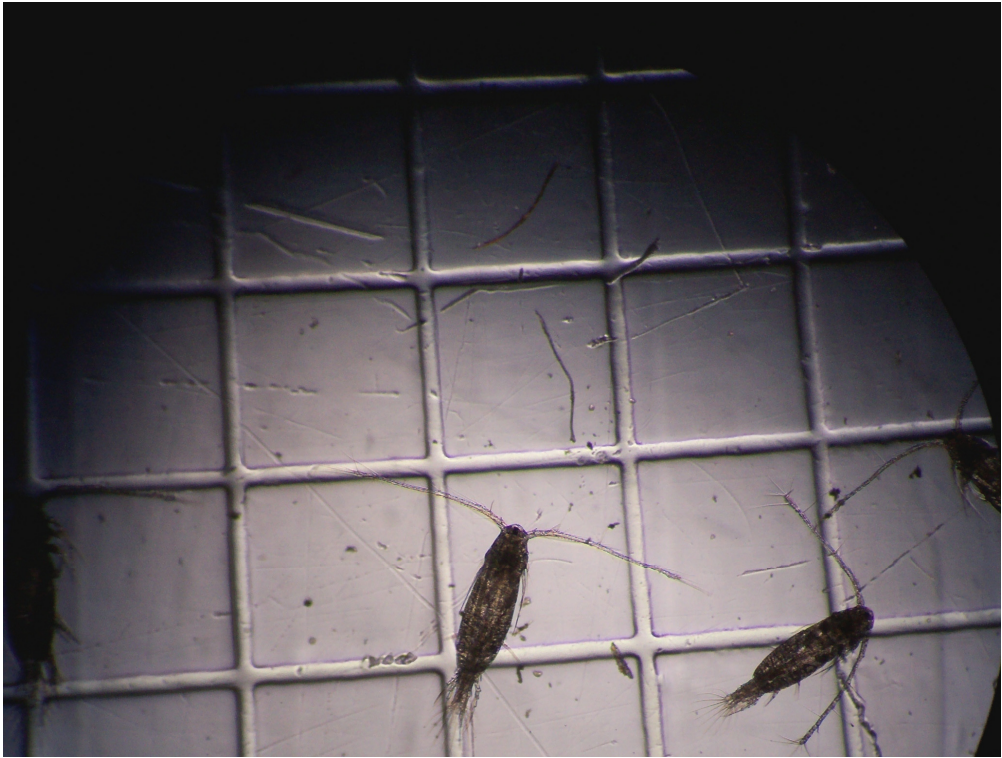


Foto microscópica de copéodos *Acartia* adultos



Foto microscópica de hembra *Acartia* madura



Cubos de 20 litros: 1er y 2do ensayo



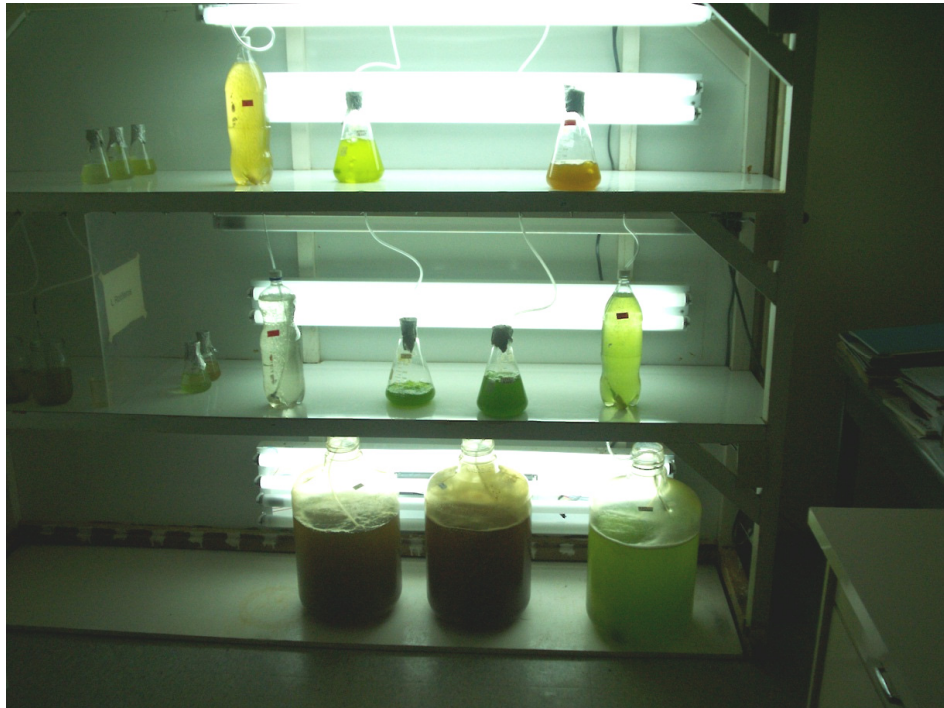
Demás cubos de 20 litros: 1er y 2do ensayo



Implementos para los muestreos diarios: tubos de ensayo, formol, pipeta



Conteo y análisis de muestras: microscopio, cámara de conteo, estereoscopio



Cultivo de algas interno: beakers 500 ml, envases 2 L, carboys 20 L



Área interna de cultivo de algas: cilindro 80 L con *Tetraselmis*



Desinfección de cilindros y carboy: cloro y agua dulce



Tanque de cultivo de 400 litros: desove, segundo ensayo



Tanques cónicos de 100 litros: cultivo estático



Cultivo estático: método de G.R. Schipp