



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



“EVALUACION DE ALGUNAS VARIABLES AMBIENTALES SOBRE EL
CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA EN JUVENILES DE CABALLITO DE MAR DEL
PACIFICO *Hippocampus ingens* (Teleostei: Sygnathidae)”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
O C E A N O L O G O
PRESENTA:
JAVIER MOCH MARTINEZ

ENSENADA, B.C., NOVIEMBRE DEL 2004

“EVALUACION DE ALGUNAS VARIABLES AMBIENTALES SOBRE EL
CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA EN JUVENILES DE CABALLITO DE MAR DEL
PACIFICO *Hippocampus ingens* (Teleostei: Sygnathidae)”

T E S I S

QUE PRESENTA:
JAVIER MOCH MARTINEZ

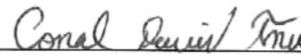
Aprobada por:



Dr. Juan Pablo Lazo
Director



Dra. Lus Mercedes López Acuña
Sinodal



M.C. Conal David True
Sinodal

RESUMEN

Con el propósito de aumentar el crecimiento y la supervivencia en juveniles de *H. ingens* bajo condiciones controladas de cultivo, se realizaron 5 ensayos evaluando algunas condiciones ambientales. Se experimentó con variables de iluminación, color del estanque, acceso a la superficie del agua y con la adición de microalgas al estanque de la especie *Nannochloropsis oculata*. El protocolo de alimentación para todos los experimentos consistió en utilizar rotíferos como alimento vivo durante la primera semana, y artemia a partir del 8vo día, ambos enriquecidos con una emulsión comercial (HUFA Enrich, Salt Creek, Salt Lake City, Utah) rica en ácidos grasos.

Se utilizó una columna de intercambio de gases para intentar reducir el problema en la flotabilidad de los juveniles observado en ensayos preeliminares y que pudiera ser causado por la sobresaturación de gases. En el primer experimento se evaluó la iluminación en el fondo, colocando lámparas sumergibles de luz fluorescente contra la iluminación en superficie, colocando lámparas fluorescentes en la parte superior de los estanques. En el segundo experimento se evaluó el acceso a la superficie del agua y la intensidad de iluminación, colocando cubetas de 4L con y sin tapa sumergidas en dos estanques, permitiendo el flujo de agua y alimento por medio de ventanas con malla de 300μ . Se colocó una lámpara de luz fluorescente en la parte superior de un estanque, y se oscureció el otro con plástico de color negro. En el tercer experimento se evaluó sólo el acceso a la superficie antes de que los juveniles inflaran inicialmente la vejiga natatoria con el mismo sistema utilizado anteriormente. En el cuarto experimento se evaluó el efecto del color del estanque en los juveniles utilizando estanques de color azul y blanco. En el quinto experimento se evaluó el efecto de la adición de microalgas en el cultivo a una concentración de 7.5×10^5 cel/ml utilizando estanques de color azul.

Se encontró una disminución de oxígeno disuelto al utilizar la columna de intercambio de gases, sin embargo ésta fue muy limitada. No se obtuvo una diferencia significativa en supervivencia al colocar iluminación en el fondo con respecto a la iluminación en superficie, debido probablemente a la presencia de microburbujas en el sistema, causando una alta mortalidad en ambos tratamientos. No se observaron diferencias significativas en cuanto a supervivencia en los tratamientos de acceso a la superficie e intensidad de iluminación, ya que también se presentaron altas mortalidades, y no hubo interacción entre éstos dos factores. Sin embargo se observó que los juveniles de *H. ingens* necesitan tener acceso a la superficie para inflar inicialmente la vejiga natatoria. Al comparar el color del estanque, se obtuvo mayor supervivencia en estanques de color blanco que en estanques de color azul, los cuales presentaron mayor iluminación y por lo tanto se piensa que presentaron mejor contraste con el alimento vivo para los juveniles. A su vez, en el experimento para evaluar el efecto de la adición de microalgas se obtuvo mayor crecimiento y supervivencia en estanques con la adición de microalgas que los estanques sin microalgas. Se piensa que los juveniles de *H. ingens* cultivados en presencia de microalgas obtuvieron un alimento vivo de mayor valor nutricional, y existe la posibilidad que los juveniles ingeririeron las microalgas directamente. En el presente trabajo se discuten algunos beneficios adicionales que se pudieran presentar en el cultivo en agua verde, incluyendo una mejor asimilación del alimento vivo, el cambio en las condiciones de luz en el agua de cultivo, el establecimiento inicial de la flora bacteriana en el tubo digestivo de los juveniles y la pigmentación del alimento vivo con las microalgas que puede favorecer a los juveniles en la detección de sus presas.

Dedicatoria,

A mi Ayeyita:

Margarita Lacy

A mis Padres:

Juan Moch y Emma Martínez

A la esposa de mi Padre:

Amelia Obregón

A mis Hermanos:

Alejandro, Fernando y Regina Moch

Agradecimientos:

A Paulina Cetina Heredia, eres la persona mas especial en mi vida.

Muchas gracias a todo el personal docente y administrativo de la Universidad Autónoma de Baja California, en la Facultad de Ciencias Marinas,

A todo el personal administrativo, técnico y docente en el Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, B.C. CICESE, en la división de Acuacultura, especialmente a María Helena, Viviana, Mónica, Pilar, Jesús, Adrián, Francisco y Luis, y por supuesto al Dr. Bückle por permitirme trabajar en su laboratorio y compartir su enorme experiencia.

Al Dr. Juan Pablo Lazo, por haberme dado esta oportunidad y apoyo a pesar de todas las dificultades presentadas, y por haber aprendido mucho mas de lo plasmado en esta tesis, como director y amigo, gracias.

Al Dr. Benjamín Barón, como investigador y amigo, por haberme recibido en tu proyecto con las puertas abiertas, por tus enseñanzas y tu apoyo técnico y científico,

A la Dra. Luz López, por tu dedicación e interés a lo largo de este proyecto, por tu puntualidad en la entrega de correcciones y observaciones acertadas.

Al M.C. David Conal True, por haberme apoyado en el suministro de rotíferos, en tu apoyo técnico en la construcción de un cosechador bajo tu patente, por tu interés y observaciones acertadas.

A todo el equipo en el proyecto Totoaba: Iván, Gerardo, Alejandra.

A la Dra. Beatriz Cordero por su apoyo en el cultivo de microalgas y a sus estudiantes: Ruth y Jaime.

A Marielos, Baltazar, Ana Helena y toda su familia.

A todos mis amigos: Dany, Tony, Quique, Naielli, Le Güere, Ragnar, Fernando y Carlos Jaimes, Humberto, Moisés, Enrique y Tatiana, Renata, Julio y Vero, Marta, Ximena, Benny, Gino, Freddy, Luis Tucker, Oliver, Pablo, Yoyo, Waffles y demás.

CONTENIDO

1.0 INTRODUCCION.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Biología y distribución.	2
1.1.2 Cultivo de caballitos de mar.	4
1.1.2.1 La iluminación.	5
1.1.2.2 El color del estanque.	5
1.1.2.3 El problema de la burbuja de aire.	6
1.1.2.4 El acceso a la superficie.	7
1.1.2.5 La adición de microalgas.	7
2.0 HIPOTESIS.....	9
3.0 OBJETIVO.....	10
3.1 Objetivos particulares.	10
4.0 MATERIALES Y METODOS.....	10
4.1 Origen de los juveniles.	10
4.2 Alimentación de los juveniles.	11
4.3 Cultivo del alimento vivo.	12
4.3.1 Cultivo de rotíferos.	12
4.3.2 Cultivo de artemia.	13
4.3.3 Cultivo de microalgas.	14
4.4 Enriquecimiento.	16
4.5 Diseño experimental.	16
4.5.1 El efecto de la iluminación en superficie y en el fondo.	16
4.5.2 El efecto de la intensidad de luz y acceso a la superficie del agua.	19
4.5.3 El efecto del acceso a la superficie antes de inflar la vejiga natatoria.	21
4.5.4 El efecto del color en el estanque.	22
4.5.5 El efecto del cultivo en agua verde.	23
4.6 Condiciones generales de cultivo.	25
4.7 Crecimiento y supervivencia.	25
4.8 Análisis estadístico.	27
5.0 RESULTADOS.....	28
5.1 El efecto de la iluminación en superficie y en el fondo.	28
5.1.1 Crecimiento y supervivencia.	28
5.1.1.1 Longitud.	28
5.1.1.2 Supervivencia.	30
5.1.2 Parámetros físico-químicos.	31
5.2 La intensidad de luz y acceso a la superficie.	32
5.2.1 Crecimiento y supervivencia.	33
5.2.1.1 Longitud.	33
5.2.1.2 Supervivencia.	34
5.2.2 Parámetros físico-químicos.	36
5.3 El acceso a la superficie antes de inflar la vejiga natatoria.	37

5.3.1 Crecimiento y supervivencia.	37
5.3.1.1 Longitud.	37
5.3.1.2 Supervivencia.	37
5.3.2 Parámetros físico-químicos.	39
5.4 El color del estanque.	40
5.4.1 Crecimiento y supervivencia.	40
5.4.1.1 Longitud.	40
5.4.1.2 Supervivencia.	40
5.4.2 La iluminación de acuerdo al color del estanque.	42
5.4.3 Variables físico-químicas.	45
5.5 El efecto del cultivo en agua verde.	46
5.5.1 Crecimiento y supervivencia.	46
5.5.1.1 Longitud.	46
5.5.1.2 Peso seco.	49
5.5.1.3 Supervivencia.	50
5.5.2 Parámetros físico-químicos.	53
6.0 DISCUSIONES.	54
6.1 El efecto de la iluminación en superficie y en el fondo.	54
6.2 El efecto de la intensidad de iluminación y acceso a la superficie.	55
6.2.1 Estructuras de fijación.	56
6.3 El efecto del acceso a la superficie antes de inflar la vejiga natatoria.	56
6.4 El efecto del color del estanque.	57
6.4.1 La iluminación y el contraste.	58
6.4.2 La distribución de los juveniles.	58
6.5 El efecto de la adición de microalgas.	59
6.5.1 Características nutricionales de las microalgas.	60
6.5.2 El efecto de las microalgas en la iluminación.	61
6.5.3 El efecto de las microalgas en la flora bacteriana.	62
6.5.4 El efecto de las microalgas en la pigmentación.	63
6.5.5 El efecto de las variaciones de temperatura y oxígeno disuelto.	64
7.0 CONCLUSIONES.	66
8.0 RECOMENDACIONES.	68
9.0 BIBLIOGRAFIA.	70
10. ANEXOS.	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Distribución de caballitos de mar.	3
Figura 2.- Sistema utilizado para el cultivo de <i>N. oculata</i> , a partir de inóculos sucesivos en vasos Erlenmeyer, Fernbach hasta garrafones de 18L.	15
Figura 3.- Diagrama de la iluminación en la superficie y en el fondo de los estanques.	18
Figura 4.- Sistema de cultivo utilizado para el efecto de la iluminación en el fondo mostrando el filtro de lecho fluidizante, filtro de arena y filtro UV.	18
Figura 5.- Diagrama de las cubetas utilizadas en los experimentos de acceso a la superficie del agua e intensidad de luz, y acceso a la superficie antes de inflar la vejiga natatoria.	20
Figura 6.- Estanques azules y blancos de 200L utilizados para el efecto del color del estanque.	23
Figura 7.- Estanques azules de 200L utilizados para el efecto del cultivo en agua verde.	24
Figura 8.- Juveniles de <i>H. Ingens</i> en charolas de aluminio antes de introducirse al horno de desecación para la determinación del peso seco.	26
Figura 9.- Longitud promedio en milímetros de los juveniles de <i>H. Ingens</i> para los tratamientos de luz en el fondo y luz en la superficie.	30
Figura 10.- Porcentaje de Supervivencia al día 6 para los tratamientos de luz en el fondo y luz en la superficie.	31
Figura 11a.- Juvenil de <i>H. ingens</i> a los 2 días de vida libre con la vejiga natatoria hiperinflada, causando una flotabilidad positiva al organismo.	33
Figura 11b.- Juvenil de <i>H. ingens</i> a los 2 días de vida libre con la vejiga natatoria.	33
Figura 12.- Porcentaje de supervivencia promedio al día 6 para los tratamientos con iluminación alta abierto y cerrado, e iluminación baja abierto y cerrado.	35
Figura 13.- Porcentaje de supervivencia a través del tiempo para los tratamientos de iluminación baja sin acceso (IBSA), iluminación baja con acceso (IBCA), iluminación alta sin acceso (IASA) e iluminación alta con acceso (IACA).	36
Figura 14.- Porcentaje de supervivencia promedio al día 6 para los tratamientos con acceso y sin acceso a la superficie.	38

Figura 15.- Porcentaje de supervivencia promedio a lo largo del tiempo para los tratamientos con acceso y sin acceso a la superficie.	39
Figura 16.- Porcentaje de supervivencia promedio al día 16 para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco.	41
Figura 17.- Porcentaje de supervivencia promedio a lo largo del tiempo para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco.	42
Figura 18.- Efecto de la iluminación al centro del estanque para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco en $q/s/cm^2 \times 10^4$	44
Figura 19.- Efecto de la iluminación al borde del estanque para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco en $q/s/cm^2 \times 10^4$	45
Figura 20.- Longitud promedio en milímetros al día 7 para los tratamientos con adición de microalgas de la especie <i>N. oculata</i> y sin adición.	47
Figura 21.- Longitud promedio en milímetros al día 12 para los tratamientos con adición de microalgas de la especie <i>N. oculata</i> y sin adición.	48
Figura 22.- Peso seco promedio en miligramos al día 12 para los tratamientos con adición de microalgas de la especie <i>N. oculata</i> y sin adición.	50
Figura 23.- Porcentaje de supervivencia promedio al día 7 para los tratamientos con adición de microalgas de la especie <i>N. oculata</i> y sin adición.	51
Figura 24.- Porcentaje de supervivencia promedio al día 12 para los tratamientos con adición de microalgas de la especie <i>N. oculata</i> y sin adición.	53
Figura 25.- Porcentaje de supervivencia promedio a lo largo del tiempo para los tratamientos con adición de microalgas de la especie <i>N. oculata</i> y sin adición.	53
Figura 26a.- Juvenil de <i>H. ingens</i> a los 12 días de vida libre con la vejiga natatoria hiperinflada, presentando problemas de flotabilidad.	65
Figura 26b.- Juvenil de <i>H. ingens</i> a los 12 días de vida libre con la vejiga natatoria inflada normalmente, sin presentar problemas de flotabilidad.	65

ANEXOS

Figura 27.- Temperatura en grados centígrados para los tratamientos de luz en el fondo y luz en la superficie a lo largo del tiempo.	73
Figura 28.- Oxígeno disuelto en miligramos por litro para los tratamientos de luz en el fondo y luz en la superficie a lo largo del tiempo.	73
Figura 29.- Salinidad en partes por mil para los tratamientos de luz en el fondo y luz en la superficie a lo largo del tiempo.	74
Figura 30.- Potencial de hidrógeno para los tratamientos de luz en el fondo y luz en la superficie a lo largo del tiempo.	74
Figura 31.- Temperatura en grados centígrados para los tratamientos de iluminación alta con y sin acceso a la superficie, e iluminación baja con y sin acceso a lo largo del tiempo.	75
Figura 32.- Valores de oxígeno disuelto promedio en mg/l para los tratamientos de iluminación alta con y sin acceso a la superficie, e iluminación baja con y sin acceso a lo largo del tiempo.	75
Figura 33.- Salinidad en partes por mil para los tratamientos de iluminación alta con y sin acceso a la superficie, e iluminación baja con y sin acceso a lo largo del tiempo.	76
Figura 34.- Valores de pH para los tratamientos de iluminación alta con y sin acceso a la superficie, e iluminación baja con y sin acceso a lo largo del tiempo.	76
Figura 35.- Temperatura en grados centígrados para los tratamientos con acceso y sin acceso a la superficie a lo largo del tiempo.	77
Figura 36.- Oxígeno disuelto en miligramos por litro para los tratamientos con acceso y sin acceso a la superficie a lo largo del tiempo.	77
Figura 37.- Salinidad en partes por mil para los tratamientos con acceso y sin acceso a la superficie a lo largo del tiempo.	78
Figura 38.- Valores de pH para los tratamientos con acceso y sin acceso a la	

superficie a lo largo del tiempo.	78
Figura 39.- Temperatura en grados centígrados para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco a lo largo del tiempo.	79
Figura 40.- Oxígeno disuelto en miligramos por litro para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco a lo largo del tiempo.	79
Figura 41.- Salinidad en partes por mil para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco a lo largo del tiempo.	80
Figura 42.- Valores de pH para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco a lo largo del tiempo.	80
Figura 43.- Temperatura en grados centígrados para los tratamientos con adición de microalgas de la especie <i>N. oculata</i> y sin adición a lo largo del tiempo.	81
Figura 44.- Salinidad en partes por mil para los tratamientos con adición de microalgas de la especie <i>N. oculata</i> y sin adición a lo largo del tiempo.	81
Figura 45.- Valores de oxígeno disuelto en miligramos por litro para los tratamientos con adición de microalgas de la especie <i>N. oculata</i> y sin adición a lo largo del tiempo.	82
Figura 46.- Valores de pH para los tratamientos con adición de microalgas de la especie <i>N. oculata</i> y sin adición a lo largo del tiempo.	82

LISTA DE TABLAS

Tabla I.- Protocolo de enriquecimiento para rotíferos y artemia de acuerdo a las especificaciones del producto.	16
Tabla II. Análisis estadístico aplicado a todos los experimentos para las variables de supervivencia, longitud y peso seco.	27
Tabla III.-Prueba t para muestras independientes sobre el efecto de la longitud para los tratamientos de luz en fondo y luz en superficie.	29
Tabla IV.- Prueba t para muestras independientes sobre el efecto del porcentaje de la supervivencia para los tratamientos de luz en fondo y luz en superficie.	30
Tabla V.- Longitudes promedio al día 6 de cultivo en juveniles de <i>H. ingens</i> para los tratamientos de iluminación alta con acceso (IACA), iluminación alta sin acceso (IASA), iluminación baja con acceso (IBCA) e iluminación baja sin acceso (IBSA).	34
Tabla VI.- Análisis de varianza de dos vías del efecto del porcentaje de la supervivencia sobre los factores de intensidad de luz y acceso a la superficie.	35
Tabla VII- Prueba de suma de rangos de Mann-Whitney sobre el efecto del Porcentaje de la supervivencia para los tratamientos con acceso y sin acceso a la superficie.	38
Tabla VIII.-Prueba t para muestras independientes sobre el efecto del porcentaje de la supervivencia para los tratamientos del color del estanque: azul y blanco.	41
Tabla IX.- Valores de iluminación dentro de los estanques de color blanco y azul, al centro y al borde de los estanques a una profundidad media en $q/s/cm^2 \times 10^4$	43
Tabla X.- Prueba t para muestras independientes sobre el efecto de la iluminación al centro para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco.	43
Tabla XI.- Prueba t para muestras independientes sobre el efecto de la iluminación al borde para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco.	44
Tabla XII.- Prueba t para muestras independientes sobre el efecto de longitud a los 7 días de cultivo para los tratamientos con y sin microalgas de la especie	

<i>N. oculata</i> . Datos transformados a logaritmo natural (ln).	46
Tabla XIII.- Prueba t para muestras independientes sobre el efecto de la longitud a los 12 días de cultivo para los tratamientos con y sin microalgas de la especie <i>N. oculata</i>	48
Tabla XIV.- Prueba t para muestras independientes sobre el efecto del peso seco a los 12 días de cultivo para los tratamientos con y sin microalgas de la especie <i>N. oculata</i>	49
Tabla XV.- Prueba t para muestras independientes sobre el efecto del porcentaje de la supervivencia a los 7 días de cultivo para los tratamientos con y sin microalgas de la especie <i>N. oculata</i>	50
Tabla XVI.- Prueba t para muestras independientes sobre el efecto del porcentaje de supervivencia a los 12 días de cultivo para los tratamientos con y sin microalgas de la especie <i>N. oculata</i>	52

1.0 INTRODUCCION

El interés en el cultivo comercial del caballito de mar se ha incrementado como consecuencia de la sobreexplotación de esta especie principalmente en el sureste de Asia, y a la necesidad de satisfacer el mercado oriental para fines medicinales y de ornato (Vincent, 1996; Hilomen-García, 1999). Existen actualmente 51 países involucrados en la compra-venta de caballitos de mar, y anualmente se colectan alrededor de 20 millones de ejemplares, los cuales no superan la demanda de este mercado. Los caballitos de mar llegan a alcanzar precios muy altos en el mercado, por lo que su comercialización puede ser altamente rentable (Vincent, 1996; Lourie et al., 1999).

De acuerdo a las estadísticas más recientes de CITES (Convention on International Trade in Endangered Species) 2003, prácticamente todas las especies existentes de caballitos de mar se encuentran en la lista de especies amenazadas o en peligro de extinción, incluyendo a las tres especies que habitan en el litoral de México, siendo una de éstas el caballito de mar del pacífico *Hippocampus ingens*.

Aunque la producción de peces marinos por medio de cultivo ha incrementado en los últimos años, existen especies que aún no han sido explotadas comercialmente. El desarrollo de la tecnología para su cultivo da lugar a nuevos retos para la ciencia de la acuicultura y puede ofrecer alternativas para programas de repoblamiento, así como suministrar de manera controlada organismos en el mercado mundial.

El caballito de mar del Pacífico *H. ingens* es un buen candidato para la acuicultura en México ya que es la única especie presente en la costa del Pacífico Mexicano, y es la especie de mayor tamaño.

En el presente trabajo se pretende identificar las principales limitantes en el cultivo de *H. ingens* durante la etapa juvenil, que es cuando se presenta la mayor mortalidad, evaluando algunas variables ambientales y de esta manera encaminar futuras investigaciones.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Biología y distribución

La distribución del caballito de mar del género *Hippocampus* es muy amplia, usualmente se encuentra en zonas costeras poco profundas, en aguas tropicales, subtropicales y templadas. La mayor diversidad de especies se encuentra en el Pacífico-Indico: en Australia y el Sureste Asiático donde se presentan al menos 21 especies (Lourie et al., 1999) (Fig.1). En las costas de México se encuentran 3 especies, de las cuales sólo una se distribuye en el pacífico: *Hippocampus ingens* (Lourie et al., 1999). *H. Ingens* es la especie de caballito de mar que alcanza el mayor tamaño llegando a medir hasta 20 cm de longitud total (Lourie, 1999).

La distribución de *H. Ingens* abarca desde San Diego, California, E.U.A hasta Perú (Kuitter, 2000). En estos límites se han reportado ejemplares particularmente en períodos de calentamiento del agua por un evento "El Niño" (Lourie et al., 1999) (Fig.1).



Figura 1.- Distribución de caballitos de mar: ■ *H. ingens*; ■ Todas las especies.

Su habitat natural se encuentra en lagunas estuarinas y bahías, particularmente en zonas someras de manglares, pastos marinos y arrecifes coralinos (Dames, 2000), aunque se han encontrado ejemplares migrando hasta los 60 m de profundidad (Lourie et al., 1999). En cautiverio alcanza la madurez sexual entre los 10 y 12 meses de edad (Dames, 2000). Para la reproducción el macho toma las responsabilidades parentales al fertilizar los huevos en el saco abdominal e icubar a los embriones por un período de 14 a 15 días (Lourie et al., 1999). Posteriormente son expulsados del saco abdominal un promedio de 300 a 1500 juveniles, siendo así una de las especies de caballitos más prolíferas (Barón, comunicación personal) junto con *H. reidi* (Giwojna, 1996). En el medio natural, solo el 1% logra sobrevivir hasta talla adulta, y un porcentaje aún menor llega a reproducirse (Cozzi-Schmarr, 2003).

En el proyecto de cultivo del caballito de mar *H. ingens*, dirigido por el Dr. Benjamín Barón en el Centro de Investigación Científica y Educación Superior (CICESE), Ensenada, B.C. México, aún no se ha logrado tener una alta supervivencia en condiciones de cultivo, ya que se presentan altas mortalidades de juveniles en los primeros días fuera del saco abdominal (Barón y colaboradores, comunicación personal).

1.1.2 Cultivo de caballitos de mar

Los caballitos de mar son particularmente difíciles de cultivar bajo condiciones controladas (Vincent, 1996, 1998). Gardner (2003) menciona que el principal cuello de botella que se presenta durante el desarrollo temprano de caballitos de mar se debe principalmente a la inhabilidad de suplementar un alimento que logre satisfacer los requerimientos nutricionales de los juveniles, y a un problema relacionado con el proceso de inflar inicialmente la vejiga natatoria. Estos factores pueden afectar a más del 50% de los juveniles durante los primeros días de vida fuera del saco abdominal. A pesar de que estos problemas son comunes en la piscicultura marina, existen pocos estudios científicos con respecto a las técnicas de cultivo para caballitos de mar (Wong et al., 2003).

En otros estudios recientes, Scarrat y colaboradores (1995) reportaron una baja supervivencia de juveniles durante las primeras semanas de vida fuera del saco abdominal sin tener alguna explicación adecuada. No obstante, Correa y colaboradores (1989) obtuvieron el 97% de supervivencia con juveniles de la especie *H. erectus* a los 35 días de haber sido liberados del saco abdominal (Woods, 2000). Se cree que esta especie es más fácil de cultivar porque presenta un mayor grado de desarrollo antes de ser expulsados del saco abdominal (Barón, comunicación

personal). A su vez, Job y colaboradores (2002) obtuvieron una alta supervivencia (73%) para *H. kuda* hasta talla comercial (12cm).

A continuación se enlistan algunos de los factores de importancia que se han reportado para el cultivo de juveniles de caballito de mar.

1.1.3 La iluminación

Las larvas de peces a temprana edad poseen un sistema visual muy simple, y la mayoría son predadores visuales, por lo que dependen de la luz para capturar sus presas (Naas et al.,1996)). Woods (2000) encontró una alta supervivencia con juveniles de *H. abdominalis* en acuarios con iluminación lateral y oscurecidos en la superficie comparado con acuarios oscurecidos en las paredes e iluminación en la superficie . Existe poca literatura acerca de las condiciones de iluminación adecuadas para el cultivo larvario de peces marinos, pero es útil conocer las condiciones naturales en las cuales los organismos viven para hacer un diseño de iluminación adecuado (Naas et al., 1996).

1.1.3 El color del estanque

Otro factor que puede afectar la iluminación en los estanques es el color del mismo, y dependiendo de éste se puede obtener un contraste adecuado para facilitar la detección de las presas. Así mismo, un estanque de color claro reflejará la luz directa aumentando la intensidad mientras que un estanque de color oscuro la absorberá disminuyendo la intensidad. Woods (2000) encontró un mayor índice de ataque y captura de presas para juveniles de *H. abdominalis* cultivados en estanques transparentes y de color negro que en estanques de color blanco durante la

primera semana de vida. Sin embargo, reportó un mayor índice de captura de presas en estanques de color blanco para el primer mes de vida.

1.1.4 El problema de la burbuja de aire

Durante la etapa larval, los peces fisoclistos pasan por un período de transición en el cual está presente una glándula de gas rudimentaria y un ducto neumático que conecta el tubo digestivo a la vejiga natatoria. En este estadio de desarrollo, se piensa que la mayoría de los peces inflan inicialmente la vejiga natatoria ingiriendo aire en la superficie (Lagler et al., 1977). Sin embargo, aún no existe evidencia que elimine la posibilidad de que se produzcan emisiones de gas en la glándula para inflar la vejiga natatoria (Martin-Robichaud et al., 1998).

Uno de los factores que afectan este proceso es la sobresaturación de gases en el medio, principalmente el oxígeno, el nitrógeno y el bióxido de carbono. La cantidad de estos gases que permanecen solubles en la columna de agua están determinados por la presión, temperatura y salinidad. El problema de la burbuja de aire se presenta cuando el oxígeno disuelto en el tejido del organismo no está en equilibrio con el agua que lo rodea, provocando que se formen burbujas de aire tanto en el medio como en los tejidos y la sangre del organismo. Jensen (1988) menciona que la sobresaturación de gases en el agua causa el trauma de la burbuja de aire en peces, provocando altas mortalidades.

La ingestión de burbujas de aire hacia el tracto digestivo provoca otro impedimento en el organismo para lograr una flotabilidad neutra. Así mismo, una vejiga hiperinflada va a causar una flotabilidad positiva y como consecuencia, muerte por inanición (Cozzi- Schmarr, 2003). Esto

es debido a la incapacidad en el organismo de mantener su posición vertical en la columna de agua para cazar sus presas y puede provocar lesiones en la vejiga natatoria (Jensen, 1988).

1.1.5 El acceso a la superficie

Woods (2000) encontró mayor supervivencia para juveniles de *H. abdominalis* al impedir el acceso de los juveniles a la superficie del estanque utilizando una tapa, y mayor incidencia de burbujas de aire en el tracto digestivo en estanques sin tapa. En contraste, Chatain y Ounais-Guschemann (1990) observaron que las larvas de *Sparus auratus* no fueron capaces de inflar inicialmente la vejiga natatoria cuando se les impedía el acceso a la superficie al colocar una capa de parafina líquida que actuaba como una barrera en la interfase del agua con la atmósfera, causando una alta mortalidad.

Una vez inflada la vejiga natatoria, el acceso a la superficie puede presentar un riesgo para regular la flotabilidad en algunas especies de larvas de peces debido a la alimentación cerca de la superficie, como lo observado por Woods (2000) para juveniles de *H. abdominalis*. Nash y colaboradores (1977) encontraron que la vejiga natatoria en larvas de *Mugil cephalus* estaba excesivamente extendida y llena de gas debido a la captura de presas muy cerca de la superficie del agua, provocando ingestión de aire en la superficie y a la escasa diferencia de presión entre el agua y la atmósfera, causando imposibilidad de movimiento en las larvas.

1.1.6 La adición de microalgas

Se conoce muy poco acerca de los requerimientos nutricionales en la etapa juvenil de los cablitos de mar. Sin embargo, Reitan et al. (1997) menciona que en los esfuerzos por incrementar

el crecimiento y la supervivencia en larvas de peces marinos, se han reportado mejores resultados al añadir microalgas de varias especies en el medio de cultivo (Howell, 1979; Scott and Middleton, 1979; Jones et al., 1981; Bromley and Howell, 1983; Vasquez-Yeomans et al., 1990; Naas et al., 1992). A su vez, menciona que aunque aún no existe una explicación directa, se piensa que las microalgas mejoran la condición nutricional de las larvas, ya sea directamente (Moffatt, 1981), o indirectamente al incrementar el valor nutricional del alimento vivo utilizado para cultivar las larvas (Howell, 1979; Scott and Middleton, 1979; Lubzens, 1987).

Otra teoría sugiere que las microalgas pueden afectar a la comunidad microbiana en el medio y en el alimento vivo (Nicolas et al., 1989) lo cual afecta a la microflora intestinal de la larva (Reitan et al., 1993), posiblemente causando cambios en su composición. Gatesoupe (1991) sugiere que el número de bacterias y la composición de la flora bacteriana asociada al alimento vivo (rotíferos) es importante para las larvas de peces marinos.

La adición de microalgas en el medio también puede causar un cambio en las condiciones de iluminación y como consecuencia, un cambio en el comportamiento alimenticio de las larvas (Naas et al., 1992). Reitan y colaboradores (1993) encontraron que la supervivencia en larvas de turbot *Scophthalmus maximus* fué significativamente mayor añadiendo microalgas de la especie *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis sp.* Así mismo, encontraron un mayor crecimiento y supervivencia en larvas de turbot y lenguado *Hippoglossus hippoglossus* al añadir microalgas de la especie *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis sp.*, concluyendo que la ingestión de éstas pueden activar el proceso digestivo y contribuir al establecimiento inicial de la flora bacteriana.

Por otra parte, existe la posibilidad de que la presencia de microalgas mejore la asimilación del alimento vivo. Lazo y colaboradores (2000) encontraron que al proporcionar

alimento formulado en combinación con microalgas para alimentar a larvas de corvina dorada *Sciaenops ocellatus*, presentaron un incremento significativo en su actividad digestiva, particularmente en las enzimas tripsina y aminopeptidasa. Se piensa que el incremento en la actividad de éstas mejora el crecimiento y supervivencia de las larvas (Pedersen, 1993; Cahou y Zambonino Infante, 1995a,b).

Finalmente, según Naas et al. (1992) otra posible ventaja que puede presentarse al adicionar microalgas al cultivo es la pigmentación que adquiere el tracto digestivo del alimento vivo, permitiendo a las larvas de peces visualizar sus presas con mayor facilidad.

2.0 HIPOTESIS

1. El proporcionar iluminación en el fondo del estanque atraerá al alimento vivo hacia esa zona, lo cual reducirá la posible ingestión de burbujas de aire por los juveniles durante la alimentación.
2. La intensidad de la iluminación puede ser un factor que favorezca a los juveniles en la detección de sus presas.
3. Al impedir el acceso a la superficie se evitará la posible ingestión de burbujas en los juveniles que se alimentan en esta zona.
4. Los juveniles de *H. ingens* no necesitan tener acceso a la superficie para inflar inicialmente la vejiga natatoria.
5. El color del estanque tiene un efecto en el crecimiento y la supervivencia de los juveniles de *H. ingens*.

6. El cultivo en agua verde favorece al crecimiento y la supervivencia de los juveniles de *H. ingens*.

3.0 OBJETIVO

Evaluar el efecto de algunas variables ambientales del cultivo sobre el crecimiento y supervivencia en juveniles de caballito de mar *Hippocampus ingens*.

3.1 Objetivos particulares

Con base en el crecimiento y la supervivencia de los juveniles de *H. ingens*, los objetivos particulares son:

1. Evaluar el efecto de la iluminación en el fondo del estanque.
2. Evaluar el efecto de la intensidad de iluminación en la superficie.
3. Evaluar el efecto del acceso a la superficie una vez inflada la vejiga natatoria.
4. Evaluar el efecto del acceso a la superficie antes de inflar la vejiga natatoria.
5. Evaluar el efecto del color del estanque.
6. Evaluar el efecto de la adición de microalgas al cultivo.

4.0 MATERIALES Y METODOS

4.1 Origen de los juveniles

Los reproductores de caballito de mar *Hippocampus ingens* fueron obtenidos de Mazatlán, Sinaloa. Se introdujeron 3 machos y 3 hembras en estanques cilíndricos de 500L, y

1.20m de profundidad bajo las siguientes condiciones físico-químicas: temperatura: 24°C; salinidad: 34 ppm; oxígeno disuelto: 6 mg/L; y pH: 7.5. ‰

Los reproductores se alimentaron con mysidos congelados de la especie *Mysis relicta*, y se observó el comportamiento reproductivo para intentar determinar el tiempo de liberación de los juveniles. Por lo general la liberación se presentó al rededor de los 15 días después de observar el comportamiento de cortejo.

Para todos los experimentos que se describen a continuación, los juveniles fueron trasladados cuidadosamente a las unidades de cultivo una vez que fueron liberados del saco abdominal del macho. Se utilizaron recipientes de 1L para capturar a los juveniles cerca de la superficie, y un sifón de 1cm de diámetro con el mínimo flujo posible para capturar a los juveniles en la columna de agua. Se colocaron al rededor de 400 juveniles en cubetas de 15L con tapa para posteriormente ser introducidos a las unidades de cultivo experimental. Se mantuvieron en las cubetas el mínimo tiempo posible para evitar variaciones de temperatura y reducir el estrés.

4.2 Alimentación de los juveniles

Se utilizó el mismo protocolo de alimentación para todos los experimentos siguiendo las recomendaciones descritas por Ortega-Salas y colaboradores (1999), pero con algunas modificaciones: durante los primeros 7 días se alimentaron a los juveniles utilizando rotíferos (*Brachionus plicatilis*) enriquecidos con una emulsión rica en ácidos grasos (HUFA Enrich, Salt Creek, Salt Lake City, Utah, E.U.A) a una concentración de 5 a 15 rotíferos/ml. A partir del 8vo día se alimentaron utilizando artemia (*Artemia salina*) enriquecida con la misma emulsión a una concentración de 3 a 9 artemias/ml hasta el final del experimento.

Cada mañana se realizaban conteos de rotíferos y artemia para determinar la concentración de alimento en cada estanque y de esta manera añadir la cantidad necesaria para mantener la concentración dentro del rango establecido. Independientemente de la concentración de alimento, por la mañana se agregaban diariamente de 2 a 3 rotíferos/ml recién enriquecidos para proveer alimento fresco diariamente.

4.3 Cultivo del alimento vivo

4.3.1 Cultivo de rotíferos

Se instaló un sistema para cultivo de rotíferos de la especie *Brachionus plicatilis*, en dos columnas cilíndricas de 250 L con aireación y control de temperatura por medio de calentadores individuales de 100w con termostato, bajo las siguientes condiciones físico-químicas: (temperatura: 25 ± 1 °C, salinidad: 34 ± 1 ppm y pH: 7.8 ± 0.3). Se alimentaron una vez al día utilizando pasta de microalgas congeladas de la especie *Nannochloropsis sp.* (Instant Algae, Premium 3600, Reed Mariculture, CA, E.U.A). Una vez descongeladas se mantuvieron en refrigeración por un tiempo máximo de 3 meses, y se administraron a una razón de 98,000 cel/rot/día (Monay, 2002).

Para mantener las condiciones estables de pH y los niveles bajos de amonio, se realizaron recambios de agua del 50% diariamente, y del 90% cada cuarto día desinfectando las columnas con un baño de cloro comercial diluido al 5%.

Se cosechó diariamente la cantidad necesaria para mantener una concentración mínima de 5 rotíferos/ml en las unidades de cultivo. Se utilizó un cosechador con una malla de 70μ enjuagado por 10 minutos con agua de mar filtrada por UV y un cartucho de 10μ .

Diariamente se tomó una muestra de rotíferos de cada unidad de cultivo y se realizaron observaciones bajo el microscopio estereoscópico para hacer conteos del número de rotíferos y huevos. Con estos datos se intentó determinar la fertilidad y movilidad de la población en el cultivo.

Durante la última parte de experimentación, los rotíferos fueron proporcionados por el proyecto del cultivo de totoaba, *Totoaba macdonaldii*, de la Universidad Autónoma de Baja California, UABC, B.C. México.

4.3.2 Cultivo de artemia

Se instaló un sistema para el cultivo de artemia que consistió de 2 garrafones invertidos de 15 L, abiertos por la parte superior, con aireación y control de temperatura. Se utilizaron las siguientes condiciones físico-químicas para su cultivo: (temperatura: 25 ± 1 °C, salinidad: 34 ± 1 ppm, y pH: 7.8 ± 0.3).

Antes de eclosionar los quistes de artemia (Tipo Salt Creek, Salt Lake City, Utah, E.U.A) se hidrataron durante 1 hora en agua dulce con aireación para mantenerlos en suspensión. Los garrafones se obscurecieron por la parte superior para separar a los quistes no eclosionados de la artemia recién eclosionada.

Después de 24 horas de incubación, se cosechó la cantidad necesaria para mantener una concentración mínima de 3 artemias/ml en el medio de cultivo, utilizando un cosechador con una malla de 120μ .

Se realizaron conteos diarios bajo el microscopio estereoscópico para determinar el porcentaje de eclosión.

4.3.3 Cultivo de microalgas

La cepa de microalgas marina de la especie *Nannochloropsis oculata* que se utilizaron para este estudio fueron adquiridas de la colección de cultivos del cepario de microalgas del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

Los cultivos experimentales se realizaron en un laboratorio con temperatura controlada a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ mediante un sistema de aire acondicionado. El agua de mar que se utilizó para la preparación de los medios de cultivo pasó a través de filtros de $1\mu\text{m}$ y se irradió con lámparas de luz ultravioleta de 25 W. El medio que se utilizó fue el f/2 de Guillard (1975).

El cultivo de *Nannochloropsis oculata* se realizó a través de inóculos sucesivos partiendo de 10 ml, 200 ml (Erlenmeyer), 2 L (Fernbach), hasta llegar a 18 L (Garrafón) (Fig. 1). Los niveles pequeños (Erlenmeyer, Fernbach) se esterilizaron en autoclave a 121°C , 1.05 kg / cm^2 de presión durante 15 minutos.

Durante los primeros niveles de cultivo (Erlenmeyer, Fernbach) se colocó una cantidad de inóculo conocido, en condiciones asépticas, y los cultivos permanecieron con iluminación continua proporcionada por lámparas fluorescentes (Sylvania de 75 watts), suministrando una irradiancia de $132\ \mu\text{mol quanta / m}^2\text{ s}$, la cual se midió con un irradiómetro PAR modelo QSL-100 Biospherical Instruments Inc.

El siguiente nivel de cultivo (garrafón con 18 L), se realizó por triplicado, en donde el agua de mar se trató con hipoclorito de sodio en una razón de 0.25 ml / L y se dejaron reposar por 24 horas. Posteriormente se utilizó 0.1 ml / L de tiosulfato de sodio a una concentración de 26 g / L y aireación por 3 horas (Pruder y Bolton, 1978).

Posteriormente se empleó un inóculo conocido para sembrar el garrafón bajo condiciones asépticas. Se suministró iluminación continua proporcionada por lámparas fluorescentes (Sylvania de 75 watts), suministrando una irradiancia de $220 \mu\text{mol quanta} / \text{m}^2 \text{ s}$.

Se mantuvo una concentración promedio de $54.173 \times 10^6 \pm 21.790 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ en 3 garrafones durante 12 días de cultivo, con un pH promedio de 8.8 ± 0.63 .



Figura 2.- Sistema utilizado para el cultivo de *N. oculata*, a partir de inóculos sucesivos en vasos Erlenmeyer, Fernbach hasta garrafones de 18L.

4.4 Enriquecimiento

Tanto los rotíferos como la artemia fueron enriquecidos con una emulsión rica en ácidos grasos (HUFA Enrich, Salt Creek, Salt Lake City, Utah, E.U.A), con una proporción de DHA:EPA de 9:2. Se siguieron las especificaciones recomendadas por el proveedor (Tabla 1).

Tabla I.- Protocolo de enriquecimiento para rotíferos y artemia de acuerdo a las especificaciones del producto.

	Enriquecedor mg/L	Densidad de organismos ml
Para Rotíferos	125	de 200 a 500
Para Artemia	125	de 100 a 200

La emulsión se homogeneizó en 1L de agua de mar filtrada por 10μ y se añadió a los rotíferos y artemia cosechados en un volumen de 20L con aireación. Los rotíferos y artemia se enriquecieron por un período de 12 horas.

Posteriormente se enjuagaron los rotíferos enriquecidos y la artemia enriquecida con agua de mar filtrada por 10μ durante 5 minutos. Se retiraron los restos de la emulsión suspendida en la superficie utilizando una red de acuario.

4.5 Diseño experimental

4.5.1 El efecto de la iluminación en superficie y en el fondo.

Se utilizó un sistema abierto que cuenta con 12 estanques circulares de fibra de vidrio de color gris oscuro con capacidad de 200 L, con una profundidad de 40cm (Fig. 4). El sistema

cuenta con un filtro presurizado de lecho fluidizante, bomba, filtro de arena para sólidos, filtro UV de 25w, filtro de cartucho de 10 μ y un calentador con termostato digital de 1000w. Se utilizó una columna de intercambio de gases por la cual circuló el agua al llenar inicialmente los estanques y al realizar los recambios. No se introdujo aireación ya que el agua de entrada presentaba suficiente oxígeno disuelto y se realizó un recambio del 100% al día con agua recirculada.

Se colectaron al azar 1,800 juveniles de *H.ingens* recién expulsados del saco abdominal. La longitud promedio de los juveniles fué de 7.5782 \pm 0.5 mm (n=20); y un peso seco promedio de 0.132 \pm 0.04 mg (n=50).

Se introdujeron 300 juveniles en cada estanque a razón de 1.5 juveniles/L para evaluar el efecto de la iluminación en superficie y en el fondo. Se realizaron 2 tratamientos por triplicado: En el tratamiento 1 se colocaron 2 focos de luz fluorescente de 75w en la parte superior de cada estanque y se mantuvieron tapados con una cubierta de plástico transparente para permitir la iluminación en la superficie. En el tratamiento 2 se colocó una luz sumergible fluorescente de 15w, el cual proporciona una cantidad de luz similar a la de un foco convencional de 75w, en el fondo de cada estanque y se mantuvieron tapados con una cubierta de plástico oscuro para evitar la iluminación en la superficie (Fig. 3).

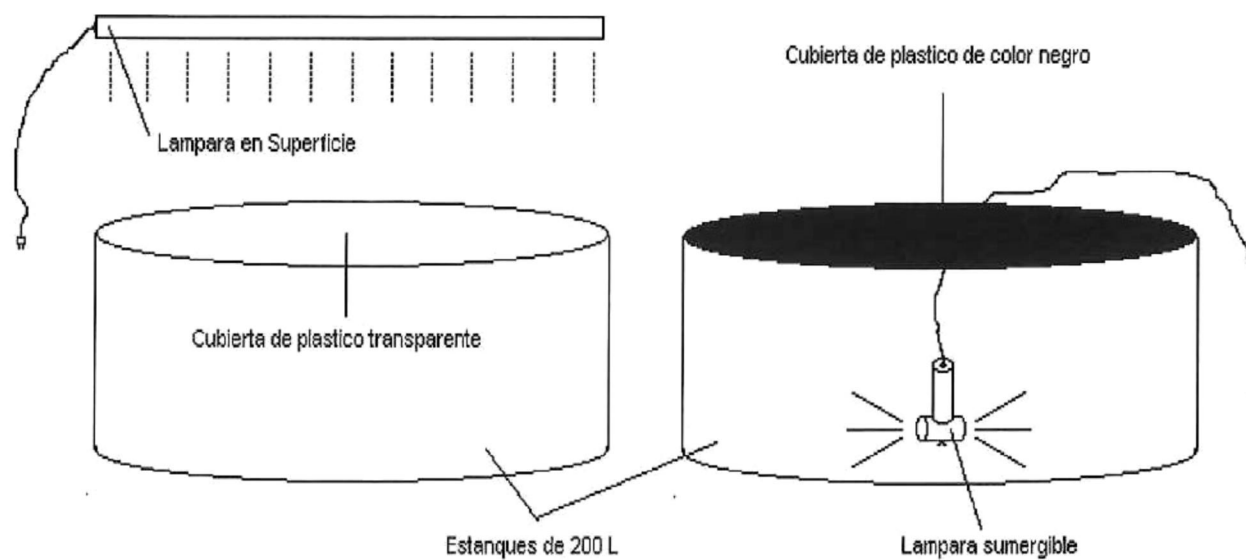


Figura 3.- Diagrama de la iluminación en la superficie y en el fondo de los estanques.



Figura 4.- Sistema de cultivo utilizado para el efecto de la iluminación en el fondo mostrando el filtro de lecho fluidizante, filtro de arena y filtro UV.

Durante el experimento se retiraron diariamente los organismos muertos y se contaron. Así mismo se realizaron mediciones diarias de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto. Las mediciones de pH se realizaron cada 3er día, y las mediciones de nitritos, nitratos y amonio se realizaron semanalmente utilizando un kit de reactivos de marca HACH.

4.5.2 El efecto de la intensidad de luz y acceso a la superficie del agua.

Se utilizó un sistema abierto que cuenta con 2 estanques rectangulares de fibra de vidrio de color blanco con capacidad de 700 L c/u, una columna de intercambio de gases por la cual circuló el agua de mar antes de entrar al sistema, bomba, filtro UV de 25w, filtro de 10 μ , y dos calentadores con termostato digital de 500w. Para cada estanque, el agua fué circulada a través de la columna de intercambio de gases y se realizó un recambio del 100% al día. No se utilizó aireación ya que el agua de entrada presentaba suficiente oxígeno disuelto.

Se colectaron al azar 200 juveniles de *H.ingens* recién expulsados del saco abdominal. De estos se seleccionaron 144 juveniles que se encontraban en la columna de agua (no flotando en la superficie). La longitud promedio de los juveniles fué de 7.64 ± 0.27 mm (n=20).

Se colocaron 6 cubetas de 4 L en cada estanque de 700 L y se introdujeron 12 juveniles en cada cubeta a una razón de 3 juveniles/L. Se perforaron las cubetas por ambos lados con aperturas rectangulares de 8x10 cm, y se colocaron mallas de 300 μ para permitir el flujo de agua y alimento para todos los tratamientos. Dentro de cada cubeta se colocó un racimo de monofilamentos de nylon finos simulando pastos marinos como sustrato (Fig. 5).

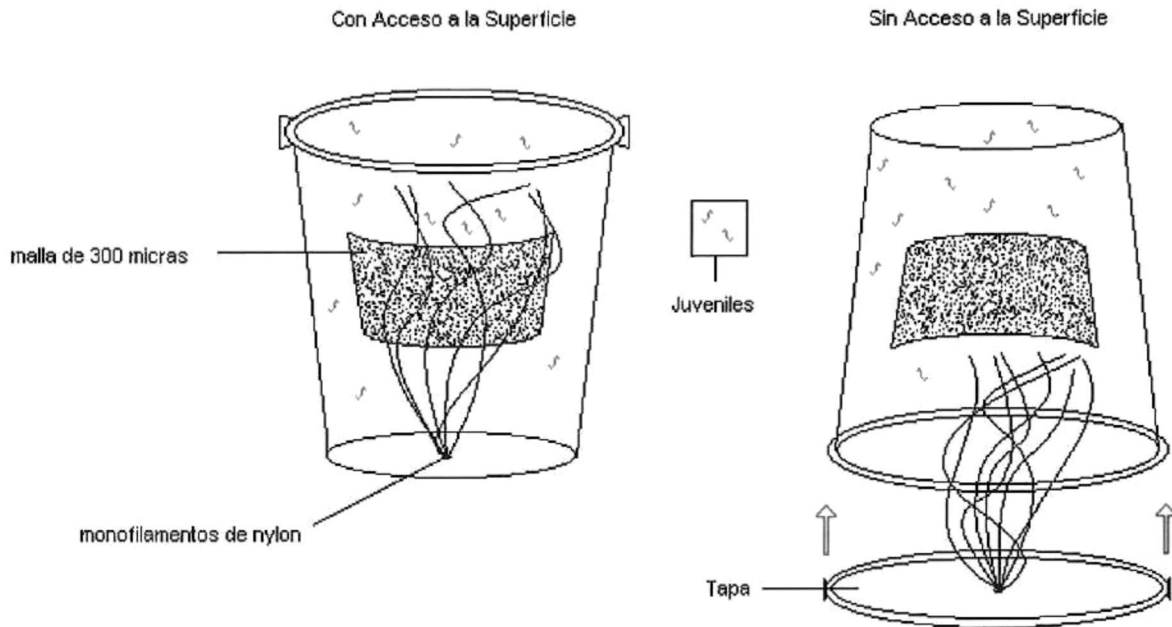


Figura 5.- Diagrama de las cubetas utilizadas en los experimentos de acceso a la superficie del agua e intensidad de luz, y acceso a la superficie antes de inflar la vejiga natatoria.

Para evaluar el efecto de la intensidad de luz y acceso a la superficie se utilizaron 4 tratamientos cada uno por triplicado. En el tratamiento 1, se utilizó iluminación alta y se permitió el acceso a la superficie (IACA); en el tratamiento 2, se utilizó iluminación alta y se impidió el acceso a la superficie (IASA); en el tratamiento 3, se utilizó iluminación baja y se permitió el acceso a la superficie (IBCA); y en el tratamiento 4, se utilizó iluminación baja y se restringió el acceso a la superficie (IBSA).

Para impedir el acceso a la superficie se colocaron tapas en las cubetas y se mantuvieron sumergidas, y para permitir el acceso se colocaron las cubetas abiertas y flotando en la superficie (Fig. 5).

En el tratamiento 1 y 2 se colocaron 2 focos de luz fluorescente de 75w en la parte superior del estanque para permitir la iluminación directa.

En el tratamiento 3 y 4 se fijó una cubierta de plástico de color negro alrededor del estanque para crear un ambiente con iluminación de baja intensidad.

4.5.3 El efecto del acceso a la superficie antes de inflar la vejiga natatoria.

Utilizando el mismo sistema de cultivo que el mencionado en la sección 3.5.2, se colectaron al azar 200 juveniles de *H.ingens* recién expulsados del saco abdominal. A simple vista se seleccionaron individualmente 60 juveniles que aún no presentaran aire en la vejiga natatoria utilizando una pipeta desechable de 4ml con un corte en la punta adecuado al tamaño de los juveniles. La longitud promedio fué de 7.02 ± 0.92 mm, (n=20).

Se introdujeron 10 juveniles en cubetas de 4L a una densidad de 2.5 juveniles/L y se colocaron 6 cubetas en un estanque de 700 L con un recambio del 100% al día.

Para evaluar el efecto del acceso a la superficie antes de inflar la vejiga natatoria, se utilizaron 2 condiciones cada una por triplicado. En la primera se permitió el acceso a la superficie (tratamiento 1), y en la segunda se restringió el acceso a la superficie con el mismo sistema mencionado en la sección 3.5.2 (tratamiento 2).

4.5.4 El efecto del color en el estanque.

Se instaló un sistema cerrado en el cual se utilizaron como estanques 4 tiboires de 200 L de los cuales 2 eran de color azul y 2 de color blanco (Fig. 6). Este sistema contó con un filtro de UV de 25w, filtro de 10μ y calentadores individuales de titanio con termostato de 100w. Se utilizó una columna de intercambio de gases por la cual circuló el agua al llenar inicialmente los estanques y al realizar los recambios. En cada estanque se colocó una manguera de aireación sin difusor fijada al fondo y cerca de la pared con el flujo de aire restringido para crear una circulación lenta. De esta manera se evitó producir burbujas chicas que pudieran ser ingeridas por los juveniles. Para proporcionar iluminación, se colocaron 2 lámparas de luz fluorescente cada una con 2 focos de 75w.

Se colectaron al azar 1,200 juveniles de *H.ingens* recién expulsados del saco abdominal, los cuales presentaron una longitud promedio de 7.87 ± 0.47 mm, (n=20).

Se introdujeron 300 juveniles en cada estanque a una densidad de 1.5 juveniles/L, y se mantuvieron con un recambio de agua del 10% al día. Para evaluar el efecto del color en el estanque, se compararon 2 tratamientos cada uno por duplicado: en el tratamiento 1, se utilizaron los estanques de color blanco y en el tratamiento 2, los estanques de color azul.

Para comparar la iluminación dentro de los estanques, se utilizó un irradiómetro QSL-100 (Biospherical Instruments) con un sensor de 4", y se tomaron mediciones al centro y en los bordes de los estanques a una profundidad media.



Figura 6.- Estanques azules y blancos de 200L utilizados para el efecto del color del estanque.

4.5.5 El efecto del cultivo en agua verde.

Se instaló un sistema cerrado en el cual se utilizaron como estanques 6 tibores azules de 200 L (Fig. 7). El sistema constaba de un filtro UV de 25w, filtro de 10μ y calentadores individuales de titanio con termostato de 100w. Se utilizó una columna de intercambio de gases por la cual circuló el agua al llenar inicialmente los estanques y al realizar los recambios. En cada estanque se colocó una manguera de aireación sin difusor fijada al fondo y cerca de la pared con el flujo de aire restringido para crear una circulación lenta. Para proporcionar iluminación, se colocaron 2 lámparas de luz fluorescente cada una con 2 focos de 75w.

Se colectaron al azar 1,800 juveniles de *H.ingens* recién expulsados del saco abdominal, con una longitud promedio de 6.81 ± 0.29 mm, (n=20).

Se introdujeron 131 juveniles en cada estanque a una densidad de 0.7 juveniles/L y se mantuvieron con un recambio de agua del 10% al día. Para evaluar el efecto del cultivo en agua verde, se realizaron 2 tratamientos cada uno por triplicado: en el tratamiento 1, se utilizó agua de mar filtrada, y en el tratamiento 2, se utilizó agua de mar filtrada con la adición de microalgas de la especie *Nannochloropsis oculata*. Se realizaron conteos diarios de microalgas en cada estanque para mantener una concentración de 700,000 cel/ml.



Figura 7.- Estanques azules de 200L utilizados para el efecto del cultivo en agua verde.

4.6 Condiciones generales de cultivo

Se consideró una densidad máxima de cultivo de 3 juveniles/L, tomando en cuenta que Woods, (2002) encontró que el crecimiento y la supervivencia se redujo significativamente a una densidad de 5 juveniles/L comparado con densidades de 1 y 2 juveniles/L para *H. abdominalis*.

En todos los experimentos se intentó mantener las siguientes condiciones físico-químicas: temperatura: 24°C, salinidad: 34 ppm y pH =7.5, a excepción del último experimento en el cual se elevó gradualmente la temperatura de 24° a 26°C una razón de 0.5°C al día.

En todos los experimentos se utilizó una columna de intercambio de gases en el sistema de alimentación de agua para intentar reducir el oxígeno disuelto en el agua.

Se desinfectaron inicialmente todos los estanques de cultivo añadiendo 0.18 ml/L de cloro comercial y neutralizando con 26.7mg/L de tiosulfato pentahidratado y suficiente aireación.

La temperatura, salinidad y oxígeno disuelto se registró utilizando un medidor digital con electrodo de marca YSI modelo 85/10 FT (Yellow Springs, Ohio, E.U.A), y el pH se midió utilizando un potenciómetro con electrodo de marca Thermo Orion modelo 410 (E.U.A).

Se midieron los niveles de amonio, nitritos y nitratos semanalmente utilizando un kit de reactivos de marca HACH Salt water master kit, (Loveland, Colorado, E.U.A) de acuerdo a lo descrito por Lazo et al. (2000). Se sifonearon diariamente los estanques para eliminar los detritos, sacar a los organismos muertos y mantener la calidad del agua en condiciones óptimas.

4.7 Crecimiento y supervivencia

Para determinar el crecimiento se realizaron mediciones de longitud en cada estanque al inicio (n=20) y al final de cada experimento (todos los juveniles sobrevivientes). Las mediciones

de longitud se realizaron bajo el microscopio estereoscópico utilizando las unidades del ocular. Para determinar la longitud total se midió la distancia desde la corona hasta la punta de la cola extendida, y posteriormente se transformaron a milímetros utilizando las tablas de calibración del microscopio.

Para determinar el peso seco se colocaron de 2 a 10 juveniles de *H. ingens* en charolas de aluminio con tapas perforadas (Fig. 8) y se introdujeron al horno de desecación a 60°C por un mínimo de 24 horas o hasta obtener un peso constante. Las mediciones de peso seco se tomaron utilizando una báscula electrónica de 5 dígitos decimales marca A&D modelo ER-182^a, Japón.



Figura 8.- Juveniles de *H. Ingens* en charolas de aluminio antes de introducirse al horno de desecación para la determinación del peso seco.

Para obtener la supervivencia a través del tiempo se realizaron conteos diariamente de los organismos muertos y se determinó la mortalidad acumulativa.

La supervivencia final se obtuvo restando el número total de organismos muertos del número inicial para cada tratamiento.

4.8 Análisis estadístico

Se hicieron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas por Kolmogorov Smirnov para todos los experimentos. Los análisis se presentan en la Tabla II.

Tabla II. Análisis estadístico aplicado a todos los experimentos para las variables de supervivencia, longitud y peso seco.

Experimentos	Normalidad y Homogeneidad de varianzas	Transformación	Estadística	Prueba:		
				Supervivencia	Longitud	Peso seco
La iluminación en el fondo	cumple	-	Paramétrica	t de Student	t de Student	-
Intensidad de iluminación y acceso a la superficie	no cumple	$\text{Log}(x+1)$	Paramétrica	Anova 2-vías	datos insuficientes	-
Acceso a la superficie antes de inflar la vegiga natatoria	no cumple	-	No Paramétrica	Suma de rangos de Mann Whitney	datos insuficientes	-
El color del estanque	cumple	-	Paramétrica	t de Student	datos insuficientes	-
La adición de microalgas: al día 7	no cumple	Ln	Paramétrica	t de Student	t de Student	-
La adición de microalgas: al día 12	cumple	-	Paramétrica	t de Student	t de Student	t de Student

En el experimento de intensidad de iluminación y acceso a la superficie se transformaron los datos de supervivencia para cumplir con la normalidad utilizando la fórmula logarítmica

$\text{Log}(x+1)$ de acuerdo a lo descrito por Snedecor et al. (1989) (Tabla II). La transformación se utilizó para obtener una igualdad de varianzas, ya que algunos de los valores fueron igual a cero . Se realizó una Anova de 2 vías.

En el experimento de adición de microalgas se transformaron los datos de longitud al día 7 a logaritmo natural para cumplir con la normalidad y homogeneidad de varianzas. De esta manera se estabilizó la varianza de acuerdo a lo descrito por Steel et al. (1980) (Tabla II).

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SigmaStat para Windows Versión 2.0 (1992-1995) y con el programa STATISTICA versión 5.0.

Todos los resultados son presentados como: promedio \pm desviación estándar.

5.0 RESULTADOS

5.1 El efecto de la iluminación en superficie y en el fondo.

El presente experimento tuvo una duración de 6 días, debido a la alta mortalidad presentada. A partir del tercer día de cultivo, se presentó un efecto venturi en las válvulas del control de flujo en todos los estanques ocasionando que se formaran microburbujas en el agua de entrada. Este proceso aparentemente causó en los juveniles una ingestión masiva de microburbujas hacia el tracto digestivo observadas bajo el microscópio, lo cual causó que flotaran en la superficie de los estanques y eventualmente murieran. Adicionalmente se observó una concentración alta de ciliados en el fondo de los estanques alimentándose de los organismos muertos y hasta de organismos vivos con problemas de flotabilidad.

5.1.1 Crecimiento y supervivencia

5.1.1.1 Longitud

De acuerdo al análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas $P=0.631$ entre las longitudes de ambos tratamientos 7.54 ± 0.58 mm y 7.42 ± 0.6 con iluminación en el fondo e iluminación en superficie respectivamente (Tabla III, Fig. 9).

Tabla III.- Prueba t para muestras independientes sobre el efecto de la longitud para los tratamientos de luz en fondo y luz en superficie.

Fuente de Variación	Media	Desviación Estándar	N	poder α	t	Grados de Libertad (g.l.)	Nivel de Significancia (P)
Longitud:							
Luz en Fondo	7.541	0.586	9	0.05	0.486	27	0.631
Luz en Superficie	7.425	0.599	20	0.05			

* Significativo ($P < 0.05$)

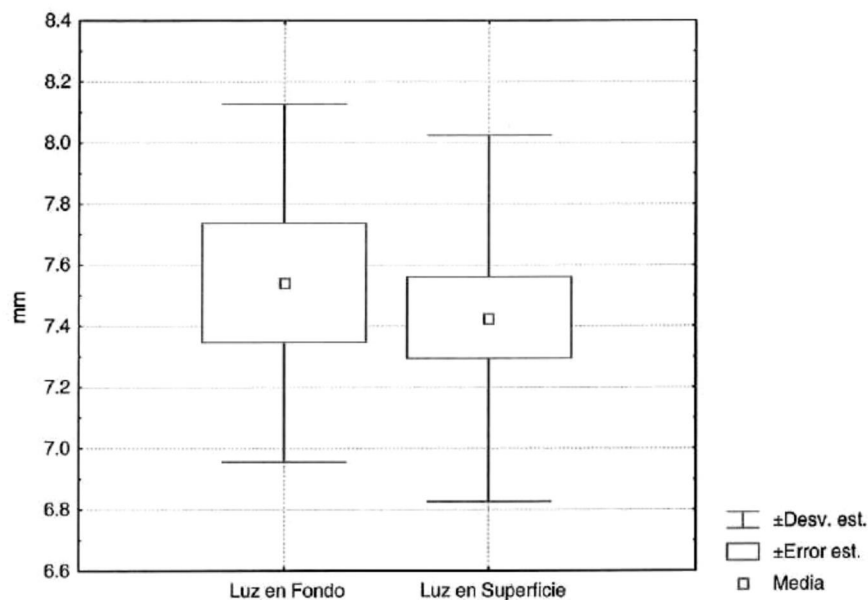


Figura 9.- Longitud promedio en milímetros para los tratamientos de luz en el fondo y luz en la superficie.

5.1.1.2 Supervivencia

Así mismo, no se encontraron diferencias significativas $P=0.379$ entre el porcentaje de supervivencia de ambos tratamientos 1 ± 0.883 y 2.22 ± 1.95 con iluminación en el fondo e iluminación en superficie respectivamente (Tabla IV, Fig. 10).

Tabla IV.- Prueba t para muestras independientes sobre el efecto del porcentaje de la supervivencia para los tratamientos de luz en fondo y luz en superficie.

Fuente de Variación	Media	Desviación Estándar	N	poder α	t	Grados de Libertad (g.l.)	Nivel de Significancia (P)
---------------------	-------	---------------------	---	----------------	---	---------------------------	----------------------------

% de Supervivencia:

Luz en Fondo	1.000	0.883	3	0.05	-0.988	4	0.379
Luz en Superficie	2.223	1.954	3	0.05			

* Significativo ($P < 0.05$)

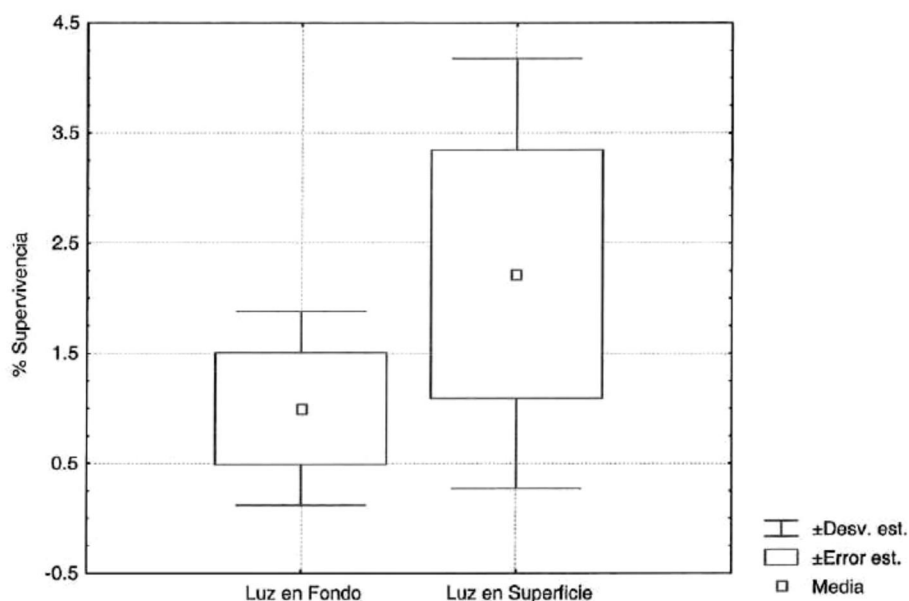


Figura 10.- Porcentaje de Supervivencia al día 6 para los tratamientos de luz en el Fondo y luz en la superficie.

No fué posible medir la supervivencia a lo largo del tiempo debido a la dificultad de ubicar a los organismos muertos con el color del estanque, y sólo se midió la supervivencia final.

5.1.2 Parámetros físico-químicos

La temperatura promedio a lo largo del experimento fué de $24.3 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, con una salinidad de 34.9 ± 0.04 ppm, un valor de oxígeno disuelto de 6.07 ± 0.05 mg/l, y un pH de 7.82 ± 0.02 (Anexos: Figs. 27, 28, 29 y 30).

Los niveles de amonio, nitritos y nitratos registrados fueron menores a 0.6 mg/l, 0.10 mg/l, y 0.15 mg/l respectivamente, para todos los tratamientos. Estos valores se encuentran dentro

de los rangos aceptables para el cultivo de peces marinos de acuerdo al manual de HACH Salt Water Master Kit, descrito por Darula, K.E. (2000).

5.2 La intensidad de luz y acceso a la superficie.

El presente experimento tuvo una duración de 6 días debido a la alta mortalidad presentada.

El 100% de los juveniles utilizados en este experimento lograron inflar satisfactoriamente la vejiga natatoria logrando una posición vertical en la columna de agua. Sin embargo, en ambos tratamientos se observó una flotabilidad positiva en los juveniles que fué incrementando con el tiempo hasta que emergían hacia la parte superior del estanque y eventualmente se hundían hacia el fondo en donde morían aparentemente por inanición. Se observó la presencia de exceso de gas en la vejiga natatoria de los juveniles que presentaban una flotabilidad positiva (Figs. 11a y b).

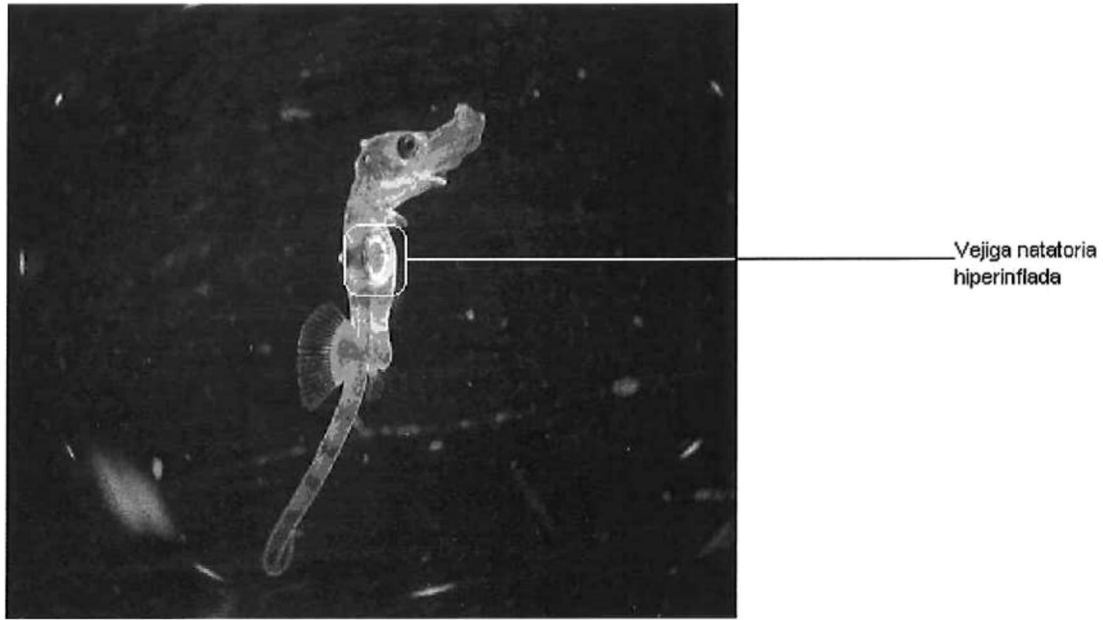


Figura 11a.- Juvenil de *H. ingens* a los 2 días de vida libre con la vejiga natatoria hiperinflada, causando una flotabilidad positiva al organismo.

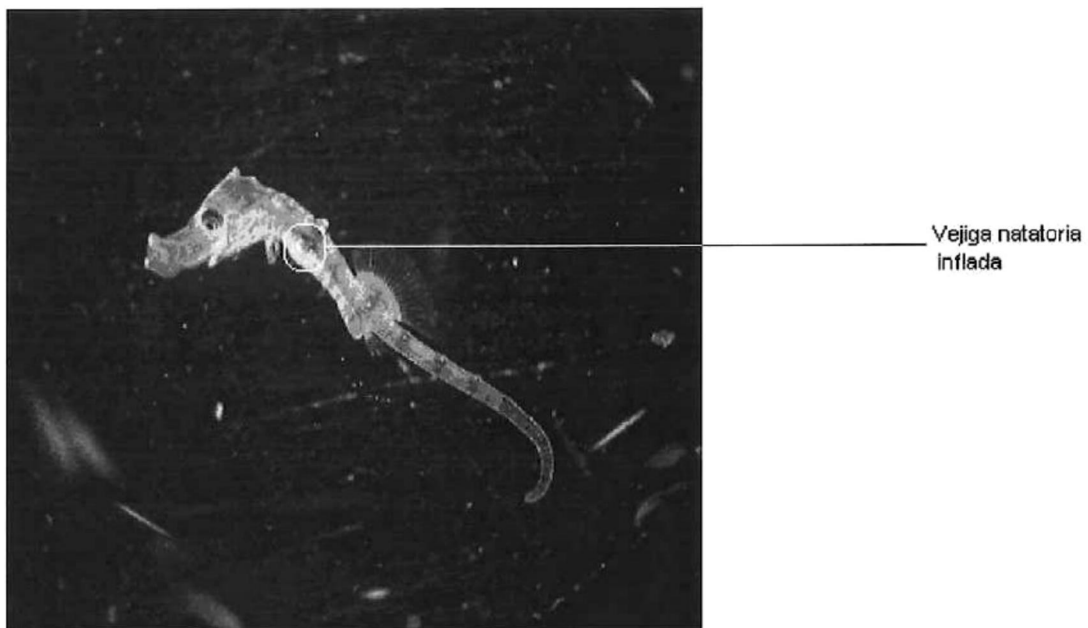


Figura 11b.- Juvenil de *H. ingens* a los 2 días de vida libre con la vejiga natatoria inflada de manera normal, logrando una flotabilidad neutra.

5.2.1 Crecimiento y supervivencia

5.2.1.1 Longitud

Debido a la alta mortalidad presentada, no fué posible obtener suficientes muestras para registrar la longitud que permitiera hacer una comparación estadística. Los valores finales promedio fueron: (Tabla V).

Tabla V. Longitudes promedio al día 6 de cultivo en juveniles de *H. ingens* para los tratamientos de iluminación alta con acceso (IACA), iluminación alta sin acceso (IASA), iluminación baja con acceso (IBCA) e iluminación baja sin acceso (IBSA).

Tratamiento	Longitud (mm)	Número total
IACA	-	0
IASA	7.72	5
IBCA	7.21	1
IBSA	7.51	1

5.2.1.2 Supervivencia

No se encontró una diferencia significativa ($P=0.888$) entre los valores promedio para el factor A: iluminación alta e iluminación baja. No se encontró una diferencia significativa ($P=0.466$) entre los valores promedio para el factor B: abierto (con acceso) y cerrado (sin acceso) a la superficie. Así mismo, no se encontró una interacción significativa ($P=0.466$) entre ambos factores (Tabla VI, Fig. 12).

Tabla VI- Análisis de varianza de dos vías del efecto del porcentaje de la supervivencia sobre los factores de intensidad de luz y acceso a la superficie.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados (S. C.)	Grados de Libertad (g. l.)	Cuadrado Medio (C. M.)	F	Nivel de Significancia
Factor A: Iluminación	0.00801	1	0.00801	0.0212	0.888
Factor B: Acceso	0.221	1	0.221	0.585	0.466
Iluminación x Acceso	0.221	1	0.221	0.585	0.466
Residual	3.026	8	0.378		
Total	3.477	11	0.316		

* Significativo ($P < 0.05$)

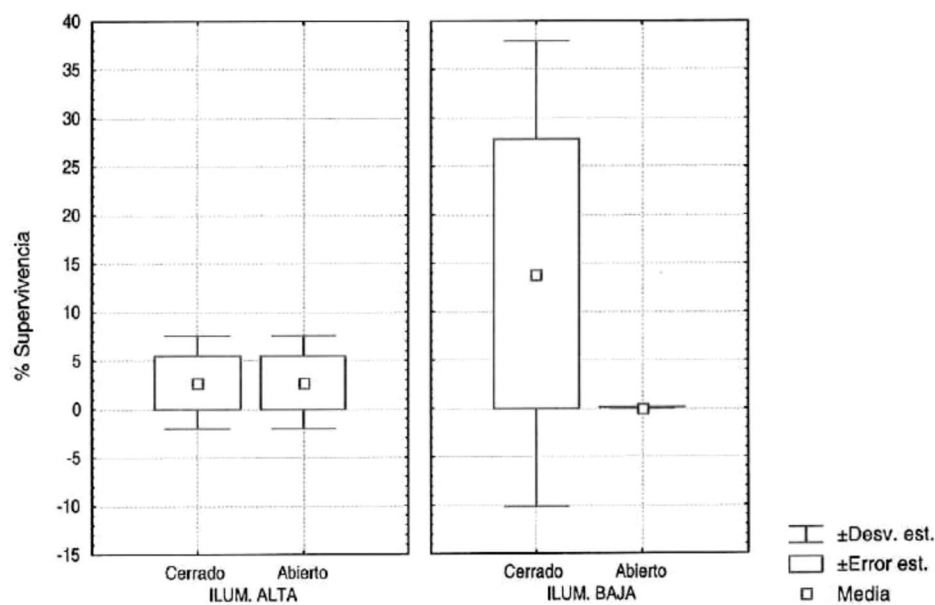


Figura 12.- Porcentaje de supervivencia promedio al día 6 para los tratamientos con iluminación alta abierto y cerrado, e iluminación baja abierto y cerrado.

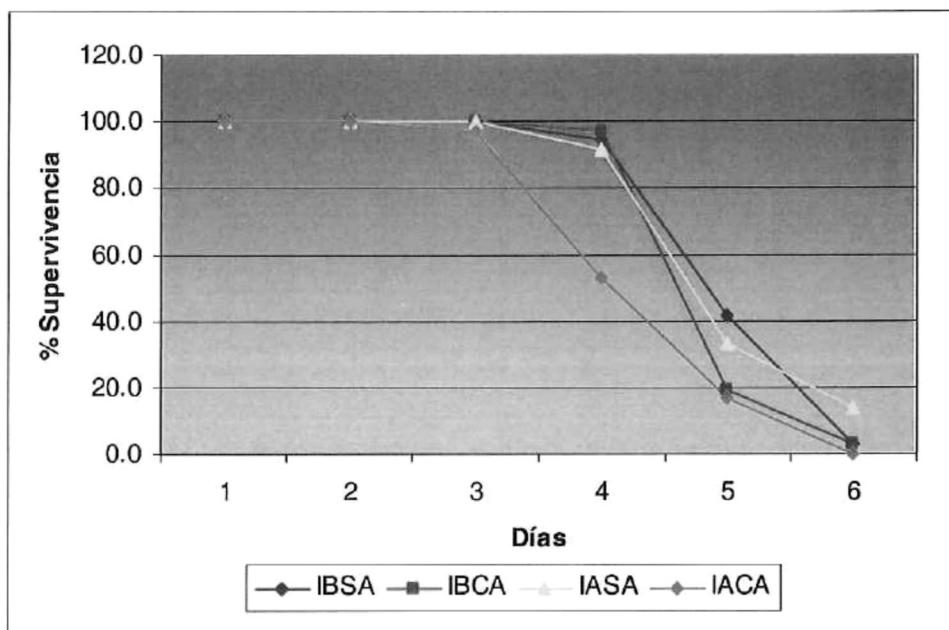


Figura 13.- Porcentaje de supervivencia a lo través del tiempo para los tratamientos de iluminación baja sin acceso (IBSA), iluminación baja con acceso (IBCA), iluminación alta sin acceso (IASA) e iluminación alta con acceso (IACA).

En los tratamientos (IBSA), (IBCA) y (IASA), la mayor mortalidad se presentó a partir del día 4 al día 5 de cultivo, a excepción del tratamiento (IACA) que se presentó a partir del día 3 al día 5 (Fig.13).

5.2.2 Parámetros físico-químicos

La temperatura promedio a lo largo del tiempo fué de 24.2 ± 0.13 °C, con una salinidad de 35 ppm, y un pH de 7.96 ± 0.01 (Anexos: Figs. 31, 32, 33 y 34). Los valores de oxígeno disuelto al circular el agua a través de la columna de intercambio de gases fueron: 5.85 mg/l para

todos los tratamientos y 6.26 mg/l para el agua de mar sin tratamiento, lo que representó una reducción de sólo 0.41 mg/l.

Los niveles de amonio, nitritos y nitratos registrados fueron menores a 0.6 mg/l, 0.10 mg/l, y 0.15 mg/l respectivamente para todos los tratamientos.

5.3 El acceso a la superficie antes de inflar la vejiga natatoria.

El presente experimento tuvo una duración de 6 días debido a la alta mortalidad presentada.

Los juveniles de *H. ingens* que no tuvieron acceso a la superficie durante la primera semana de cultivo no lograron inflar la vejiga natatoria, mientras que los juveniles que si tuvieron acceso, sólo el 13% logró inflar la vejiga satisfactoriamente

5.3.1 Crecimiento y Supervivencia

5.3.1.1 Longitud

Debido a la alta mortalidad presentada, no fué posible obtener suficientes datos de longitud para compararse estadísticamente, y para el día 6 de cultivo solamente sobrevivió un individuo en el tratamiento con acceso a la superficie, con una longitud final de 7.51 mm.

5.3.1.2 Supervivencia

Las medias no cumplieron con la normalidad, y de acuerdo al análisis de Mann-Whitney no existe una diferencia significativa ($P=0.7$) entre las medianas de los tratamientos (25% = 0,0, y 75% = 7.5,0) con acceso y sin acceso a la superficie respectivamente (Tabla VII, Fig. 14).

Tabla VII.- Prueba de suma de rangos de Mann-Whitney sobre el efecto del porcentaje de la supervivencia para los tratamientos con acceso y sin acceso a la superficie.

Fuente de Variación	Mediana	25%	75%	N	Faltantes	P
% de Supervivencia:						
Con Acceso	0.000	0.000	7.500	3	0	0.70
Sin Acceso	0.000	0.000	0.000	3	0	

* Significativo ($P < 0.05$)

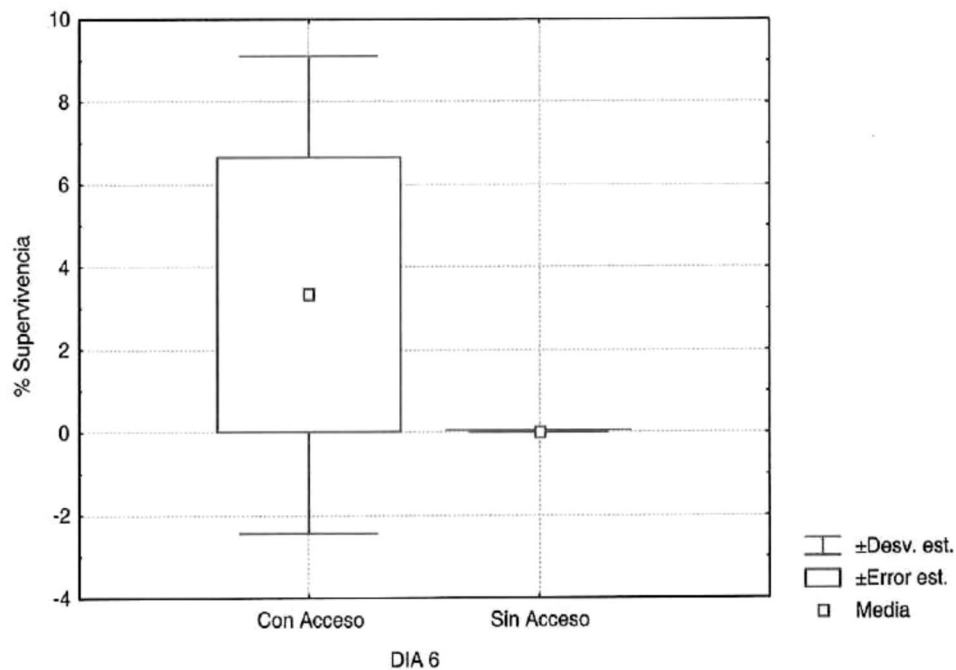


Figura 14.- Porcentaje de supervivencia promedio al día 6 para los tratamientos con acceso y sin acceso a la superficie.

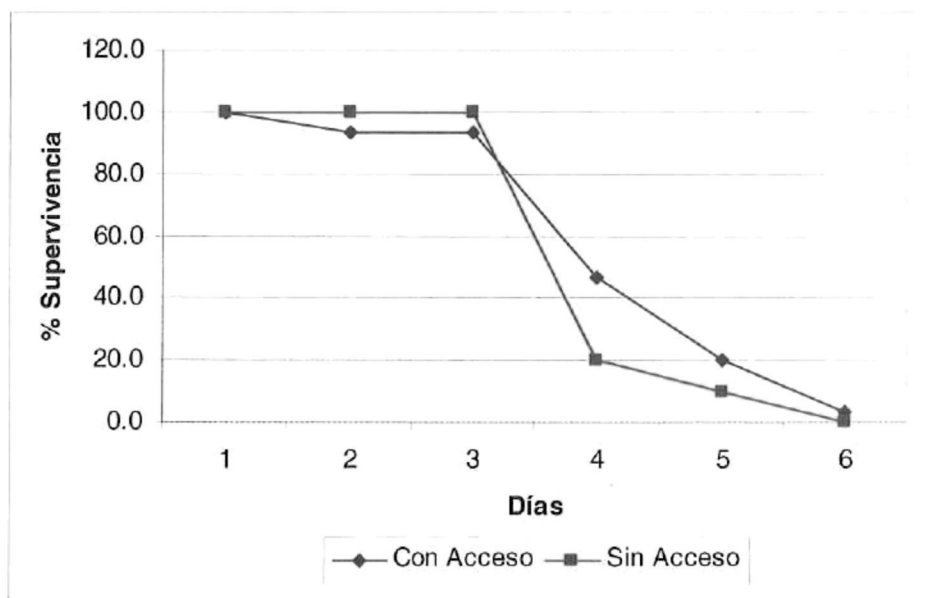


Figura 15.- Porcentaje de supervivencia promedio a lo largo del tiempo para los tratamientos con acceso y sin acceso a la superficie.

En ambos tratamientos, la mayor mortalidad se presentó a partir del día 3 al día 4 de cultivo (Fig.15) .

5.3.2 Parámetros físico-químicos.

La temperatura promedio a lo largo del tiempo fué de 23.6 ± 0.23 °C, con una salinidad de 34.8 ± 0.11 ppm, y un pH de 7.75 ± 0.03 (Anexos: Fig. 35, 36, 37 y 38). Los valores de oxígeno disuelto al circular el agua a través de la columna de intercambio de gases fueron: 6.36 mg/l para todos los tratamientos y 6.45 mg/l para el agua de mar sin tratamiento, lo que representó una reducción de sólo 0.09 mg/l.

Los niveles de amonio, nitritos y nitratos registrados fueron menores a 0.6 mg/l, 0.10 mg/l, y 0.15 mg/l respectivamente para todos los tratamientos.

5.4 El color del estanque.

El presente experimento tuvo una duración de 16 días. Se observó que los juveniles que lograron sobrevivir utilizaban la cola para sujetarse de cualquier superficie disponible a partir del día 20.

5.4.1 Crecimiento y supervivencia

5.4.1.1 Longitud

No se obtuvieron longitudes finales para el tratamiento en estanques azules debido a que se presentó una mortalidad total el décimo día, y no era posible medir correctamente a los individuos muertos ya que en el proceso de descomposición tienden a encogerse de tamaño, principalmente de la cola.

La longitud final promedio para el tratamiento en estanques blancos fué de $14.12 \text{ mm} \pm 2.34$.

5.4.1.2 Supervivencia

Para el día 16, se encontró una diferencia significativa ($P= 0.006$) en el porcentaje de supervivencia entre los caballitos cultivados en estanques blancos y azules, con un porcentaje de supervivencia final de $2.17 \pm 0.24 \%$ y 0% respectivamente (Tabla VIII, Fig. 16).

Tabla VIII.- Prueba t para muestras independientes sobre el efecto del porcentaje de la supervivencia para los tratamientos del color del estanque: azul y blanco.

Fuente de Variación	Media	Desviación Estándar	N	poder α	t	Grados de Libertad (g.l.)	Nivel de Significancia (P)
% de Supervivencia:							
Estanque Blanco	0.000	0.000	2	0.050	-13	2	0.006 *
Estanque Azul	2.167	0.236	2	1.000			

* Significativo ($P < 0.05$)

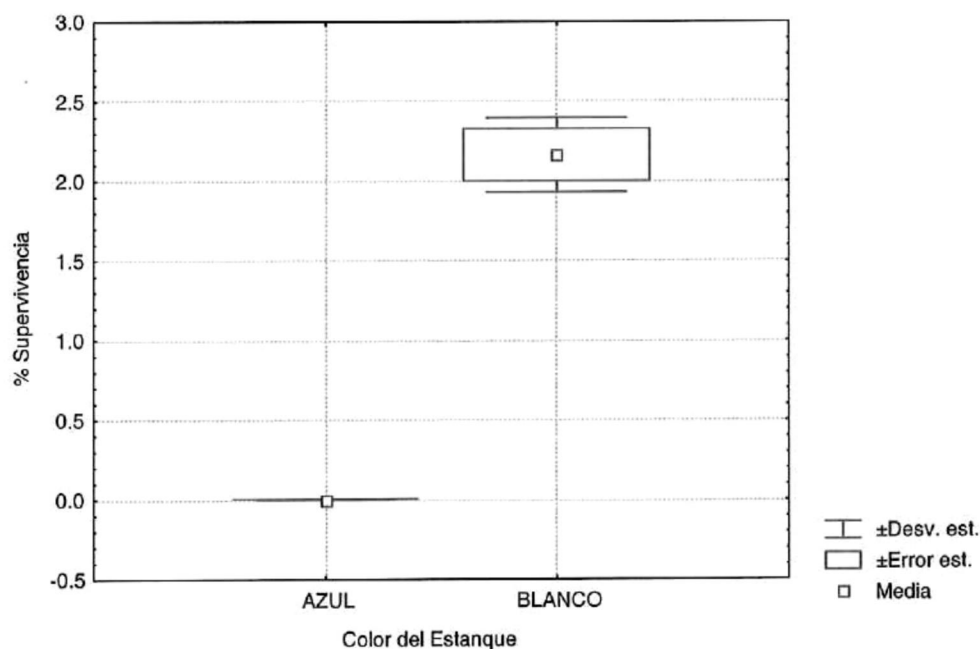


Figura 16.- Porcentaje de supervivencia promedio al día 16 para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco.

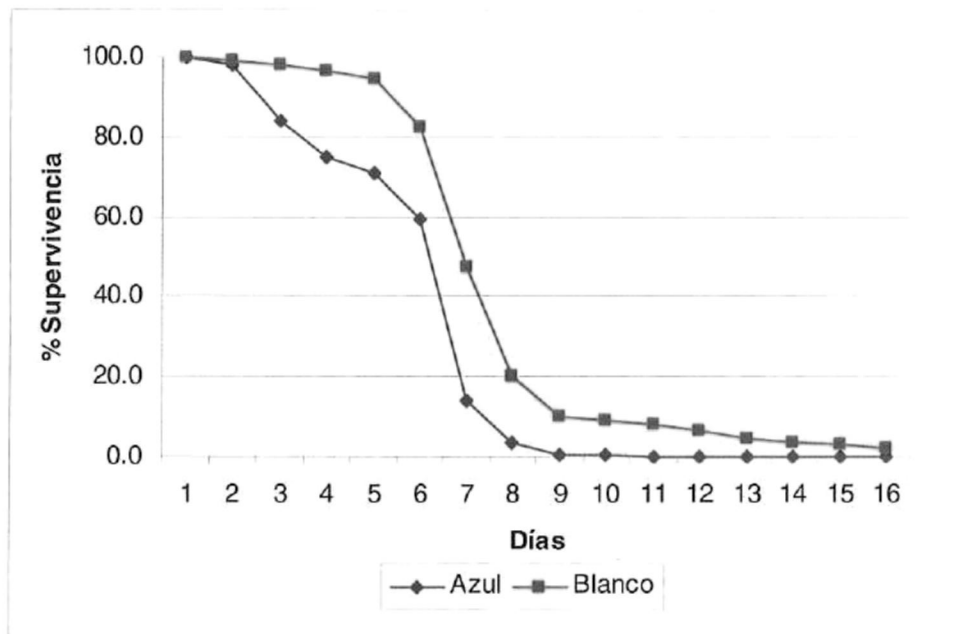


Figura 17.- Porcentaje de supervivencia promedio a lo largo del tiempo para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco.

En ambos tratamientos, la mayor mortalidad se presentó a partir del día 4 al día 8 de cultivo (Fig. 17)

5.4.2 La iluminación de acuerdo al color del estanque

Se tomaron mediciones de iluminación para determinar la cantidad de luz presente dentro de los estanques de color blanco y azul respectivamente, en el centro y en el borde de los estanques a una profundidad media (Tabla IX).

Tabla IX. Valores de iluminación dentro de los estanques de color blanco y azul, al centro y al borde de los estanques a una profundidad media en $q/s/cm^2 \times 10^4$.

	ESTANQUES AZULES		ESTANQUES BLANCOS	
	1	2	3	4
Al centro $q/s/cm^2$	0.65	0.65	1.9	2.4
Al borde $q/s/cm^2$	0.70	0.70	1.95	2.10

Se encontró una diferencia significativa ($P=0.027$) entre la cantidad de luz medida al centro de los estanques azules y blancos, con un promedio de 0.65 ± 0 y $2.15 \pm 0.354 q/s/cm^2 \times 10^4$, respectivamente (Tabla X, Fig. 18). Así mismo, se encontró una diferencia significativa ($P=0.003$) entre la cantidad de luz medida al borde de los estanques azules y blancos, con un promedio de 0.7 ± 0 y $2.025 \pm 0.1 q/s/cm^2 \times 10^4$, respectivamente (Tabla XI, Fig. 19).

Tabla X. Prueba t para muestras independientes sobre el efecto de la iluminación al centro para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco.

Fuente de Variación	Media	Desviación Estándar	N	poder α	t	Grados de Libertad (g.l.)	Nivel de Significancia (P)
Iluminación al centro:							
Estanque Azul	0.65	0.000	2	0.050	-6.0	2	0.027 *
Estanque blanco	2.15	0.354	2	0.830			

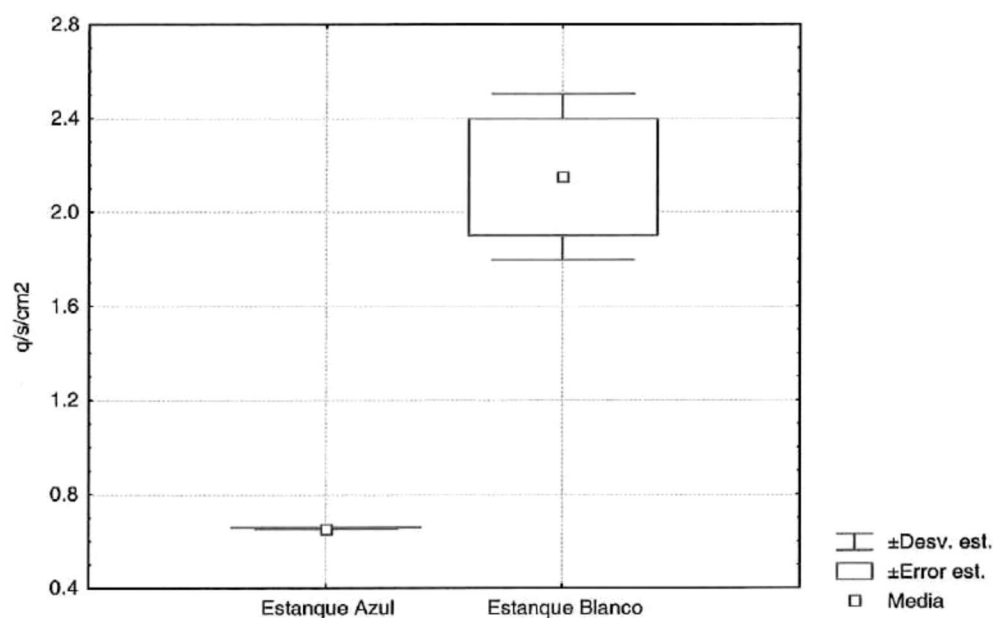
Significativo ($P < 0.05$)

Figura 18.- Efecto de la iluminación al centro del estanque para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco en $q/s/cm^2 \times 10^4$.

Tabla XI. Prueba t para muestras independientes sobre el efecto de la iluminación al borde para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco.

Fuente de Variación	Media	Desviación Estándar	N	poder α	t	Grados de Libertad (g.l.)	Nivel de Significancia (P)
Iluminación al borde:							
Estanque Azul	0.700	0.000	2	0.050	-17.667	2	0.003 *
Estanque blanco	2.025	0.106	2	1.000			

* Significativo ($P < 0.05$)

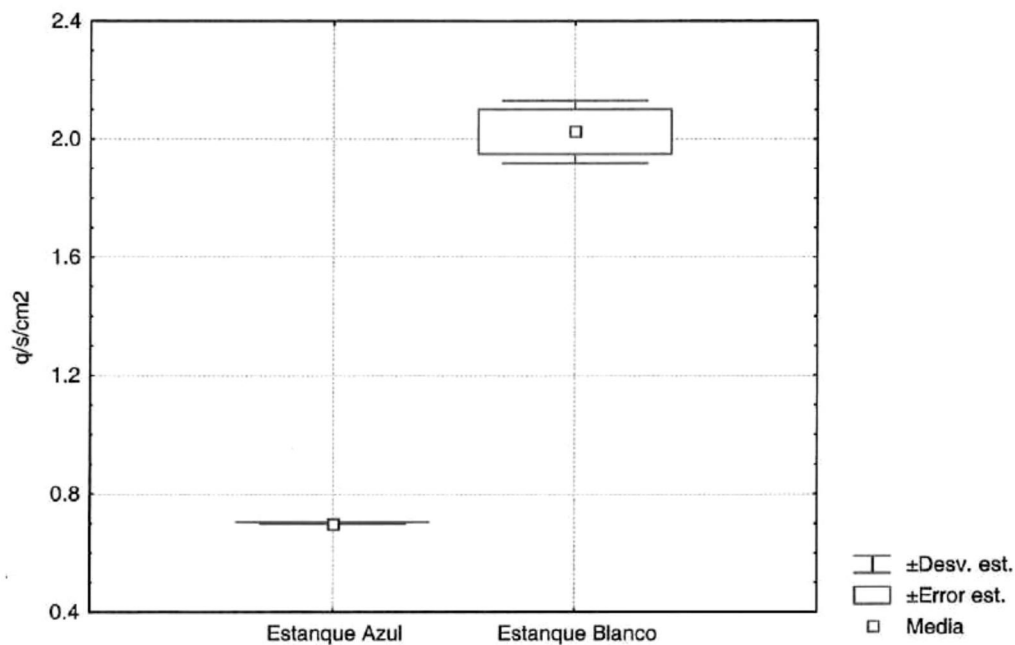


Figura 19.- Efecto de la iluminación al borde del estanque para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco en $q/s/cm^2 \times 10^4$.

5.4.3 Variables físico-químicas.

La temperatura promedio a lo largo del tiempo fué de 24.3 ± 0.58 °C, con una salinidad de 34.28 ± 0.41 ppm, un valor de oxígeno disuelto de 5.13 ± 0.69 mg/l, y un valor de pH de 7.69 ± 0.13 (Anexos: Figs. 39, 40, 41 y 42).

Los niveles de oxígeno disuelto promedio disminuyeron gradualmente con el tiempo de 6.71 mg/l para el día 1 a 4.2 mg/l para el día 16, con una diferencia de 2.51 mg/l, debido a un bajo recambio de agua del 10% al día. Sin embargo no se observó ningún efecto en la supervivencia o en la flotabilidad de los juveniles que se pueda asociar a este evento (Anexos: Fig. 40).

Los niveles de amonio, nitritos y nitratos registrados fueron menores a 0.6 mg/l, 0.10 mg/l, y 0.15 mg/l respectivamente para todos los tratamientos.

5.5 El efecto del cultivo en agua verde.

La concentración inicial de microalgas en los estanques de cultivo fué de 1.4×10^6 cel/ml, por lo que se decidió no realizar adiciones diarias hasta llegar la concentración deseada (7×10^5 cel/ml). Esto se logró a partir del segundo día de cultivo. Se observó que la concentración de microalgas disminuía considerablemente después de 24 horas, disminuyendo también la turbidez en el agua. Este último factor era un buen indicador del momento óptimo para la adición de microalgas.

5.5.1 Crecimiento y supervivencia

5.5.1.1 Longitud

Se encontró una diferencia significativa ($P = < 0.001$) entre las longitudes al séptimo día de experimentación 9.137 ± 0.15 mm y 7.55 ± 0.66 para los tratamientos con adición de microalgas y sin adición respectivamente (Tabla XII, Fig. 20).

Tabla XII.- Prueba t para muestras independientes sobre el efecto de longitud a los 7 días de cultivo para los tratamientos con y sin microalgas de la especie *N. oculata*. Datos transformados a Logaritmo natural (ln).

Fuente de Variación	Media	Desviación Estándar	N	poder α	t	Grados de Libertad (g.l.)	Nivel de Significancia (P)
---------------------	-------	---------------------	---	----------------	---	---------------------------	----------------------------

Longitud
a los 7 días:

Con Microalgas	2.205	0.124	24	0.050	6.040	46	<0.001 *
Sin Microalgas	2.017	0.0886	24	1.000			

* Significativo (P<0.05)

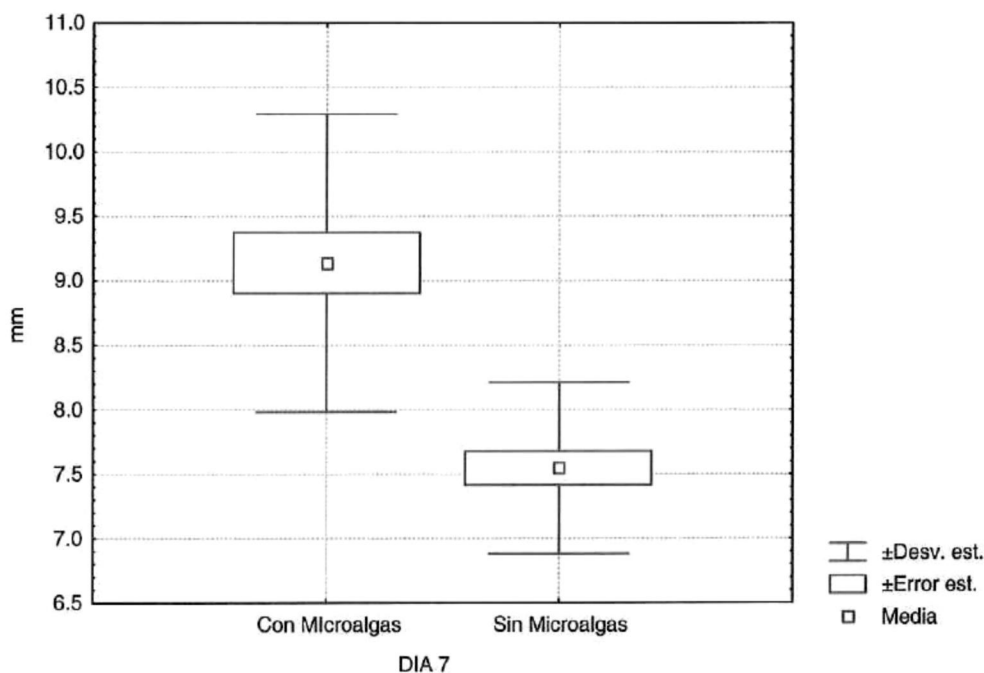


Figura 20.- Longitud promedio en milímetros al día 7 para los tratamientos con adición de microalgas de la especie *N. oculata* y sin adición.

Sin embargo para el día 12 de experimentación, aunque las longitudes fueron mayores para los juveniles cultivados en agua verde ($11.02 \pm 1.27\text{mm}$), no se encontró una diferencia significativa con respecto a los juveniles cultivados sin la adición de microalgas ($10.09 \pm 1.58\text{mm}$) (Tabla XIII, Fig. 21).

Tabla XIII.- Prueba t para muestras independientes sobre el efecto de la longitud a los 12 días de cultivo para los tratamientos con y sin microalgas de la especie *N. oculata*.

Fuente de Variación	Media	Desviación Estándar	N	poder α	t	Grados de Libertad (g.l.)	Nivel de Significancia (P)
Longitud a los 12 días:							
Con Microalgas	11.020	1.273	24	0.050	1.618	29	0.116
Sin Microalgas	10.086	1.581	7	0.220			

* Significativo ($P < 0.05$)

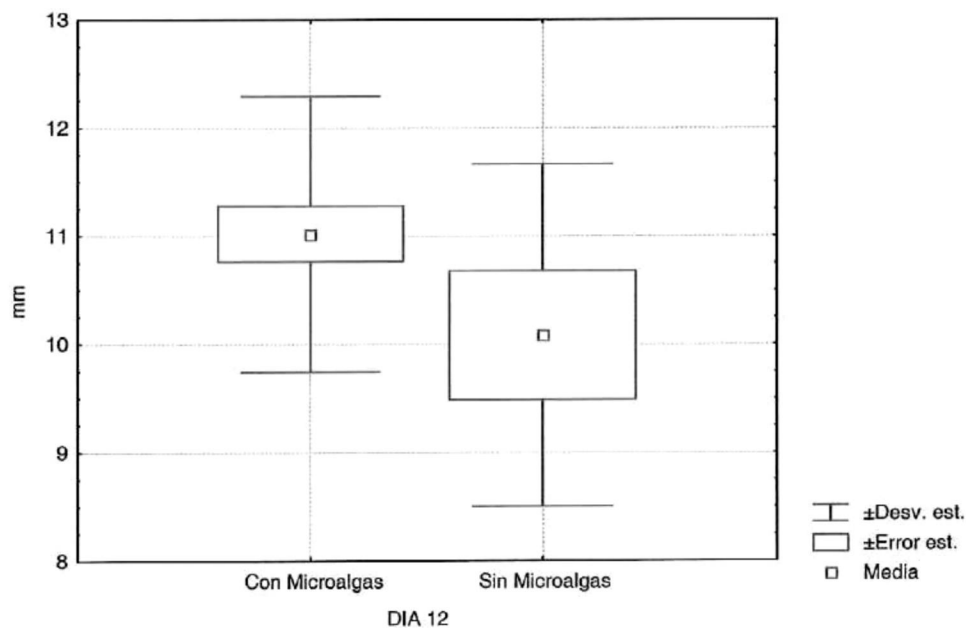


Figura 21.- Longitud promedio en milímetros al día 12 para los tratamientos con adición de microalgas de la especie *N. oculata* y sin adición.

5.5.1.2 Peso seco

No se obtuvieron datos de peso seco para el día 7 de experimentación ya que debido a las altas mortalidades presentadas anteriormente se decidió no sacrificar organismos hasta el final del experimento.

De acuerdo al análisis estadístico para el día 12 de experimentación, se encontró una diferencia significativa ($P= 0.002$) entre los valores de peso seco 0.747 ± 0.21 mg y 0.427 ± 0.11 para los tratamientos con adición de microalgas y sin adición respectivamente (Tabla XIV, Fig. 22).

Tabla XIV.- Prueba t para muestras independientes sobre el efecto del peso seco a los 12 días de cultivo para los tratamientos con y sin microalgas de la especie *N. oculata*.

Fuente de Variación	Media	Desviación Estándar	N	poder α	t	Grados de Libertad (g.l.)	Nivel de Significancia (P)
Peso seco a los 12 días							
Con Microalgas	0.747	0.211	12	0.050	3.709	17	0.002*
Sin Microalgas	0.427	0.109	7	0.934			

* Significativo ($P < 0.05$)

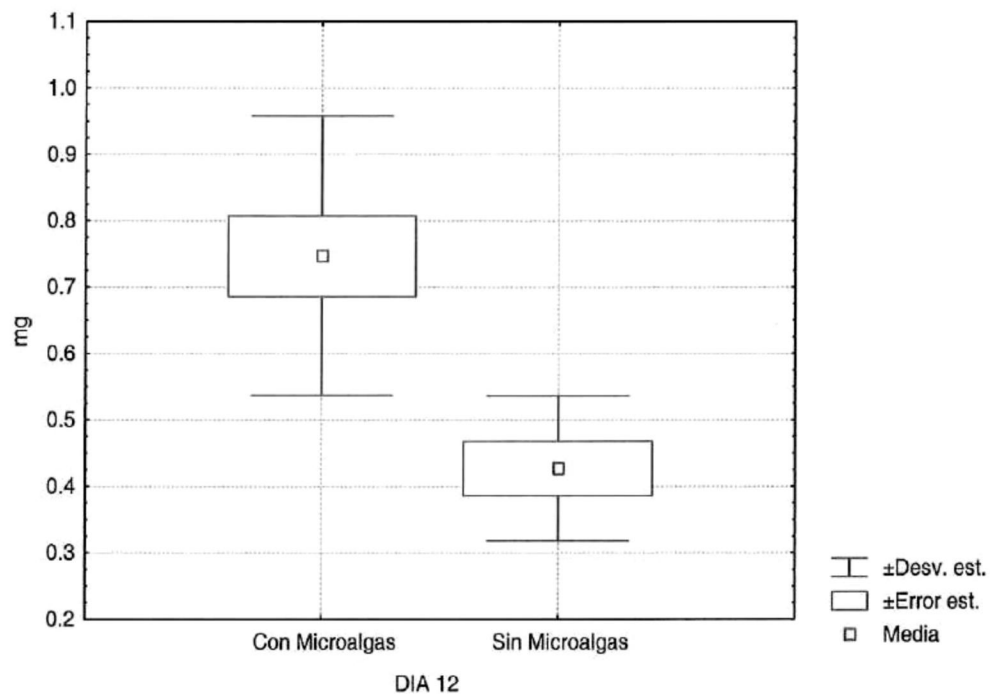


Figura 22.- Peso seco promedio en miligramos al día 12 para los tratamientos con adición de microalgas de la especie *N. oculata* y sin adición.

5.5.1.3 Supervivencia

Se encontró una diferencia significativa ($P= 0.005$) para el día 7 de experimentación entre los porcentajes de supervivencia $61.48 \pm 10.81 \%$ y 24.15 ± 4.05 para los tratamientos con adición de microalgas y sin adición respectivamente (Tabla XV, Fig. 23).

Tabla XV.- Prueba t para muestras independientes sobre el efecto en el porcentaje de la supervivencia a los 7 días de cultivo para los tratamientos con y sin microalgas de la especie *N. oculata*.

Fuente de Variación	Media	Desviación Estándar	N	poder α	t	Grados de Libertad (g.l.)	Nivel de Significancia (P)
% de Supervivencia a los 7 días							
Con Microalgas	61.482	10.808	3	0.050	5.602	4	0.005 *
Sin Microalgas	24.148	4.055	3	0.982			

* Significativo ($P < 0.05$)

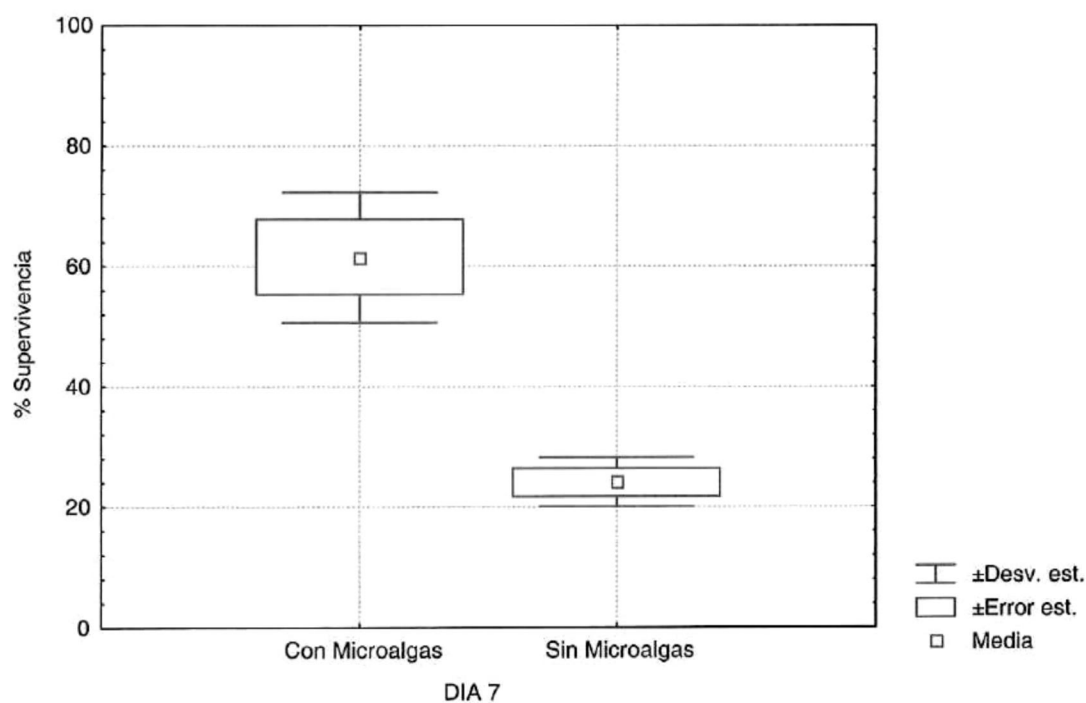


Figura 23.- Porcentaje de supervivencia promedio al día 7 para los tratamientos con adición de microalgas de la especie *N. oculata* y sin adición.

Se encontró una diferencia significativa ($P= 0.016$) para el día 12 de experimentación entre los porcentajes de supervivencia $6.33 \pm 1.56 \%$ y 1.81 ± 1.18 para los tratamientos con adición de microalgas y sin adición respectivamente (Tabla XVI, Fig. 24).

Tabla XVI.- Prueba t para muestras independientes sobre el efecto en el porcentaje de supervivencia a los 12 días de cultivo para los tratamientos con microalgas de la especie *N. oculata* y sin adición

Fuente de Variación	Media	Desviación Estándar	N	poder α	t	Grados de Libertad (g.l.)	Nivel de Significancia (P)
% de Supervivencia a los 12 días							
Con Microalgas	6.328	1.556	3	0.050	4.003	4	0.016 *
Sin Microalgas	1.815	1.180	3	0.827			

* Significativo ($P<0.05$)

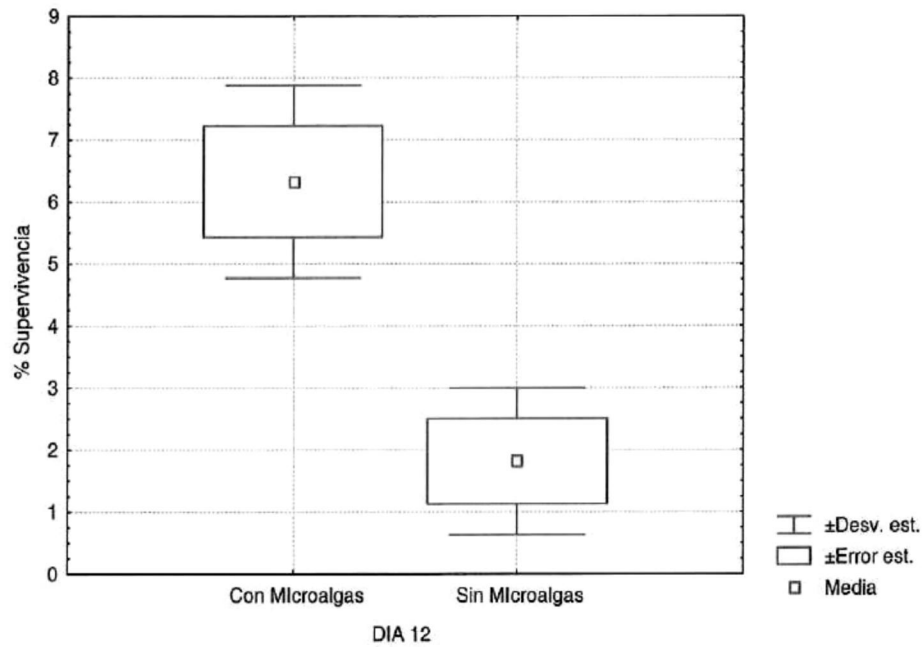


Figura 24.- Porcentaje de supervivencia promedio al día 12 para los tratamientos con adición de microalgas de la especie *N. oculata* y sin adición.

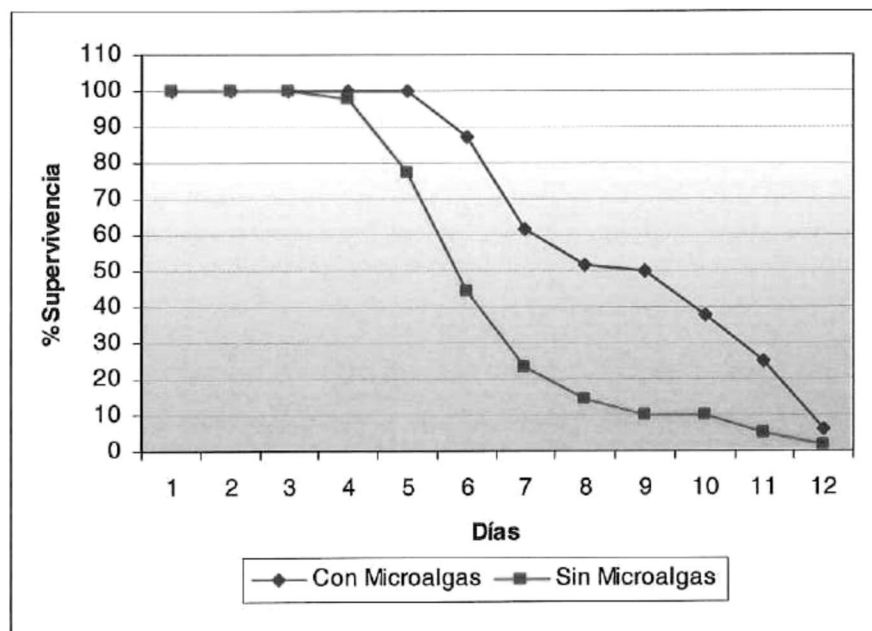


Figura 25. Porcentaje de supervivencia promedio a lo largo del tiempo para los tratamientos con adición de microalgas de la especie *N. oculata* y sin adición.

En ambos tratamientos, la mayor mortalidad se presentó a partir del día 4 al día 8 de cultivo (Fig. 25).

5.5.2 Parámetros físico-químicos.

La temperatura promedio a lo largo del experimento fué de 25.08 ± 1.34 °C, con una salinidad de 34.11 ± 0.14 ppm, un valor de oxígeno disuelto de 4.55 ± 0.8 mg/l, y un pH de 7.81 ± 0.15 (Anexos: Fig. 43, 44, 45 y 46).

Los niveles de amonio, nitritos y nitratos que se registraron fueron menores a 0.6 mg/l, 0.10 mg/l, y 0.15 mg/l respectivamente para todos los tratamientos.

6.0 DISCUSIONES

6.1 El efecto de la iluminación en superficie y en el fondo

No se observó un efecto positivo en la supervivencia de los juveniles comparando el tratamiento con iluminación en el fondo con respecto al tratamiento con iluminación en la superficie (Fig. 10). Sin embargo, en el primer tratamiento se observó una mayor concentración de alimento vivo (rotíferos) en el fondo del estanque cerca del área iluminada durante los primeros 2 días de cultivo. Esto causó que los juveniles se alimentaran principalmente en el fondo del estanque, mientras que en el tratamiento con iluminación en la superficie los juveniles se alimentaban cerca de la superficie.

En la mañana del 3er día de cultivo, la mayor parte de los juveniles se encontraban flotando en la superficie debido a la ingestión de microburbujas provocadas por un efecto de

venturi en el agua de entrada del sistema. Estas microburbujas eran de tamaño adecuado para ser ingeridas por los juveniles y posiblemente eran confundidas por alimento ya que se encontraban en movimiento, o simplemente eran ingeridas en el proceso de respiración. Bajo el microscópio estereoscópico se observaron éstas burbujas en el interior de la cavidad bucal causando un ensanchamiento en la trompa y hasta el tracto digestivo. Se ha reportado que los juveniles de *H. abdominalis* recién expulsados del saco abdominal tienen menor capacidad de expulsar las burbujas de aire ingeridas que los juveniles con mayor tiempo de vida (Woods, 2000).

Se piensa que la presencia de las microburbujas incrementaron la mortalidad de los juveniles en ambos tratamientos, por lo que probablemente no fué posible distinguir ningún efecto de la iluminación en el fondo.

Otro factor que pudo haber afectado a la supervivencia de los juveniles durante los primeros días de vida libre es la alta concentración de ciliados observada en todos los estanques durante el tercer día de cultivo. A partir de este día se enjuagaron los rotíferos enriquecidos por un tiempo mayor para reducir el número de ciliados en los estanques. Es importante el mantenimiento aséptico en el cultivo del alimento vivo para evitar la proliferación de microorganismos patógenos o no deseados que compiten por el alimento (Nicolas et al. 1989).

6.2 El efecto de la intensidad de iluminación y acceso a la superficie

No se observó ninguna diferencia en la supervivencia al impedir el acceso a la superficie a los juveniles después de haber inflado inicialmente la vegiga natatoria con respecto al tratamiento con acceso (Fig. 13). Debido a que los juveniles en los tratamientos IASA e IBSA no tenían acceso a la superficie, se descartó la posibilidad de ingestión de burbujas de aire en la

superficie, y el problema para regular la flotabilidad se pudiera atribuir más bien al proceso de sobresaturación de gases. Esto no fué posible comprobarlo, ya que no se contaba con el equipo que mide la presión de gases totales utilizado para determinar sobresaturación de gases en el agua. Sin embargo, Boyd (1990) menciona que uno de los mecanismos por los cuales se presenta la sobresaturación de gases en el agua es cuando existe un calentamiento, ya que los gases se vuelven menos solubles a mayor temperatura y se forman burbujas. Se piensa que éste fenómeno físico se presentó durante el experimento ya que existió un calentamiento del agua de entrada de 20°C, a 24°C en los estanques.

Así mismo, no se observó ninguna diferencia en cuanto a supervivencia en los tratamientos con iluminación alta e iluminación baja, ya que los juveniles en ambas condiciones experimentales presentaron problemas de flotabilidad similares a los observados en los tratamientos de acceso a la superficie. No se encontró interacción entre los factores de acceso a la superficie e intensidad de iluminación.

6.2.1 Estructuras de fijación

En todas las condiciones experimentales se colocaron monofilamentos como sustrato de fijación para los juveniles y observar su comportamiento (Fig. 5). Sin embargo, no se observaron organismos utilizando los monofilamentos como sustrato de fijación, ni a juveniles utilizando la cola para sujetarse a cualquier superficie sino hasta los 20 días de cultivo. Se piensa que los juveniles de *H. ingens* presentan un comportamiento de vida planctónica o de vida libre en condiciones de cultivo durante las primeras semanas de vida.

6.3 El efecto del acceso a la superficie antes de inflar la vejiga natatoria

No se observó un efecto positivo en la supervivencia de los juveniles al impedir el acceso a la superficie antes de inflar la vejiga natatoria con respecto al tratamiento con acceso a la superficie (Fig. 14). Sin embargo se observó que al impedir el acceso a la superficie, los juveniles no fueron capaces de inflar inicialmente la vejiga natatoria, mientras que el 13% de los juveniles que tuvieron acceso a la superficie lograron inflarla. Chatain y Ounais-Guschemann (1990) bloquearon el acceso a la superficie colocando parafina líquida en la superficie del estanque, y encontraron que las larvas de dorado (*Sparus auratus*) necesitan tomar aire en la superficie para inflar inicialmente la vejiga natatoria.

De acuerdo a lo observado podemos pensar que los juveniles de *H. ingens* necesitan inflar inicialmente la vejiga natatoria ingiriendo aire en la superficie, ya que probablemente no son capaces de producir emisiones de gas en la glándula para inflar inicialmente la vejiga natatoria como lo hacen algunos peces fisoclistos (Lagler et al., 1977). Los juveniles con acceso a la superficie que lograron inflar la vejiga natatoria fueron presentando problemas para regular su flotabilidad con el tiempo, y sólo el 3.33% logró sobrevivir al día 6, mientras que los juveniles que no inflaron la vejiga, no lograron sobrevivir. Estos resultados sugieren que es de vital importancia que los juveniles de *H. Ingens* inflen inicialmente la vejiga natatoria ingiriendo aire en la superficie durante los primeros días de vida libre, para así poder enfrentar nuevos retos para regular su flotabilidad.

Se piensa que el proceso de sobresaturación de gases también estuvo presente en este experimento, ya que se calentó el agua de la misma manera que el experimento anterior, posiblemente afectando a la supervivencia de los juveniles en ambos tratamientos.

6.4 El efecto del color del estanque

Se encontró mayor supervivencia en los estanques de color blanco comparado con los estanques de color azul (Fig. 16). Existen algunas propiedades importantes en el color del estanque que permiten explicar este fenómeno, ya que se observó que de acuerdo al color del estanque pueden variar las condiciones de iluminación en el interior de éste y por lo tanto cambiar el contraste entre las presas y las paredes del estanque de cultivo. Así mismo, se piensa que la ubicación de los juveniles en la columna de agua está relacionada a las condiciones de iluminación creadas de acuerdo al color del estanque.

6.4.1 La iluminación y el contraste

Naas y Huse (1996) mencionan que en un estanque con agua transparente la dispersión y absorción de luz es insignificante comparado con la propagación de la luz directa, por lo tanto las propiedades reflectivas de las paredes y el fondo del estanque son muy importantes para las larvas de peces. De esta manera un estanque de color claro reflejará la luz directa, y un estanque oscuro la absorberá.

Se encontró que los estanques de color blanco presentaron mayor iluminación en el centro y en el borde del estanque que los estanques de color azul, con un valor promedio de 2.08×10^4 y 0.675×10^4 q/s/cm² respectivamente (Figs. 18 y 19), debido probablemente a las propiedades de reflexión de luz en estanques de color claro, comparado con las propiedades de absorción de luz en estanques de color oscuro. De esta manera podemos pensar que los juveniles obtuvieron condiciones más favorables de iluminación en estanques de color blanco, y

probablemente lograron contrastar a sus presas con mayor facilidad que en los estanques de color azul.

6.4.2 La distribución de los juveniles

Se observó que tanto en los estanques azules como en los estanques blancos la gran mayoría de los juveniles se encontraba cerca de las paredes distribuidos verticalmente alrededor del perímetro del estanque. Según Naas y Huse (1996) las larvas de peces marinos bajo situaciones experimentales de cultivo tienen una tendencia a posicionarse cerca de las paredes del estanque, y una de las razones puede ser la fototaxis, causando un desplazamiento hacia una zona de iluminación óptima genéticamente programada, generalmente hacia las paredes y el fondo del estanque, que es donde existe mayor reflexión de luz. Así mismo, Naas et al. (1992) encontraron que en cultivo sin adición de microalgas, las larvas de *H. hippoglossus* tendieron a concentrarse cerca de las paredes de los estanques.

Otra posible razón es que los juveniles gastan menos energía en la búsqueda de presas al posicionarse cerca de las paredes del estanque y eficientizan el proceso de alimentación. A pesar de que en ambos tratamientos los juveniles buscaron una zona óptima de iluminación, se piensa que el estanque blanco presentó condiciones de iluminación más adecuadas para su alimentación durante esta etapa.

6.5 El efecto de la adición de microalgas

Se encontró que a los 7 días de cultivo los juveniles obtuvieron mayor crecimiento con la adición de microalgas de la especie *N. oculata* que los juveniles sin adición de microalgas,

alcanzando mayor longitud y mayor supervivencia (Figs. 20 y 23). No se encontró una diferencia significativa en longitud al día 12 de cultivo en los tratamientos con adición y sin adición (Fig. 21), pero si existió una diferencia significativa en peso y supervivencia (Figs. 22 y 24). Existen razones para creer que las microalgas presentan beneficios directos e indirectos para los juveniles relacionados con la calidad nutricional del alimento que consumen, su asimilación, y a su vez pueden presentar otros beneficios relacionados con la iluminación, el establecimiento de la microflora en el tubo digestivo a temprana edad, y la pigmentación del alimento vivo (Lazo et al., 2000); (Naas et al., 1992, 1996); (Nicolas, et al., 1989); (Olsen et al., 2000); (Reitan et al., 1993, 1997).

6.5.1 Características nutricionales de las microalgas

El alimento vivo enriquecido más la adición de microalgas puede presentar un mejor contenido nutricional que el alimento vivo enriquecido sin su adición. Reitan et al. (1993) menciona que la composición de ácidos grasos en los rotíferos está relacionada con la composición de la dieta utilizada para alimentarlos. De esta manera, la composición de ácidos grasos de los rotíferos al ser alimentados con microalgas reflejará hasta cierto punto la composición de ácidos grasos encontrada en las microalgas. Koven et al. (1990) encontraron que el valor nutricional de *Nannochloropsis sp.*, utilizada como enriquecedor de rotíferos, está asociado a su contenido de ácidos grasos poliinsaturados PUFA de la serie (n-3). A su vez, encontraron que el contenido de PUFA (n-3), particularmente en el contenido del ácido eicosapentanoico (EPA) en los rotíferos enriquecidos con ésta microalga, fué un factor determinante en el crecimiento para larvas de dorado *Sparus aurata*, ya que el contenido del ácido doicosapentanoico (DHA) no fué significativo. Payne y Rippingdale (2000) mencionan que se desconoce aún el requerimiento de

ácidos grasos insaturados (HUFA) para juveniles de caballitos de mar, pero es probable que sea similar al de otras larvas de peces marinos. Sargent et al. (1997) mencionan que es recomendable una proporción de DHA:EPA de 2 a 1 en dietas para larvas de peces marinos.

Los rotíferos y artemia aún recién enriquecidos, en ausencia de microalgas como alimento van perdiendo sus características nutrimentales como por ejemplo el contenido de lípidos y proteínas (Naas et al., 1996). En contraste, al adicionar microalgas a los cultivos, los rotíferos y artemia pueden asimilar los nutrientes esenciales presentes en estas y así conservar su contenido nutricional disponible para los juveniles, obteniendo así un beneficio indirecto. Sin embargo, no podemos rechazar la posibilidad de que los juveniles consumieron microalgas y obtuvieron un beneficio directo. Reitan et al. (1997) menciona que la ingestión de microalgas en larvas de peces está descrita para varias especies incluyendo larvas de turbot (Last, 1979), anchoveta (*engraulis mordax*; Moffatt, 1981), bacalao del atlántico (*Gadus morhua*; Meeren, 1991) y lenguado del atlántico (Lein y Holmefjord, 1992; Reitan et al., 1994).

Lazo y colaboradores (2000) encontraron mayor crecimiento y supervivencia en larvas de corvina dorada *Sciaenops ocellatus* utilizando microdietas formuladas o alimento vivo en presencia de microalgas comparado con los mismos tratamientos sin microalgas. Los autores atribuyen estos resultados positivos a que la asimilación de la microdieta formulada fue significativamente mejorada con la adición de microalgas debido a un incremento significativo en la producción de enzimas digestivas. De igual manera, no podemos descartar la posibilidad de que las microalgas pueden contribuir en la asimilación de las presas vivas.

6.5.2 El efecto de las microalgas en la iluminación

La adición de microalgas causó un cambio en las condiciones de luz, en donde se observó un oscurecimiento del agua de cultivo a mayor concentración y un aumento en la turbidez del agua. (Naas et al., 1996) menciona que la adición de microalgas incrementa la dispersión y absorción de luz, y por lo tanto transfiere el punto de equilibrio de luz directa hacia luz dispersa, y se disipa con la profundidad debido a la absorción de luz. Este efecto sugiere una disminución en el campo de visión de los juveniles, dejando visualmente disponibles sólo las partículas más cercanas y posiblemente incrementando su contraste, lo que pudiera facilitar el enfoque individual del alimento vivo. Naas et al. (1992) menciona que en aguas turbias, las larvas de peces reducen la distancia de nado en busca de alimento, y por lo tanto tienen mayor opción a posicionarse de acuerdo a las condiciones óptimas de luz. Se observó mayor dispersión y homogeneidad de los juveniles en la columna de agua en el tratamiento con adición de microalgas. Por esta razón, podemos pensar que existió menor densidad de organismos por unidad de área. A su vez, se observó un menor número de organismos alimentándose cerca de las paredes del estanque comparado con el tratamiento sin adición de microalgas. Esto pudiera atribuirse a que los juveniles encontraron más regiones en el estanque con las condiciones adecuadas de luz en el tratamiento con la adición de microalgas. También pudiéramos pensar que bajo estas condiciones se crea un ambiente de resguardo, probablemente disminuyendo el estrés causado por la interacción social entre los juveniles (Lazo, comunicación personal).

6.5.3 El efecto de las microalgas en la flora bacteriana

Otro beneficio que pueden haber influenciado las microalgas en el medio de cultivo, es contribuir al establecimiento de la flora bacteriana en el tubo digestivo de los juveniles. Esto ha sido reportado por Reitan y colaboradores (1997) para larvas de peces planos (*Scophthalmus maximus* y *Hippoglossus hippoglossus*). Nicolas et al, (1989) encontraron que la composición de la flora bacteriana en un cadena trófica compuesto por microalgas (*Pavlova lutheri* y *Platymonas suecica*); rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y larvas de turbot (*Scophthalmus maximus*) presenta algunos elementos de estabilidad en cuanto a diversidad y número de bacterias.

Olsen et al. (2000) observaron que la artemia *A. franciscana* alimentada con aceite de pescado presentaba un alto número de bacterias del género *Vibrio*, y encontraron que al ser incubadas con las microalgas *Tetraselmis sp* por 4 y 24 horas se redujo significativamente la proliferación de bacterias y existió un cambio en la composición encontrando mayor diversidad en la comunidad bacteriana, lo cual promueve la estabilidad de la flora.

De esta manera pudiéramos pensar que la adición de las microalgas *N. oculata* redujo la proliferación de bacterias no deseadas y promovió la estabilidad de la flora bacteriana tanto en los rotíferos y artemia como en el tubo digestivo de los juveniles.

6.5.4 El efecto de las microalgas en la pigmentación

Naas et al. (1992) mencionan que en presencia de microalgas en el cultivo, se incrementa la visualización de artemia para larvas de *H. hippoglossus* posiblemente debido a un mayor contraste creado por la pigmentación de microalgas en el tracto digestivo de las presas.

Si no se adiciona microalgas, se observó que tanto los rotíferos como la artemia pierden la coloración obtenida por el alimento que consumen con el tiempo y posiblemente se vuelven más difíciles de detectar por los juveniles. Se observó que el alimento vivo en presencia de microalgas adquiere una coloración verde la cual posiblemente facilita en los juveniles la detección de sus presas y tal vez pueda estimular la alimentación.

En el trabajo de Naas et al. (1992), Dendrinós et al. (1984) observó un incremento en la eficiencia alimenticia en larvas del pez plano *Scophthalmus maximus* al teñir a la artemia con colores que contrastaban con las paredes del estanque.

6.5.5 El efecto de las variaciones de temperatura y oxígeno disuelto

Para el tratamiento sin adición de microalgas se presentó una disminución gradual de temperatura de 26 a 22.5 °C en el día 7 debido a una sobrecarga de energía en el múltiple que proveía la electricidad causando que se apagaran los calentadores. Sin embargo no se observó un incremento en la mortalidad que se pueda asociar a este evento. En el día 12 de cultivo se volvió a presentar esta eventualidad para el tratamiento con microalgas causando una disminución gradual de temperatura de 26.4 a 21.2 °C (Anexos: Fig. 43). Se observó un incremento en la incidencia de juveniles flotando en la superficie, por lo que se piensa que el cambio de temperatura fué de magnitud suficiente para afectar a la flotabilidad de los juveniles, ya que posiblemente causó un nivel de estrés elevado (Figs. 26a y b). De acuerdo con lo reportado por Kolveinshavn y colaboradores (1985), el estrés en larvas de peces puede causar problemas de flotabilidad presentándose exceso de gas en la vejiga natatoria.

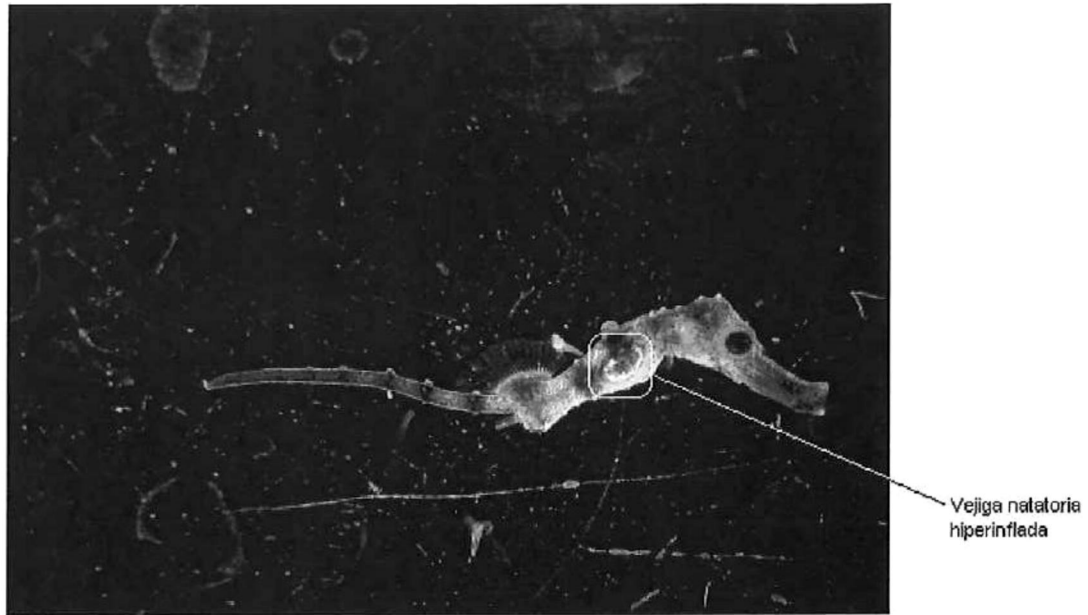


Figura 26a.- Juvenil de *H. ingens* a los 12 días de vida libre con la vejiga natatoria hiperinflada, presentando problemas de flotabilidad.



Figura 26b.- Juvenil de *H. ingens* a los 12 días de vida libre con la vejiga natatoria inflada normalmente, sin presentar problemas de flotabilidad.

Se presentó una disminución gradual de oxígeno disuelto promedio con el tiempo de 5.69 mg/l para el día 1 a 3.5 mg/l para el día 9, con una diferencia de 2.19 mg/l debido al bajo recambio de agua utilizado (10% al día). Sin embargo, hubo un incremento en el nivel de oxígeno disuelto promedio de 0.74 mg/l del día 10 al 12 de cultivo, ya que se realizó un recambio del 25 al 30% durante estos días para disminuir la concentración de alimento vivo remanente en todos los estanques y reemplazarlo con alimento nuevo recién enriquecido (Anexos: Fig. 45). Este cambio a su vez pudo haber influido en la incidencia de juveniles flotando en la superficie, causando un desequilibrio gaseoso. Téllez y colaboradores (2000) reportaron un fenómeno masivo de embolia gaseosa en juveniles de *H. ingens* debido a una transferencia de agua de mejor calidad.

7.0 CONCLUSIONES

No se logró reducir la incidencia de burbujas de aire ingeridas en la superficie para los juveniles de *H. ingens* al introducir iluminación en el fondo, posiblemente debido a la sobresaturación de gases presentada por un efecto de venturi, creando microburbujas en el sistema.

No existió una diferencia significativa de crecimiento y supervivencia en cuanto a la iluminación alta e iluminación baja, probablemente debido a la alta mortalidad observada en ambos tratamientos.

El problema de flotabilidad causado por exceso de gas en la vejiga se puede presentar aún al impedir el acceso a la superficie una vez inflada la vejiga natatoria.

El acceso a la superficie en los juveniles de *H. ingens* después de ser liberados del saco abdominal parece ser indispensable, ya que sólo pueden inflar inicialmente la vejiga natatoria al ingerir aire en la superficie.

Aparentemente los estanques con paredes y fondo blanco mejoran las condiciones de luz en el estanque de cultivo, lo que posiblemente permite un mejor contraste del alimento vivo y mejor visualización de éste facilitando su captura.

El cultivo en agua verde con microalgas de la especie *N. oculata* favoreció el desarrollo de juveniles de *H.ingens* obteniendo mayor crecimiento y supervivencia.

8.0 RECOMENDACIONES

Con base a los resultados obtenidos en este estudio, se considera importante tanto el diseño del sistema de cultivo para intentar simular las condiciones naturales para juveniles de *H. Ingens*, como las condiciones asépticas de trabajo en el mantenimiento de los juveniles y el alimento vivo para mantener óptima la calidad del agua. Se presentan las siguientes recomendaciones:

- Utilizar una bomba de agua de baja potencia para evitar altas fluctuaciones de presión y evitar la formación de microburbujas.
- Proporcionar una aireación baja (de 2 a 4 burbujas/seg) con una manguera sin difusor de 0.5 cm de diámetro colocada en el fondo del estanque y cerca de la pared para permitir una circulación de baja intensidad evitando perturbar a los juveniles.
- Utilizar estanques circulares de color claro con mayor profundidad que diámetro para aumentar la opción para los juveniles a posicionarse en la columna de agua y reducir el área en la superficie. Se recomiendan los estanques circulares ya que se logra una circulación de agua más homogénea.
- Permitir a los juveniles el acceso a la superficie en los primeros días de cultivo en los estanques evitando que se acumulen desechos grasos en la capa superficial.
- Proporcionar buena iluminación con luz fluorescente entre 1.9 y 2.4×10^4 q/s/cm². Se recomienda probar la iluminación en el fondo, o la iluminación lateral si el estanque es transparente.
- Desinfectar los estanques y el agua de cultivo inicialmente.

- Mantener una buena calidad del agua en el cultivo del alimento vivo y de los juveniles para evitar la proliferación de bacterias y otros microorganismos que compitan por el alimento.
- Realizar un bajo recambio de agua en el cultivo a la misma temperatura, entre el 10 y 20 % diario durante las primeras semanas de vida libre para promover el equilibrio gaseoso.
- Adicionar microalgas diariamente para mantener una densidad de 7.5×10^5 cel/ml.

La profundidad del estanque puede ser un factor que afecte a la flotabilidad de los juveniles de *H. Ingens*, por lo que se necesitan realizar estudios posteriores para determinar un diseño de estanque con la profundidad óptima.

Las condiciones de iluminación son un factor que se necesita optimizar, y se recomienda realizar un ensayo utilizando iluminación en el fondo con estanques de color claro y con la adición de microalgas.

A su vez, se necesitan realizar estudios posteriores sobre los factores que afectan a los juveniles al regular el volumen de gas en la vejiga natatoria, que posiblemente están relacionados con la estabilidad de la flora bacteriana y la sobresaturación de gases.

Por otro lado es importante conocer los requerimientos nutricionales en los juveniles de *H. Ingens* para lograr un desarrollo adecuado e intentar incrementar el crecimiento y la supervivencia durante las primeras semanas de vida.

Se recomienda hacer otros bioensayos con las variables físico-químicas del agua para determinar la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y presión de gases totales óptimos durante el desarrollo juvenil de *H. Ingens*.

BIBLIOGRAFIA

- Boyd, E.C., 1990. Water Quality in Ponds for Aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station. Auburn University, Alabama, E.U.A. 482 p
- Chatain, B., Ounais-Guschemann, N., 1990. Improved rate of inicial swim bladder inflation in intensively reared *Sparus auratus*. *Aquaculture*, 84:345-353.
- Cozzi-Schmarr, C., 2003. Understanding gas bubble problems. Info@oceanrider.com, Kailua-Kona, HI. 3p.
- Dames, N., 2000. Biogeography of the pacific seahorse *Hippocampus ingens*. San Francisco State University, department of Geography, 9 p.
- Darula, K.E., 2000. "Total nitrogen test 'n tube reagents". Alkaline persulfate digestion with colorimetric finish for the determination of total nitrogen in water and waste water matrices. Hazh Company, Loveland, CO., E.U.A. 6 p.
- Gardner, T., 2003. Solving problems in seahorse culture. Biology Department, Hofstra University, [www. Seahorse.org](http://www.Seahorse.org), 6p.
- Gatesoupe, F. J., 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 96: 335-342.
- Giwojna, P., 1996. Seahorse nutrition Part I, II, and III. *Freshwater and marine aquarium magazine (FAMA)* Volume 19: No. 10, 11 and 12.
- Jensen, J.O.T., 1988. Combined effects of gas supersaturation and dissolved oxygen levels on steelhead trout (*Salmo gairdneri*) eggs, larvae and fry. *Aquaculture*, 68: 131-139.
- Job, S.D., Do, H.H., Meeuwig, J.J., and May, H.J., 2002. Culturing the oceanic seahorse, *Hippocampus kuda*. *Acuaculture* 214: 333-341.
- Kolveinshavn, A., Wallace, C.J., 1985. Observations on swim bladder stress syndrome in arctic charr *Salvelinus alpinus*, induced by inadequate water depth. *Aquaculture*, 46: 259-261.
- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, G.Wm., Sklan, D., Freizlander, O., Harel, M., 1990. The effect of dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids on growth, survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture*, 91: 131-141.
- Kuiter, H.R., 2000. Seahorses, Pipefishes and their relatives. A comprehensive guide to sygnathiformes. TMC Publishing, Chorleywood, UK. 240 pp.

- Lagler, K. F., Bardach, J.E., Miller, R.R., May Passino, D.R., 1977. Ictiología, primera edición en español. A.G.T. Editor S.A. Progreso 202- Planta alta, México 18, D.F. 489 pp.
- Lazo, J.P., Dinis M.T., Holt, G.J., Faulk, C., Arnold, C.R., 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 188; 339-351.
- Lourie, A.S., Vincent, C.J.A., Hall J.H., 1999. Seahorses. An identification guide to the world's species and their conservation. Dorling Print Limited, Mitcham, Surrey. 212 pp.
- Martin-Robichaud, D.J, Peterson, R.H., 1998. Effects of light intensity, tank colour and photoperiod on swimbladder inflation success in larval striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). *Aquaculture research*, 29: 539-547.
- Monay Díaz, I., 2002. Evaluación de la dinámica poblacional del rotífero *Brachionus plicatilis* bajo condiciones de laboratorio, utilizando diferentes dietas. Tesis de licenciatura, UABC, FCM, unidad de biotecnología en piscicultura. 59pp.
- Naas, K.E., Huse, I., 1996. Illumination in first feeding tanks for marine fish larvae. *Aquacultural Engineering*, Vol. 15, No.4: 291-300.
- Naas, K.E., Næss, T., Harboe, T., 1992. Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water. *Aquaculture* 105:143-156.
- Nash, C.E., Kuo, C-M., Madden, W.D., Paulsen, C.L., 1977. Swim bladder inflation and survival of *Mugil cephalus* to 50 days. *Aquaculture*, 12:89-94.
- Nicolas, J.L., Robic, E., Ansquer, D., 1989. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: Influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture*, 83:237-248.
- Olsen, A.I., Olsen, Y., Attramadal, Y., Christie, K., Birkbeck, T.H., Skjermo, J., Vadstein, O., 2000. Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture* 190:11-25.
- Payne, M.F., Rippingdale, R.I., 2000. rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched *Artemia*. *Aquaculture* 188: 353-361.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, R.J., Oie, G., Olsen, Y., 1993. Nutritional effects of algal addition in first-feeding of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture*, 118:257-275.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, R.J., Oie, G., Olsen, Y., 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture* 155: 207-221.

- Reyes-Bustamante, H., Ortega-Salas, A.A., 1999. Cultivo del caballito de mar, *Hippocampus ingens* (pises: Sygnathidae) en condiciones artificiales. Facultad de Ciencias del Mar, UAS. e Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Rev. Biol. Trop., 47(4): 1045-1049
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G., 1997. Requirements presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. Aquaculture 155, 117-128.
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G., 1989. Statistical Methods, 8th Edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Steel, R.G., Torrie, J.H., 1980. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrics Approach. McGraw-Hill, New York, New York, E.U.A.
- Tellez, M.V., Levi, M.K., Medina, G.D. y Voltolina, F., 2000. Cultivo a nivel piloto del caballito de mar *Hippocampus ingens* (Girard, 1859). Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autonoma de Sinaloa, 12 p.
- Wong, J.M., Benzie, J.A.H., 2003. The effects of temperature, *Artemia* enrichment, stocking density and light on the growth of juvenile seahorses, *Hippocampus whitey* (Bleeker, 1855), from Australia. Aquaculture, 228: 107-121.
- Woods, M.C., 2000. Improving initial survival in cultured seahorses, *Hippocampus abdominalis* Leeson, 1827 (Teleostei: Sygnathidae). Aquaculture, 190: 377-388.
- Woods, M.C., 2002. Effect of stocking density and gender segregation in the seahorse *Hippocampus abdominalis*. Article in press, Aquaculture 62014,

10. ANEXOS

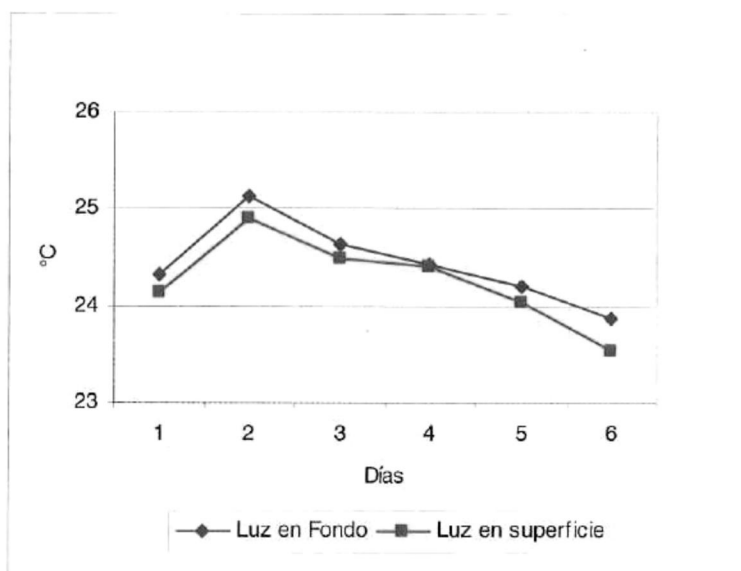


Figura 27.- Temperatura en grados centígrados para los tratamientos de luz en el fondo y luz en la superficie a lo largo del tiempo.

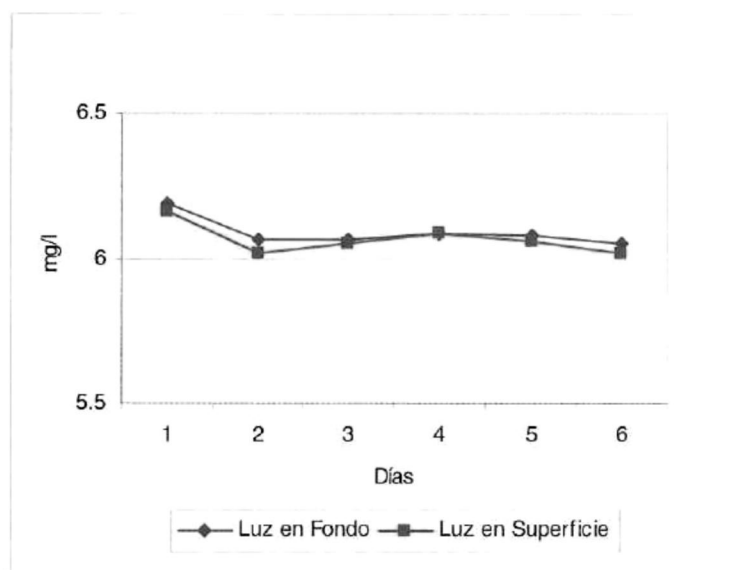


Figura 28.- Oxígeno disuelto en miligramos por litro para los tratamientos de luz en el fondo y luz en la superficie a lo largo del tiempo.

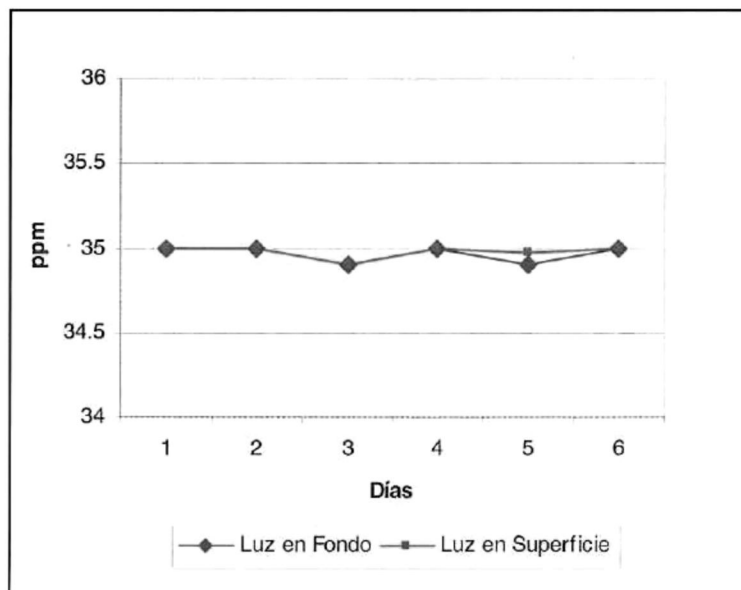


Figura 29.- Salinidad en partes por mil para los tratamientos de luz en el fondo y luz en la superficie a lo largo del tiempo.

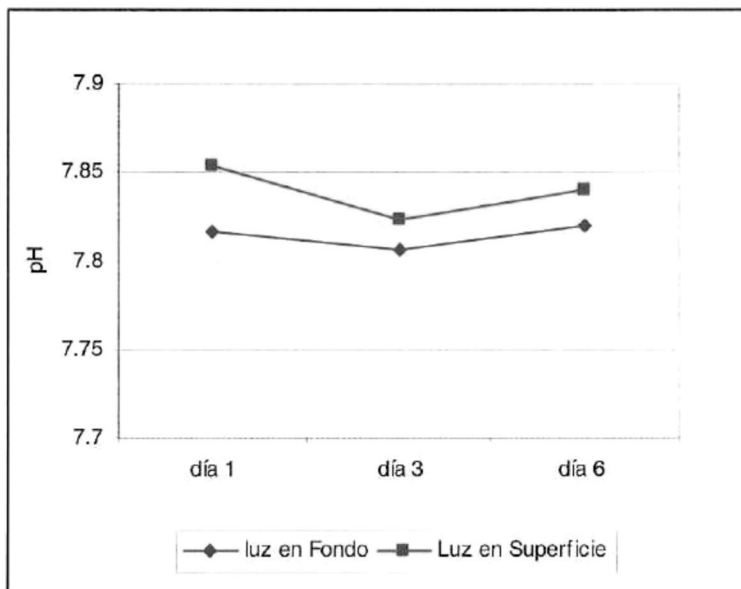


Figura 30.- Potencial de hidrógeno para los tratamientos de luz en el fondo y luz en la superficie a lo largo del tiempo.

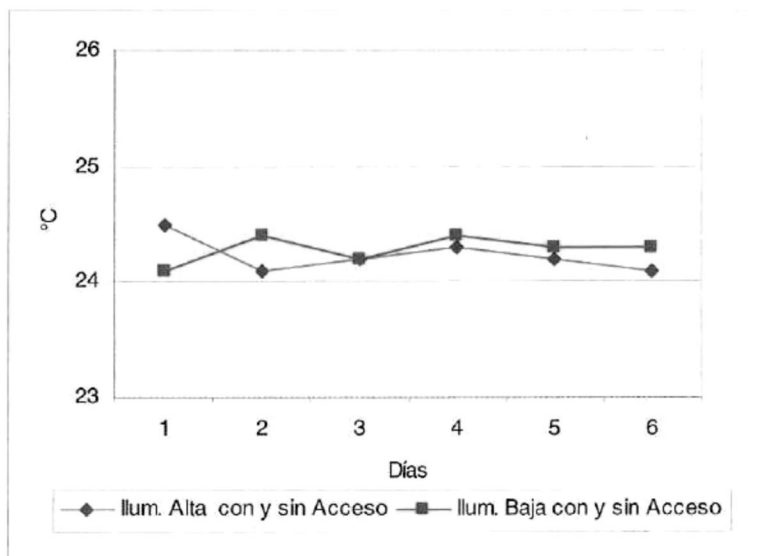


Figura 31.- Temperatura en grados centígrados para los tratamientos de Iluminación alta con y sin acceso a la superficie, e iluminación baja con y sin acceso a lo largo del tiempo.

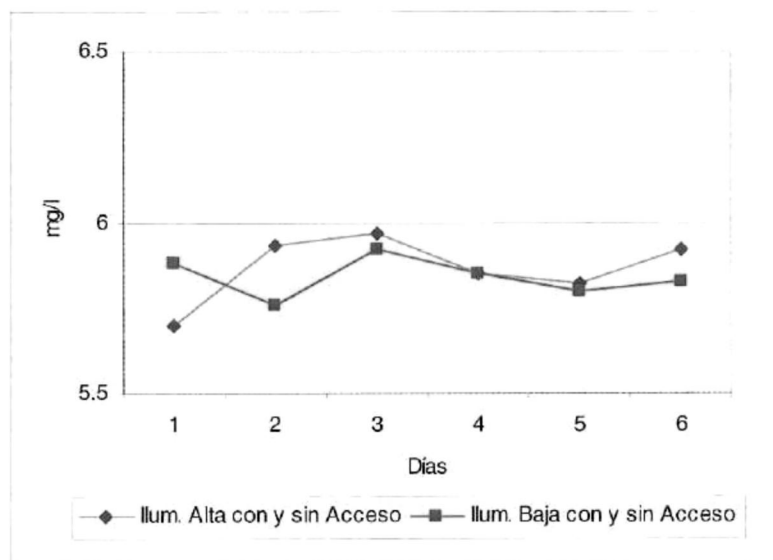


Figura 32.- Valores de oxígeno disuelto promedio en mg/l para los tratamientos De iluminación alta con y sin acceso a la superficie, e iluminación baja con y sin acceso a lo largo del tiempo.

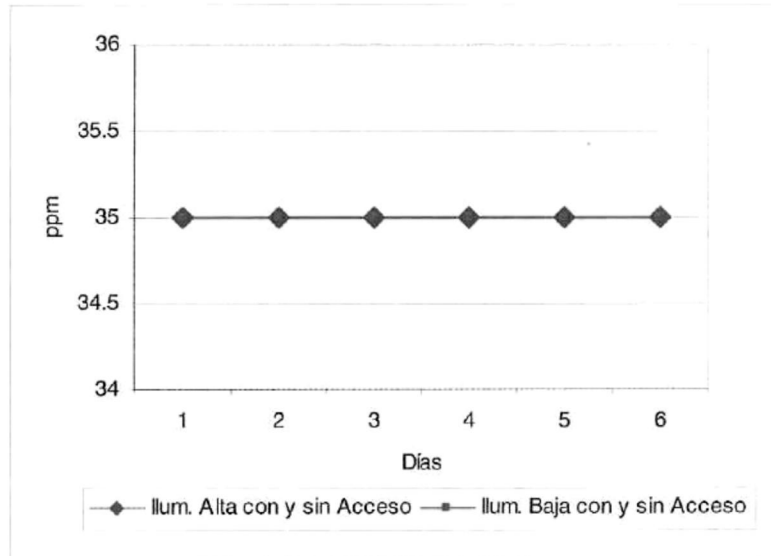


Figura 33.- Salinidad en partes por mil para los tratamientos de iluminación alta con y sin acceso a la superficie, e iluminación baja con y sin acceso a lo largo del tiempo.

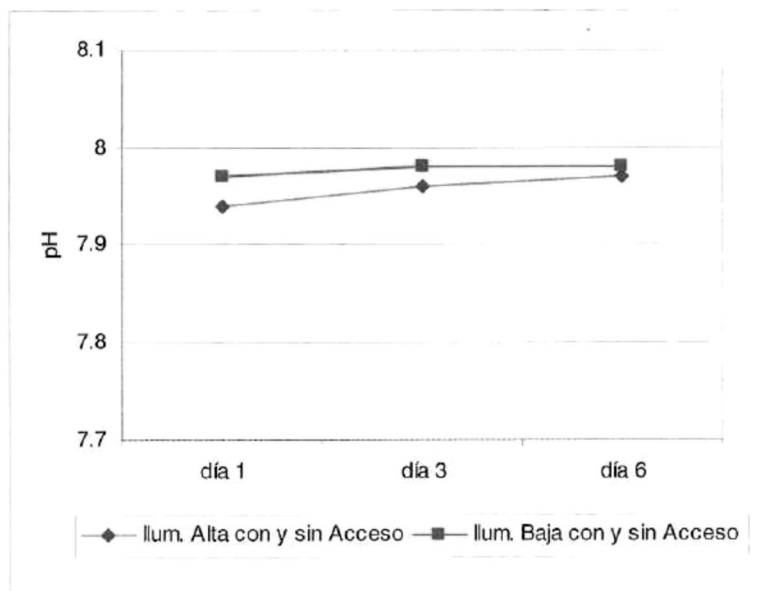


Figura 34.- Valores de pH para los tratamientos de iluminación alta con y sin Acceso a la superficie, e iluminación baja con y sin acceso a lo largo del tiempo.

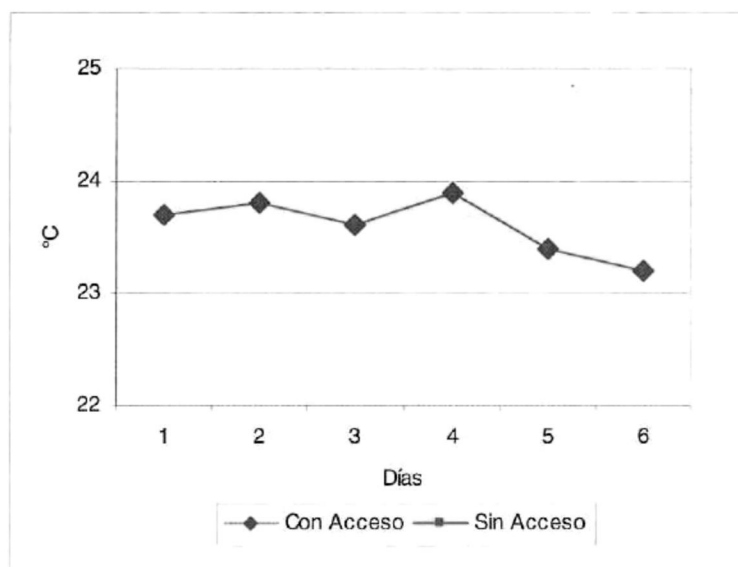


Figura 35.- Temperatura en grados centígrados para los tratamientos con acceso y sin acceso a la superficie a lo largo del tiempo.

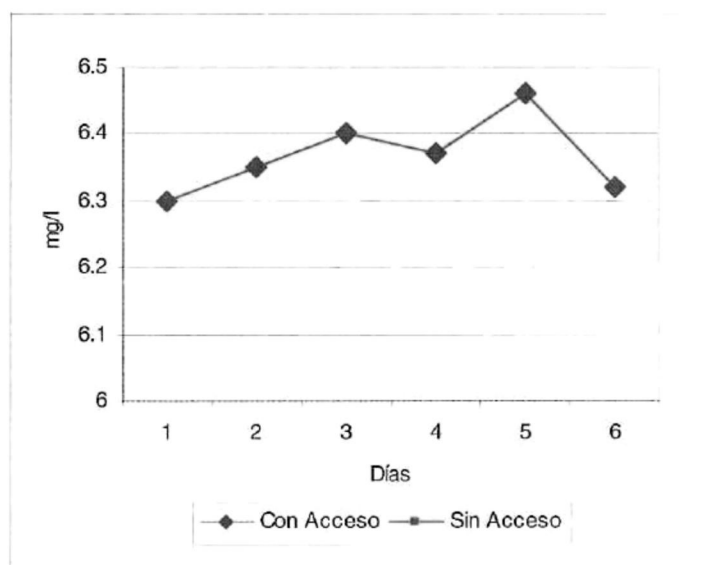


Figura 36.- Oxígeno disuelto en miligramos por litro para los tratamientos con acceso y sin acceso a la superficie a lo largo del tiempo.

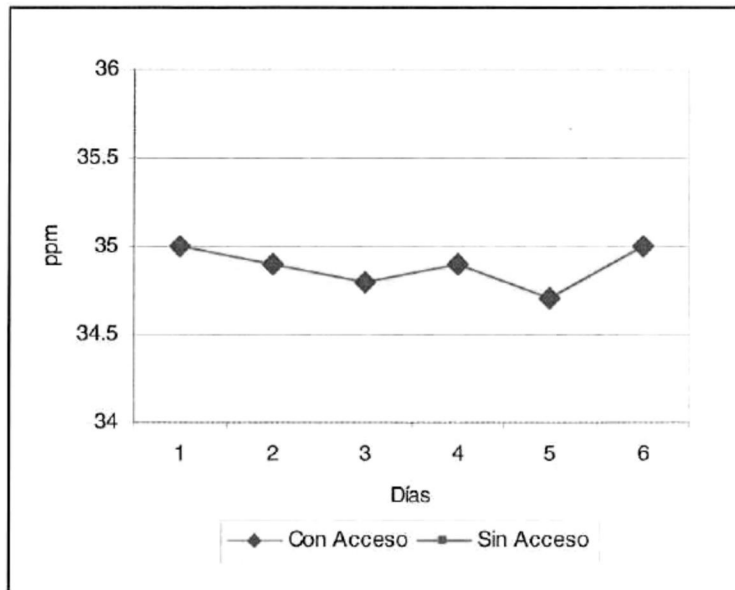


Figura 37.- Salinidad en partes por mil para los tratamientos con acceso y sin acceso a la superficie a lo largo del tiempo.

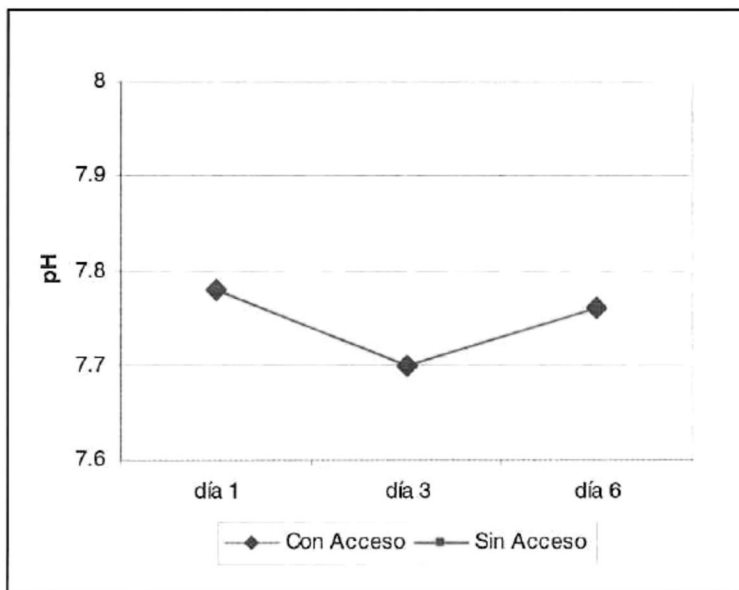


Figura 38.- Valores de pH para los tratamientos con acceso y sin acceso a la superficie a lo largo del tiempo.

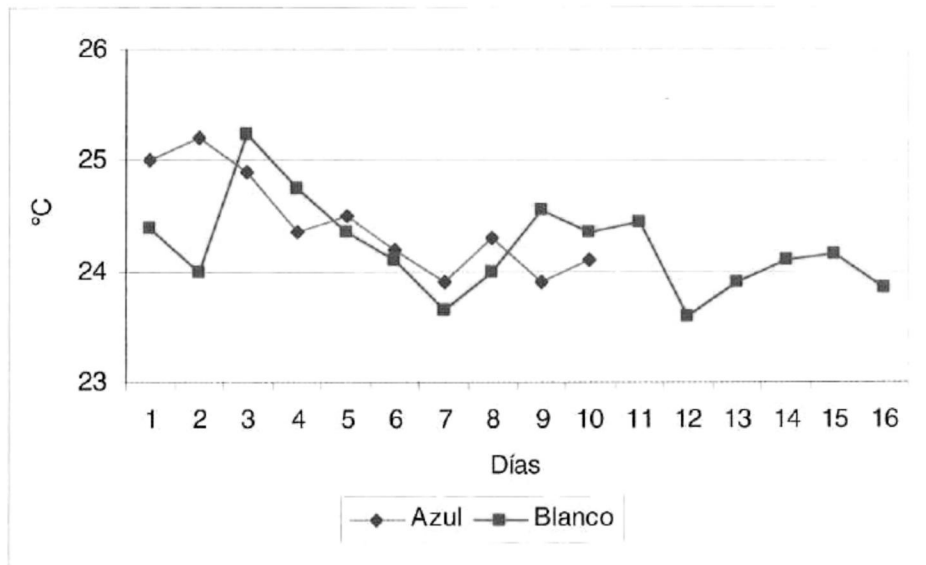


Figura 39.- Temperatura en grados centígrados para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco a lo largo del tiempo.

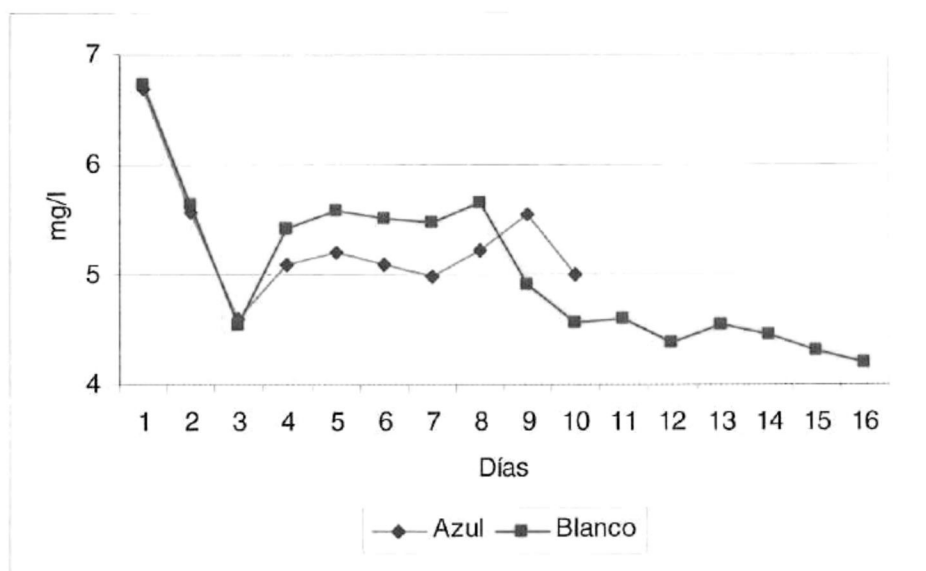


Figura 40.- Oxígeno disuelto en miligramos por litro para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco a lo largo del tiempo.

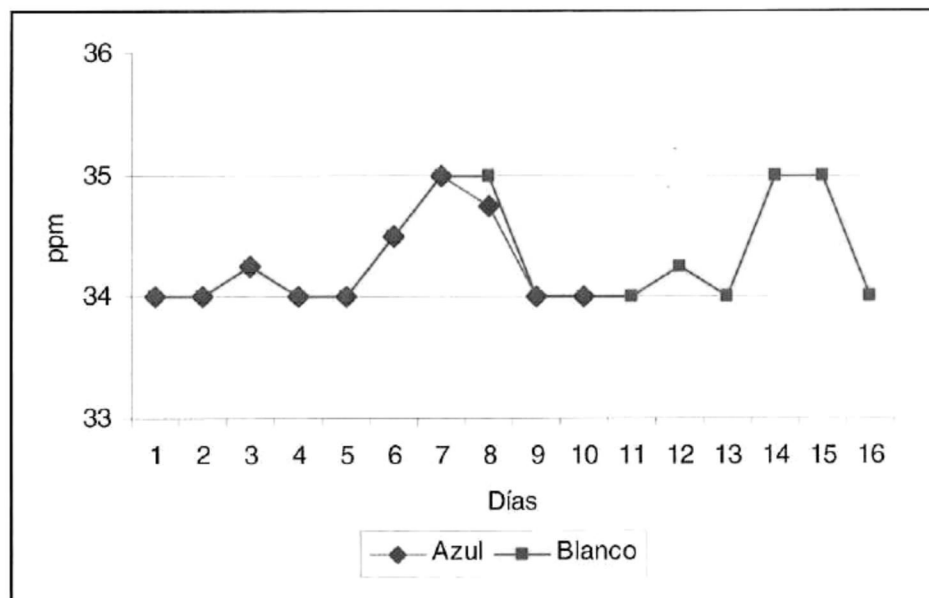


Figura 41.- Salinidad en partes por mil para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco a lo largo del tiempo.

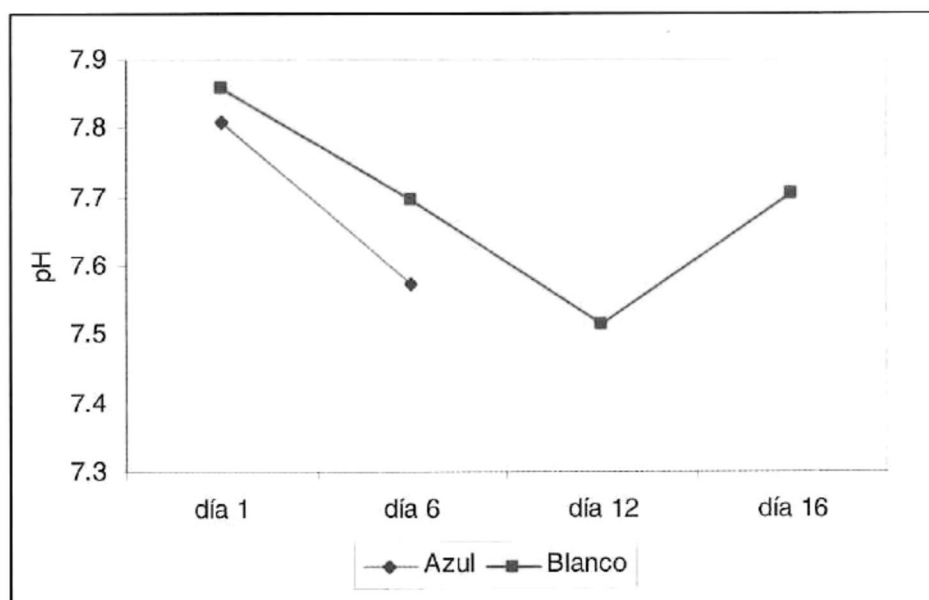


Figura 42.- Valores de pH para los tratamientos de estanque azul y estanque blanco a lo largo del tiempo.

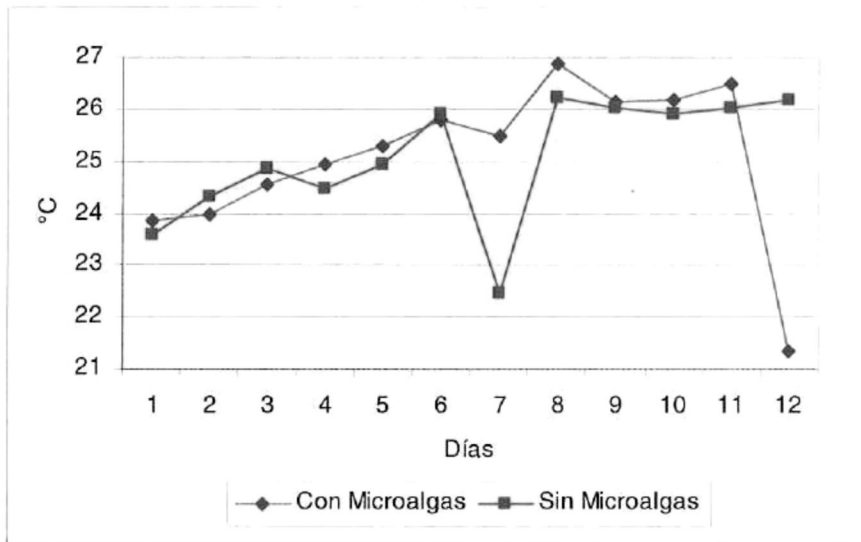


Figura 43.- Temperatura en grados centígrados para los tratamientos con adición de microalgas de la especie *N. oculata* y sin adición a lo largo del tiempo.

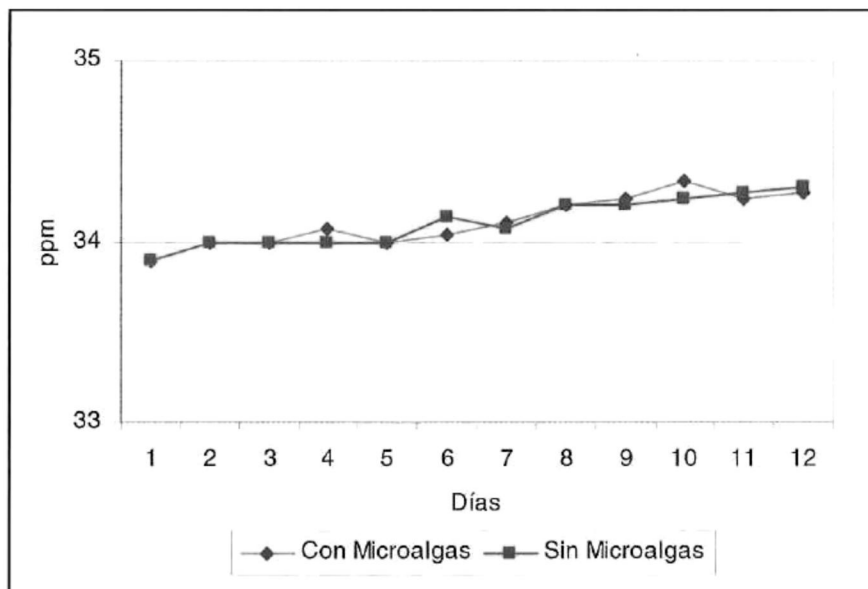


Figura 44.- Salinidad en partes por mil para los tratamientos con adición de microalgas de la especie *N. oculata* y sin adición a lo largo del tiempo.

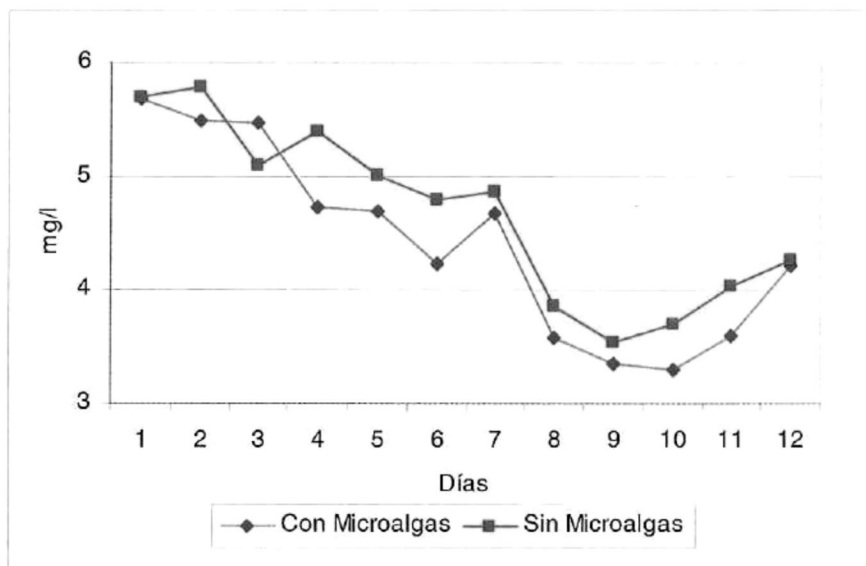


Figura 45.- Valores de oxígeno disuelto en miligramos por litro para los tratamientos con adición de microalgas de la especie *N. oculata* y sin adición a lo largo del tiempo.

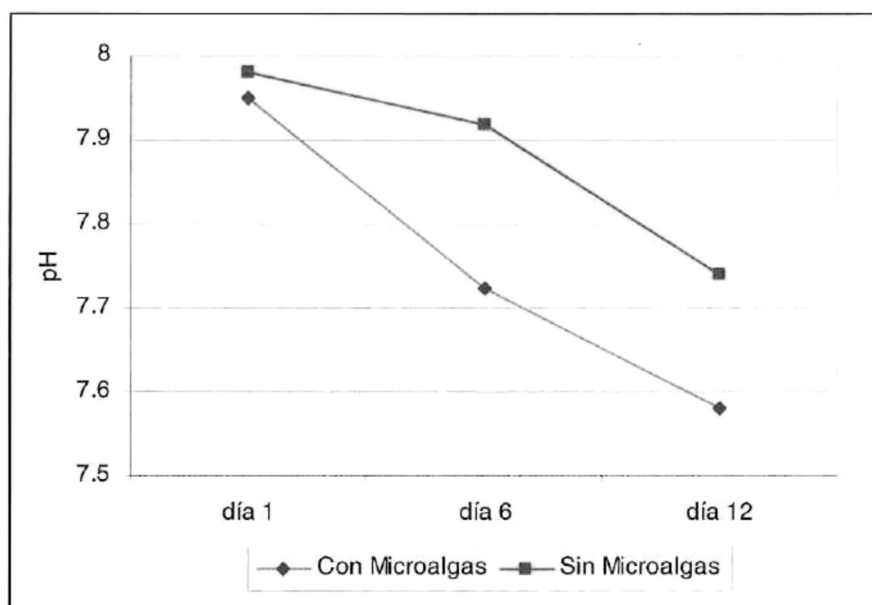


Figura 46.- Valores de pH para los tratamientos con adición de microalgas de la especie *N. oculata* y sin adición a lo largo del tiempo.