

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



EFFECTO DEL CLORANFENICOL Y LA GENTAMICINA SOBRE EL
DESARROLLO LARVAL DE LA ALMEJA GENEROSA, *Panopea*
generosa.



TESIS

Que para obtener el título de

OCEANOLOGO

PRESENTA:

Sandra Tapia Morales.

Ensenada, Baja California, Junio 2011

RESUMEN

La almeja generosa, *Panopea generosa*, forma parte de una pesquería económicamente importante en el Pacífico de norteamérica. Debido a esto, en la UABC se iniciaron estudios orientados a su cultivo y a optimizar la sobrevivencia y crecimiento de larvas y poslarvas de esta especie. Se sabe que los moluscos presentan altas mortalidades en ciertos momentos de su desarrollo larval, por lo que en el presente estudio se realizaron dos corridas (2009, 2010) con el objeto de probar el efecto de los antibióticos cloranfenicol y gentamicina sobre el crecimiento y sobrevivencia larval de *P. generosa*. El diseño experimental consistió de 4 tratamientos (concentraciones) con 3 replicas cada uno aplicados cada tercer día en las siguientes dosis: 0, 3, 6 y 9 mg/l. Las larvas cultivadas en recipientes de 6l a una densidad inicial de 1 larva/ml fueron mantenidas a 17 °C, con aireación constante, y alimentadas con la microalga *Isochrysis galbana* (Clon T-ISO). En la corrida 2009 se pudo observar un efecto positivo significativo del cloranfenicol sobre el crecimiento larval. El inicio de la metamorfosis larval ocurrió alrededor del día 25 en las concentraciones altas antibiótico (6 y 9mg/l), mientras que las larvas control no alcanzaron la etapa de metamorfosis aún después 34 días. En 2010 solamente las concentraciones más altas de gentamicina (6 y 9 mg/l) produjeron mayor crecimiento larval que el control, y la sobrevivencia fue significativamente mayor a concentraciones de 9 mg/l. En conclusión el cloranfenicol logró aumentar la tasa de crecimiento y sobrevivencia larval de *P. generosa*, mientras que gentamicina solo logró aumentar el porcentaje de sobrevivencia.

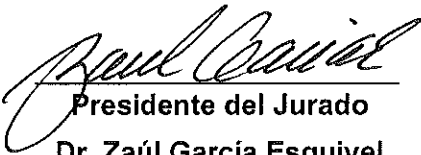
EFFECTO DEL CLORANFENICOL Y LA GENTAMICINA SOBRE EL
DESARROLLO LARVAL DE LA ALMEJA GENEROSA, *Panopea*
generosa.

TESIS

QUE PRESENTA:

Sandra Tapia Morales

Aprobada por:


Presidente del Jurado
Dr. Zaúl García Esquivel


Sinodal propietario
M. C. Ruth Elena
Montenegro Ortega


Sinodal propietario
M. C. Francisco Ley Lou

DEDICATORIA.

A mi mamá por ser un gran ejemplo de esfuerzo y superación, porque a pesar de todos los obstáculos siempre me dio su apoyo incondicional y se sintió orgullosa de mi, por todo lo que para mi significa, gracias mamá.

A mi tía Raquel por ayudarme en ciertos momentos difíciles de mi vida, por quererme y cuidarme como a una hija.

A mis hermanos Elias y Liz, a mis sobrinitos Rafa y Miguel por darle a mi vida otro motivo más para ser una mejor persona.

A todas las personas que a lo largo de la carrera en diferentes etapas han llegado a mi vida, y se quedaran en ella, que me ayudaron a crecer como persona, a superar mis propias barreras, que han formado parte de mi familia, familia que ha sido escogida por mi, hermanos, hermanas, primas, etc.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Marinas y a la Universidad Autónoma de Baja California, por el apoyo que como alumnos nos brinda, becas y asistencia a eventos académicos.

A CONACYT por la beca otorgada por medio del proyecto no. 91168 "Maduración gonadal y de ovocitos como alternativa para incrementar la eficiencia de fertilización en la almeja generosa (*Panopea spp*)" y la UABC por la beca otorgada a través del proyecto 15a Conv. Interna No. 403/1/C/70/15 "Estudios base para evaluar la factibilidad técnica de cultivo y/o repoblamiento de la almeja generosa, *Panopea generosa*, en el campo".

A dos de los profesores que fueron como padres en la carrera, a mi tutor el Dr. Héctor Bustos Serrano por su guía y ayuda, y al Dr. Zaúl García Esquivel por su apoyo, sus pláticas y dirección, muchas gracias a los dos.

A la M. C. Ruth Elena Montenegro y al M. C. Francisco Ley Lou por su ayuda en la revisión y consejos para la realización de este trabajo.

A todos los profesores que de alguna manera contribuyeron en mi desarrollo y me ayudaron a creer que podía y a darme seguridad, muchos que aunque nunca se dieron cuenta fueron un gran estímulo para mí, a Paty, Luis Aguilar, Víctor Zavala, Beatriz Martín Atienza, Elizabeth Orellana, Pancho Ley, Alberto Sanchez...

Es imposible mencionar los nombres de todas las personas que han estado ahí para lo que sea, pero saben que tiene un lugar importante en mi vida, desde el inicio de este camino me acompañaron y compartimos tantas horas de clase, estudio, desvelos, diversión y discusiones. Al último grupo que llego a llenar otro espacio de mi vida, mi equipo de laboratorio, con quienes también e compartido tanto momentos de trabajo como de diversión.

INDICE

RESUMEN	i
PAGINA DE APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE	v

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Desarrollo larval de <i>P. generosa</i>	2
1.3 Cultivo larval en laboratorio y uso de antibióticos	4
1.3.1 Antibióticos	5
1.3.2 Cloranfenicol	6
1.3.3 Gentamicina	7
2. ANTECEDENTES	8
3. OBJETIVO	12
4. VARIABLES	13
5. METODOLOGÍA	13

5.1 Diseño Experimental y mantenimiento de larvas	13
5.2 Estadística	16
6. RESULTADOS	17
6.1 Cloranfenicol	17
6.2 Gentamicina	18
7. DISCUSIONES	19
8. CONCLUSIONES	25
9. REFERENCIAS	26
LISTA DE FIGURAS	31
FIGURAS	32
TABLAS	39
ANEXO I	42
ANEXO II	43

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

La almeja generosa forma parte importante de las pesquerías ribereñas de la costa noroccidental de México, debido a su abundancia y al alto valor económico que tiene en el mercado, el cual se compone principalmente de países asiáticos (INP-SAGARPA, 2007). Otro factor que la hace importante en las pesquerías es la talla y peso que logran alcanzar (hasta 5 kg de peso y 25 cm de largo de concha), además de la escasez de estudios sobre su biología y su lento crecimiento, pues llega a tardar años en alcanzar su talla comercial (Valero, et al., 2004). Estos bivalvos se encuentran desde la zona intermareal baja hasta profundidades cercanas a los 110m, a lo largo de la costa oeste de Norteamérica, desde Alaska hasta Baja California (Goodwin y Pease, 1987).

Los organismos adultos presentan dos sifones contráctiles, que pueden extenderse hasta 1 m de longitud. Estos largos sifones no poseen tentáculos ya que esto solo se limita a etapas post-larvales tempranas (Goodwin y Pease, 1989). Este bivalvo posee un manto extremadamente grande, por lo tanto las conchas no lo pueden encerrar por completo. La bisagra tiene un diente cardinal grande en cada valva. El diente en la valva izquierda es siempre el más grande. Además, tiene una amplia marca del seno paleal en la concha y tiene los aductores (anteriores y posteriores) tamaños similares (Goodwin y Pease, 1989).

Andersen (1971) encontró que la talla de madurez sexual de la almeja generosa es muy variable. La almeja más pequeña de su muestra con madurez

sexual (n=365) tenía 45 milímetros de largo (todas las longitudes refieren a longitud de la concha). De las almejas muestreadas, el 50% eran maduras con una talla 75 milímetros y una edad que Andersen estimó de 3 años.

Panopea generosa presenta un ciclo reproductivo anual simple. La gametogénesis comienza en septiembre y las almejas desovan a partir de marzo a julio (Andersen 1971; Goodwin 1976; Sloan y Robinson 1984). Los machos presentan maduración a edades más tempranas con respecto de las hembras, se puede encontrar espermatozoides en las gónadas de los machos en cualquier mes del año (Goodwin y Pease, 1989).

La distinción de los sexos puede realizarse solamente por observación de las gónadas bajo microscopio. No se han encontrado casos de hermafroditismo en esta especie (Goodwin y Pease, 1989).

1.2 DESARROLLO LARVAL DE *P. generosa*

Un aspecto importante para estudiar en cualquier molusco de interés acuacultural es la etapa larval, ya que en esta es donde ocurren las más altas mortalidades dentro de los sistemas de cultivo. Goodwin *et al.* (1979) reportaron altas mortalidades (80 y 100%) en sus primeros experimentos relacionados con el desarrollo larval de la almeja generosa.

La duración del período larval depende de factores como la temperatura del agua, la salud del cultivo y la presencia de factores químicos. En laboratorio se han reportado períodos larvales con un mínimo de 16 días de duración a 16 °C

(Goodwin y Pease, 1989) y un máximo de 47 días con una temperatura de 14 °C (Goodwin *et al.* 1979).

El desarrollo embrionario empieza con la fertilización del huevo y la división celular. En las primeras 24 horas, se forma la larva Trocófora (80 – 100 µm), la cual presenta un velo provisto de cilios cortos que serán utilizados para la natación. En las siguientes 48 horas, aparece la larva Veliger, la cual permanece hasta el día 16. Esta etapa (veliger), se divide en dos partes, donde la primera es denominada Prodisoconcha I (110 – 165) y aparece la charnela. La segunda es Prodisoconcha II (165 - 400 µm), donde aparece el umbo y es la última etapa planctónica. En el periodo del día 16 al 35, se presenta el estadio de postlarva o Disoconcha (400 – 1500 µm). Al inicio de esa talla el organismo pierde su velo, desarrolla un “pie” y se metamorfiza, terminando así la etapa de nado libre en la historia de vida de la almeja (Goodwin *et al.* 1979).

Una vez metamorfizadas, las semillas desarrollan espinas dorsales en el borde cada vez mayor de la concha y comienzan a arrastrarse con su pie desarrollado recientemente. La metamorfosis es una fase crítica en la vida de la almeja, marcando un cambio de la forma de vida de una existencia planctónica en la columna de agua a un estilo cada vez más sedentario en la superficie del fondo marino. La metamorfosis puede ser retrasada cuando se estresa a los organismos o cuando las señales ambientales críticas para disparar la metamorfosis están ausentes (Goodwin y Pease, 1989).

1.3 CULTIVO LARVAL EN LABORATORIO Y USO DE ANTIBIÓTICOS

La acuicultura en la actualidad, ha tenido grandes avances, resultado del mejoramiento en las técnicas de cultivos de alto rendimiento; esto ha permitido, por un lado, un incremento en la producción en la acuicultura, pero también han aparecido, con mayor frecuencia, enfermedades en los organismos en cultivo, provocando altas mortalidades y pérdidas económicas (Alderman, 1988).

En sistemas controlados es esencial contar con una buena eficiencia de supervivencia larval, ya que de ello depende la producción de semilla, justo en esta etapa es en donde se utilizan antibióticos para el cultivo de distintas especies de invertebrados (Smith y Chanley, 1975), y es recomendable aplicarlos sólo en casos de emergencia provocados por la eventual aparición de bacteriosis. En caso de usarse se aplican antibióticos de amplio espectro como el cloranfenicol y la gentamicina (Pascual y Castaños, 2000).

Los microorganismos presentes en el cultivo de invertebrados pueden ser inhibidos o eliminados con el uso de antibióticos, o mediante una combinación de estos y limpieza frecuente de los organismos en experimentación. Los antibióticos no pueden ser usados indiscriminadamente, ya que pueden resultar más tóxicos para el invertebrado que para los microorganismos contaminantes, y unos pueden ser desactivados en menor tiempo que otros. Por lo anterior es muy importante conocer las concentraciones de antibióticos adecuadas (Smith y Chanley, 1975).

Los cultivos de invertebrados favorecen la presencia de bacterias, flagelados y protozoarios, los cuales pueden llegar a ser dominantes en los sistemas de cultivo. Los miembros que dan más problemas son algunas especies de bacterias, hongos y protozoarios, los cuales eventualmente van causando la muerte de los invertebrados (Smith y Chanley, 1975).

1.3.1 Antibióticos

Los antibióticos son compuestos relativamente sencillos, producidos por bacterias u hongos que atacan específicamente a las bacterias; interfiriendo en algún paso del metabolismo donde encuentran un punto de acción (Sánchez de Rivas, 2006).

Los antibióticos se agrupan de acuerdo a su mecanismo de acción aunque no compartan una estructura química similar. Algunos actúan sobre la síntesis de las envolturas bacterianas, membrana o pared celular, otros sobre el proceso de replicación del ADN, de transcripción, en la biosíntesis de proteínas o sobre el metabolismo (Sánchez de Rivas, 2006). Otro aspecto importante de los antibióticos es que no todos terminan matando y lisando a las bacterias, algunos sólo impiden su crecimiento (Sánchez de Rivas, 2006).

Esto permitió clasificar a los antibióticos en dos grandes grupos (Sánchez de Rivas, 2006 y Madigan *et al*, 1999):

- Bactericidas: Provocar la lisis bacteriana o destrucción de los microorganismos. Comprenden: Beta-lactámicos (Penicilinas y

cefalosporinas), Glicopéptidos (vancomicina), Aminoglucósidos (gentamicina), Quinolonas (norfloxacino, ácido nalidixico) y Polimixinas.

- Bacteriostáticos: Son agentes antibacterianos, que impiden el desarrollo y la multiplicación de los microorganismos, pero que no los destruyen; requieren el complemento del sistema inmunológico defensivo del huésped, para dominar definitivamente la infección. Comprenden: Macrólidos (Grupo eritromicina), Tetraciclinas, Cloranfenicol, Clindamicina, Lincomicina y Sulfamidas.

Los antibióticos seleccionados para la realización de este experimento fueron cloranfenicol y gentamicina en base a la literatura consultada.

1.3.2 Cloranfenicol

El cloranfenicol es un antibiótico clásico de amplio espectro que es producido por diversas especies del género bacteriano *Streptomyces*. Este agente antimicrobiano es único entre los compuestos naturales ya que contiene un grupo nitrobenceno conectado a un grupo propanol, así como un grupo amino conectado a un derivado del ácido dicloroacético. (Morales, *et al.*, 2007).

La molécula del cloranfenicol es pequeña y con características poco polares, es capaz de difundirse a través de células eucarióticas y paredes de células procarióticas, tiene solubilidad lipídica (Morales, *et al.*, 2007).

El mecanismo de acción principal del cloranfenicol sobre diversas bacterias, involucra la inhibición de la síntesis de proteínas en las cepas sensibles. Impide que los aminoácidos sean llevados por el ARNm a los ribosomas y no ocurre de manera precisa la traducción por lo que las proteínas no se forman. La inhibición de la síntesis de proteínas causada por el cloranfenicol en la mayoría de los microorganismos susceptibles produce un efecto bacteriostático (Morales, *et al.*, 2007).

1.3.3 Gentamicina

Los aminoglucósidos como la gentamicina inhiben la síntesis proteínica de los microorganismos. Son relativamente tóxicos en comparación con otras clases de antibióticos pero siguen siendo útiles, más bien para tratar infecciones causadas por bacterias gramnegativas aerobias. A pesar de que casi todos los inhibidores de la síntesis proteínica de los microbios son bacteriostáticos, los aminoglucósidos son bactericidas (Chambers y Sonde, 1996).

Los antibióticos aminoglucósidos son bactericidas rápidos. La destrucción de la bacteria depende de la concentración, y cuanto más alta es ésta, mayor es la rapidez con que destruye a los microorganismos (Kapusnik *et al.*, 1988; Blaser, 1991).

La gentamicina es un antibiótico de amplio espectro obtenido de especies del actinomiceto *Micromonospora*. Posee espectro de actividad muy amplio y es usado en forma extensa, es el aminoglucósido de primera elección por su bajo

costo y su actividad fiable contra casi todos los aerobios gramnegativos (Chambers y Sonde, 1996).

2. ANTECEDENTES

El antibiótico más utilizado en pectínidos es el cloranfenicol a concentraciones entre 0.25 a 8 mg/l, ya que tiene un amplio espectro y alta estabilidad en el agua de mar, y aumenta significativamente la sobrevivencia larvaria y la sobrevivencia postmetamorfosis de *Argopecten purpuratus* (Uriarte, 2008).

Campa-Córdova *et al.* (2006) realizaron un estudio sobre los efectos de 3 antibióticos (cloranfenicol, eritromicina y furazolidona) suministrados a 3 distintas concentraciones en microalgas (*Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*) usadas para alimentar larvas de la escalopa (*Argopecten ventricosus*). La exposición al antibiótico (excepto furazolidona que inhibió el crecimiento) no tuvo un efecto significativo sobre las microalgas, pero si tuvo un efecto positivo en la supervivencia de las larvas y una disminución en la población de bacterias.

Se tienen reportes de alta supervivencia en larvas de *Tridacna gigas* con tratamientos de 5-7 mg/l de eritromicina, oxitetraciclina, estreptomicina o cloranfenicol, durante los primeros 2 días de desarrollo (Braley, 1986). También cloranfenicol y eritromicina en concentraciones de 8mg/l aumentan la supervivencia de larvas de *Pecten maximus* (Robert *et al.* 1995).

Guerrero-Martínez (1992) demostró el efecto benéfico de los antibióticos en larvas de gasterópodos. Así, larvas del caracol *Astraea undosa* mostraron buenos resultados con el antibiótico sulfametazina en el rango de 25 a 50ppm, con el cual se logró el 70% de sobrevivencia al tercer día, mientras que sin la ayuda de antibiótico las larvas murieron al segundo día.

Los antibióticos cloranfenicol y ciprofloxacina dieron resultados positivos en las cuatro fases de desarrollo de *Artemia franciscana* (nauplios, metanuplios, juveniles y adultos), mostrando halos de inhibición contra la bacteria *Aeromonas hydrophila* (Castro-Mejía, 2005).

Se trataron juveniles de *Rhamdia quelen* infestados por *Ichthyophthirius multifiliis* con cloranfenicol, cloranfenicol + sal, oxitetraciclina, oxitetraciclina + sal y solo agua (control). La sobrevivencia en los tratamientos con cloranfenicol + sal y oxitetraciclina + sal fue significativamente más alta que en los otros tratamientos. El tratamiento con cloranfenicol presento mayor sobrevivencia que el tratamiento con oxitetraciclina y ambos mostraron una diferencia significativamente mayor que el control (Segura de Andrade, *et al.*, 2006).

Alvarez, *et al.* (2002) utilizaron tejidos de peces (*Mugil curema*) y crustáceos (*Litopenaeus schmitti*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*), para determinar sensibilidad de distintos miembros del genero *Vibrio* a 12 antibióticos. Considerando los vibrios en general, se observo una alta resistencia ($R \geq 50\%$) a la eritromicina (15µg), estreptomicina (10µg), kanamicina (30µg), novobiocina (30µg), penicilina G (10 UI), polimixina B (300µg), tetraciclina (30µg) y triple sulfa

(300µg), no así al ácido nalidíxico (30µg), cloranfenicol (30µg), gentamicina (10µg) y la sulfonamida potenciada (25µg).

Vaseeharan *et al.*, (2004) determinó que la bacteria *Listonella anguillarum* (presente en cultivos de camarones) mostraba resistencia a antibióticos como la ampicilina (100%), clorotetraciclina (80%), estreptomina (60%) y penicilina G (30%), en cambio se observó sensibilidad ante la kanamicina (90%), gentamicina (70%) y eritromicina (60%).

Al aislar a *Aeromonas hydrophila* esta mostró susceptibilidad a gentamicina (10µg) y al ácido nalidíxico (30µg), en cambio mostró resistencia a ampicilina (10µg), eritromicina (15µg), lincomicina (2µg), penicilina (10 UI) y a sulfazotrim (25µg) y susceptibilidad intermedia a la tetraciclina (30µg) por una prueba de susceptibilidad antimicrobial (Segura de Andrade, *et al.*, 2006).

Se sabe que la almeja generosa, *Panopea generosa*, es una especie delicada y frágil, y se han reportado mortalidades masivas durante el cultivo de estadios larvales, aún en presencia del antibiótico tetraciclina (12ppm), el cual tuvo además un efecto retardador del crecimiento (Goodwin *et al.*, 1979).

Es importante notar que los tratamientos con antibióticos que están actualmente disponibles tienen un amplio espectro, y los antibióticos que son utilizados en acuicultura y que se encuentran aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) no son efectivos para todas las enfermedades bacterianas de los organismos acuáticos cultivados (Pillay, 1992). Por lo mismo, es importante explorar el uso experimental de antibióticos alternativos como

herramienta potencial para mejorar el desempeño y sobrevivencia larval de esta especie.

3. OBJETIVO

Probar el efecto de los antibióticos de amplio espectro, cloranfenicol y gentamicina, sobre el crecimiento y sobrevivencia de las larvas de *Panopea generosa*.

4. VARIABLES

En cada tratamiento se midieron los cambios temporales en la talla (largo y ancho) y sobrevivencia (%) de larvas de *P. generosa*, cultivada en recipientes experimentales en presencia de antibióticos.

5. METODOLOGIA

Las larvas utilizadas en este experimento fueron obtenidas en el laboratorio de Biotecnología de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, a partir de reproductores traídos de San Quintín y acondicionados en las instalaciones del mismo. Se llevó a cabo una corrida larval en el 2009 y otra en el 2010.

5.1 Diseño Experimental y mantenimiento de larvas

En cada corrida se utilizó un diseño experimental aleatorio simple que consistió en un factor de prueba (antibiótico) x 4 tratamientos (concentraciones de antibióticos) x 3 réplicas (cubetas de plástico). En 2009 se utilizaron simultáneamente 4 concentraciones del antibiótico cloranfenicol (0, 3, 6, 9 mg l⁻¹), y dichas concentraciones se repitieron para el antibiótico gentamicina en la corrida del 2010.

Para cada corrida se montó un sistema consistente en 12 cubetas (unidades experimentales) de 7L de capacidad colocadas dentro de una charola de fibra de vidrio (239 x 72.5 x 14.5cm) llena con agua de mar, que sirvió para mantener

una temperatura constante de $16 \pm 1^{\circ}\text{C}$ con la ayuda de un enfriador de serpentín. A cada cubeta se le agregaron 6l de agua de mar filtrada ($1\mu\text{m}$) y pasada por UV. También se mantuvo aireación suave en cada una de las cubetas utilizando mangueras de silicón (Figura 1). Las cubetas fueron marcadas con la concentración del antibiótico utilizada (0, 3, 6 y 9mg/l), y ordenadas en la charola de acuerdo a un diseño aleatorio simple. Para cada concentración se utilizaron 3 réplicas. Una vez armado el sistema, las larvas fueron concentradas en un tamiz, contabilizadas, y agregadas a las cubetas (Figura 2), utilizando una cantidad inicial aproximada de 6,000 larvas por cubeta.

Diariamente las larvas fueron alimentadas con *Isochrysis galbana* a una concentración de acuerdo a la etapa de desarrollo (30,000 a 80,000cel/ml para larvas, y de 100,000 a 150,000cel/ml para semillas). La limpieza de las cubetas, así como la remoción de cadáveres y basura se realizó 2 veces por semana utilizando tamices de diferentes tamaños de malla (de acuerdo al tamaño de la larva) y una manguera para sifonear. Las larvas de cada cubeta fueron concentradas en los tamices y posteriormente se pasaron a un recipiente de 500 ml utilizando una pizeta. Después se homogenizaron y de este recipiente se tomó una muestra de 1ml utilizando un pipeteador automático para estimar el número de organismos vivos (Figura 4). Una vez obtenida la muestra se observó en el microscopio compuesto para realizar su conteo y la medición de la talla. Después esta se guardó en un microtubo de 1.5 ml para su posterior revisión en caso de ser necesario. La muestra se fijó con unas gotas de formol salino que se preparó de acuerdo a la siguiente proporción: 100ml de formol (se

utilizo formol al 10%), 900ml de agua destilada y 8.5gr de cloruro de sodio (Drury y Wallington, 2009).

Las cubetas vacías se lavaron con agua y jabón, así como las mangueras de aireación y las rocas utilizadas como peso muerto de las mangueras de aireación (Figura 3). Después del muestreo la cubeta se volvió a llenar con agua previamente filtrada, pasada por UV y ozonificada, y al estar llena se agregó el antibiótico en las cantidades que se muestran en la tabla I para 6L de agua.

Para la última evaluación de talla y determinación de densidad final de organismos se utilizó un microtubo eppendorf, Al que se le agregaron las semillas que cabían en un volumen de 1ml y se contabilizaron. Después se concentraron las semillas de cada cubeta de manera individual y se pasaron al tubo eppendorf, se tomó el volumen y se hizo una relación con la cantidad de semillas obtenidas en el volumen de 1ml tomadas previamente.

La sobrevivencia larval (S) se estimó de la siguiente manera:

$$S (\%) = (N_t/N_i) * 100$$

Donde: N_i y N_t = cantidad inicial y al tiempo t de larvas o poslarvas presentes en la cubeta.

La tasa de crecimiento bruto se calculó para las larvas de cada una de las cubetas mediante regresión lineal de talla vs. tiempo, tomando la pendiente de la recta como la tasa de crecimiento.

5.2 Estadística

El porcentaje de sobrevivencia y la talla de los distintos tratamientos se compararon a lo largo de cada experimento mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), teniendo como factores de prueba la concentración del antibiótico y el tiempo. La tasa de crecimiento se comparó mediante ANOVA de una vía. Previo al análisis se corrieron pruebas de normalidad y homoscedasticidad.

6. RESULTADOS

6.1 Cloranfenicol (2009)

Durante el periodo de tratamiento se observó que las larvas tratadas con cloranfenicol tuvieron un crecimiento mayor que las control (agua de mar), ya que se empezó a ver el inicio de la metamorfosis alrededor del día 25 con las de mayor concentración de antibiótico (6 y 9mg/l) con una talla de 350µm, y entre el día 27 y 29 (330 y 380µm) para las del tratamiento con 3mg/l. En cambio para el control se llegó al día 34 y aún no empezaban a metamorfizar presentando una talla de 318µm (Tabla I), lo anterior aplica de igual manera para la tabla II, en donde se muestra el ancho de la concha y se ve como para el día 34 los organismos del control no habían pasado las 283µm en cambio los tratados con cloranfenicol tenían mas de 447µm.

Las figuras 5 y 6 muestran como los tres tratamientos en los que se utilizó el cloranfenicol tuvieron un incremento mayor de longitud (largo y ancho) de la concha que el control. La tasa de crecimiento para el tratamiento sin antibiótico fue de 6 µm/día, mientras que para las concentraciones de 3, 6 y 9mg/l fue de 12, 13 y 14 respectivamente (Tabla V).

No se observó una diferencia significativa en el crecimiento entre tratamientos con antibiótico pero si entre estos y el control (ANOVA, $F= 10.099$, $P < 0.001$, ANEXO I), y se encontró diferencia significativa a través del tiempo (ANOVA, $F= 10.099$, $P < 0.001$, ANEXO I) ya que si hubo crecimiento por parte de los organismos en el transcurso de los 34 días de experimento.

Los organismos tratados con cloranfenicol que ya habían metamorfozido mostraban un pie grande, sifón, branquias y espinas en la concha (Figura 9). Los tratamientos de 3mg/l y el control (Figura 10) tenían pocos organismos sin metamorfozizar. En algunos casos se pudo notar como habían organismos que aunque eran de la misma fecha de desove presentaban una gran diferencia de tamaño.

El porcentaje de sobrevivencia (después de 34 días) al utilizar la concentración de 9mg/l fue del 93%; para el tratamiento de 6mg/l fue de 83%; con 3mg/l de 86%, y para el control 56% (Tabla VI).

6.2 Gentamicina (2010)

Se observó una talla de metamorfosis en las larvas que fueron sometidas a las dos mas altas concentraciones de gentamicina (9 y 6mg/l) alrededor del día 31 (con una talla de 372.9 y 377.69µm de largo de concha respectivamente), para el tratamiento de 3mg/l la talla de metamorfosis se observo en el día 36 y fue de 341µm, mientras que las del control empezaron a metamorfozizar alrededor del día 31 con una talla de 366.3µm, lo cual se puede observar en la tabla III, y de igual manera en la tabla IV se ve el crecimiento de la concha a lo ancho durante este periodo.

En las figuras 7 y 9 se puede ver el crecimiento (largo de concha) que tuvieron las larvas de los cuatro tratamientos, el cual no mostró una diferencia significativa entre alcanzado por el control y el del antibiótico (ANOVA, $F=2.294$,

$P < 0.001$, ANEXO 2), pero si se tuvo una diferencia significativa con respecto del tiempo (ANOVA, $F=0.472$, $P= 0.971$, ANEXO 2) porque mostraron un incremento de tamaño durante los 38 días de experimento.

Las tasas de crecimiento obtenidas en los tratamientos con antibiótico y el control presentaron valores muy cercanos ya que el control tuvo una tasa de crecimiento de $13 \mu\text{m}/\text{día}$ mientras que las concentraciones de 3, 6 y 9mg/l tuvieron valores de 12, 17 y $15 \mu\text{m}/\text{día}$ respectivamente (Tabla IV).

En esta corrida en la que se utilizó gentamicina se observaron más almejas en estadio de desarrollo larval (después de 34 días) (Figura 10) y al igual que con cloranfenicol los que ya habían metamorfoseado mostraban pie grande, branquias y las espinas de la concha como se muestra en la figura 9.

A pesar de la falta de diferencias en la talla de los organismos entre tratamientos, los tratamientos en los que se utilizó el antibiótico tuvieron una sobrevivencia más alta que el control. Con la concentración de 9mg/l fue de 69%, con 6 y 3mg/l 32 y 9% respectivamente, para el control fue de 6% (Tabla VI).

7. DISCUSIONES

En la primera corrida con cloranfenicol como antibiótico se vio como el tratamiento de 9mg/l (máxima concentración utilizada) influyó de manera positiva sobre el crecimiento y el inicio de la metamorfosis, ya que las larvas estaban llegando a esta etapa en el día 25 aproximadamente (talla de $350\mu\text{m}$). En

cambio en el tratamiento control las larvas presentaban tallas de 318µm para el día 34 y aún no empezaban a metamorfizar.

En contraste, para la corrida con gentamicina en todos los tratamientos se llegó a la metamorfosis entre los días 31 y 36, por lo que no observó una marcada diferencia entre el antibiótico y el control, como se puede observar en la tabla III.

Las larvas tratadas con 9mg/l y 6mg/l de cloranfenicol estaban llegando a la metamorfosis cerca del día 25 y 29 respectivamente, mientras que con gentamicina lo estaban haciendo alrededor de los días 31 y 36. Goodwin *et al.* (1979) reportaron en estudios un periodo larval para *Panopea generosa* de 47 días a una temperatura de 14°C y de 30 días para una temperatura de 17.6°C, tiempo mayor al obtenido en el desarrollo de la corrida en la que se utilizó cloranfenicol (tratamiento 9mg/l).

La etapa poslarval (post-metamórfica) fue claramente identificada en el presente estudio, ya que las poslarvas desarrollaron espinas en la orilla de la concha poslarval llamada disoconcha (Fig. 9). Estas características coinciden con lo reportado previamente por Goodwin *et al.* (1979) para esta especie, quienes indican además que la metamorfosis de *P. generosa* ocurre cuando la longitud de la concha alcanza entre 350-400 µm, y esto marca el cambio en su estilo de vida de una existencia planctónica a un estilo sedentario en el fondo marino .

En el caso de la corrida en la que se utilizó cloranfenicol, el tratamiento con el mejor resultado fue el de 9mg/l con una tasa de crecimiento 2.22 veces mayor que el control y en el caso de gentamicina donde el mejor resultado también fue utilizando la concentración de 9mg/l, esta fue 1.15 veces mayor que el control.

Con respecto a la sobrevivencia, ésta fue del 93% con los 9mg/l de cloranfenicol, mayor a la de los tratamientos de menor concentración y el control (56%), el mismo comportamiento se obtuvo con la mayor concentración de gentamicina que fue del 69% y de 6% con el control. Por lo que podemos ver que ambos antibióticos tienen un efecto positivo en la sobrevivencia larval de *P. generosa* (Tabla VI).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede decir que en el caso de *P. generosa* resultó más efectiva la utilización de cloranfenicol ya que no solo aumentó la sobrevivencia como se observó en los dos experimentos realizados, sino que además las larvas lograron metamorfizar antes (9 días antes con el tratamiento de 9mg/l).

La mayor sobrevivencia y mejor tasa de crecimiento mostrada por las larvas tratadas con cloranfenicol en comparación con la gentamicina, se pudo deber a que el cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro (bacterias gramnegativas, grampositivas y anaerobias) mientras que la gentamicina es usada para tratar infecciones causadas por bacterias gramnegativas aerobias principalmente (Chambers y Sonde, 1996).

La mejor dosis de cloranfenicol obtenida en este experimento estuvo en los rangos de 9 a 3mg/l, no mostrando una diferencia significativa entre éstas.

Uriarte *et al.* (2001) determinaron la dosis de cloranfenicol con la que se tendrían los mejores resultados tanto de sobrevivencia como de tasas de crecimiento de larvas de *Argopecten purpuratus*. Las tasas de crecimiento fueron 2.3 ± 0.3 y $2.6 \pm 0.2\%$ por día usando 2 y 8 mg/l del antibiótico respectivamente, y sin antibiótico fue de $1.3\% \pm 0.2$. También reportaron una metamorfosis más alta utilizando 8mg/l que el tratamiento sin antibiótico, entre el 75 y 79 % metamorizaron con concentraciones de 2 y 8mg/l, cuando solo 55.5% metamorizaron sin el.

En el desarrollo de este experimento se observó una sobrevivencia mayor (93%) utilizando 9mg/l de cloranfenicol que el control que fue de 56%, similar a lo reportado por Uriarte *et al.* (2001) que obtuvieron una sobrevivencia del 50% con el antibiótico mientras que sin el antibiótico fue del 35%.

Las concentraciones de cloranfenicol utilizadas en la corrida 2009 (3, 6 y 9mg/l) se encuentran dentro de los rangos descritos como efectivos en otros estudios realizados como el de Braley (1986) quien observó una alta sobrevivencia en larvas de *Tridacna gigas* al utilizar cloranfenicol en concentraciones de 5-7mg/l durante los dos primeros días de desarrollo, Robert *et al.* (1995) utilizaron concentraciones de 8mg/l de este antibiótico para aumentar la sobrevivencia larval de *Pecten maximus* y al igual que los autores anteriores Campa-Cordova *et al.* (2006) en *Argopecten ventricosus*.

Al no mostrar diferencia significativa las tres concentraciones de cloranfenicol entre sí, se puede inferir que si se utiliza la de 3mg/l se seguirían teniendo

resultados positivos y utilizando una menor cantidad de antibiótico lo que resultará en menos gastos de tratamiento.

Es importante mencionar que el uso de cloranfenicol en organismos marinos destinados a la alimentación humana no está aprobado por la FDA, sin embargo se utiliza a nivel experimental, comercial e informal ya que es un antibiótico de amplio espectro que ha tenido resultados positivos en distintos estadios larvales de moluscos bivalvos entre los que se encuentra *P. generosa*. Así, de manera experimental se ha estado utilizando el cloranfenicol en distintos organismos marinos como lo son: los peces *Rhamdia quelen* y *Mugil curema* (Segura de Andrade, et al., 2006; Álvarez, et al. 2002), crustáceos (*Litopenaeus schmitti*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*) reportado por Álvarez, et al. en el 2002; y distintos moluscos como el caracol *Astraea undosa* (Guerrero-Martínez (1992), escalopas como *Argopecten purpuratus* (Uriarte, 2008), *Argopecten ventricosus* Campa-Córdova et al. (2006), *Pecten maximus* (Robert et al. 1995) y la almeja gigante *Tridacna gigas* (Braley, 1986). Los estudios anteriores han sido realizados para determinar dosis en las que se logra tener el mejor crecimiento y sobrevivencia de los organismos tratados.

El uso rutinario, incluso 2 veces por día, de compuestos antimicrobianos, incluidos algunos utilizados en terapéutica humana (como el cloranfenicol), es una práctica mundial común en los laboratorios de cultivo de larvas a nivel comercial (Álvarez, et al. 2001). En Malasia y Singapur es utilizado en granjas de camarones, de peces marinos y ornamentales, y se administra generalmente junto con el alimento en concentraciones de 3-5 gm/kg (Shariff M., et al. 1996).

En Filipinas se ha utilizado el cloranfenicol en etapas larvales y post larvales de *Penaeus monodon* para combatir vibriosis causadas por *Vibrio Harvey* y *V. splendidus* en concentraciones de 2-4ppm, todos los días (Baticados et al. 1990, Baticados y Paclibare 1992), en Taiwan también se utiliza para combatir vibriosis (*Vibrio anguillarum*) en anguilas (Kou et al. 1988) y larvas de camarón (Liao et al. 1992).

De manera informal se tiene registros sobre el uso de cloranfenicol en criaderos de langostinos y camarón en Ecuador, China, Vietnam e Indonesia en donde se ha estado regulando su uso debido a la falta de información sobre dosis a utilizar y la presencia del antibiótico en organismos antes de ser consumidos (Ferrero 2009; RI1; Lazaroff, 2002), lo que implica un gran riesgo para el ser humano ya que puede causar anemia aplásica, entre otras cosas debido a su toxicidad sobre las células sanguíneas y médula ósea (Morales, et al. 2007).

En el presente estudio el uso del antibiótico fue restringido a la etapa larval. Una vez que metamorfozan se deja de utilizar, por lo que la posibilidad de que sea bioacumulado por el organismo y afecte la salud del ser humano al ser consumido es nula, ya que pasan cerca de 4 años desde la administración del mismo hasta su captura en campo (tiempo suficiente para que lo elimine de su sistema). No obstante, es importante el realizar estudios sobre el tiempo que permanece el cloranfenicol en *Panopea generosa* así como es el estudio de los efectos bioquímicos fisiológicos del fármaco sobre el organismo.

Goodwin et al. (1979) utilizaron tetraciclina (aprobada por la FDA) a una concentración de 12ppm en el desarrollo larval de *P. generosa* sin resultados favorables, además de no tener un buen porcentaje de sobrevivencia tuvo un efecto retardador del crecimiento.

8. CONCLUSIONES.

- ❖ Tanto la gentamicina como el cloranfenicol lograron aumentar la sobrevivencia larval de *P. generosa*.
- ❖ Las larvas tratadas con cloranfenicol mostraron la mayor tasa de crecimiento y por lo tanto una menor duración del periodo larval.
- ❖ El crecimiento entre los tratamientos con gentamicina no mostró diferencia significativa entre éstos y el control.
- ❖ Es importante estudiar el tiempo de residencia y la farmacodinámica de estos antibióticos en *Panopea generosa*.

9. REFERENCIAS

- Alderman, D.J. 1988. Fisheries chemotherapy a review. pp. 1-61. En: Recent Advances in Aquaculture, vol. 3. Muir, J.F. Roberts, R.J. (Eds.). Croom Helm. London, United Kingdom and Timber Press, Portland, Or.
- Álvarez, J. D., B. Austin, A. M. Álvarez y C. P. Agurto. 2001. Resistencia a los antimicrobianos de vibrios aislados de peces y camarones marinos en Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2 (11): 139-148.
- Andersen, A.M., Jr. 1971. Spawning, growth and spatial distribution of the geoduck clam, *Panope generosa* (Gould) in Hood Canal, Washington. Ph.D. Thesis. University of Washington, Seattle. 133 pp.
- Baticados C. L., C. R. Lavilla-Pitogo, E. R. Cruz-Lacierda, L. D. de la Peña y N. A. Suñaz. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis. Aquat. Org.* 9:133-139.
- Baticados C.L. y J. O. Paclibare. 1992. The use of chemotherapeutic agents in aquaculture in the Philippines. In: Shariff M., R. P. Subasinghe y J. R. Arthur eds. *Diseases in Asian Aquaculture I*. pp 531-546. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Blaser, J. 1991. Efficacy of once- and thrice-daily dosing of aminoglycosides in in-vitro models of infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 27 Suppl C: 21-28.
- Braley, R.D. 1986. Reproduction and recruitment of giant clams and some aspects of their larval and juvenile biology. Doctoral Thesis, NewSouthWalesUniversity, Kensington, N.S.W., Australia. 297 pp.
- Campa-Córdova, A. I., A. Luna-González, F. Ascencio, E. Cortés-Jacinto y C. J. Cáceres-Martínez. 2006. Effects of chloramphenicol, erythromycin and

furazolidone on growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis*. Aquaculture. 260: 145-150.

Castro-Mejía, G. 2005. Incorporación de tres antibióticos en nauplios, metanauplios, juveniles y adultos de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906) para inhibir el crecimiento de la bacteria *Aeromonas hydrophila*. Tesis de Maestría. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. 77 pp.

Chambers, H. E. y M. A. Sonde. 1996. Fármacos antimicrobianos. Aminoglucósidos. Capítulo 46. En: Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Novena ed. Vol II. MC Graw Hill Interamericana. 1173-1192.

Drury, R.A.B. and E. A. Wallington. 2009. Carleton's Histological Technique. 10% Formalin & Formal Saline (4% Formaldehyde & Formaldehyde Saline). Ed. 5. Oxford University Press. Oxford, UK. En: <http://stainsfile.info/StainsFile/prepare/fix/fixatives/formalin10.htm>

Ferrero, F. 2009. Química y acuicultura: el ejemplo de los langostinos. <http://www.andinia.com/b2evolution/index.php/noticias-aire-libre/ecologia-medio-ambiente/ecosistemas-acuaticos-agua/acuicultura-acuicultura/quimica-y-acuicultura-el-ejemplo-de-los?page=2>

Goodwin, C.L. 1976. Observations of spawnings and growth of subtidal geoducks (*Panope generosa*, Gould). Proc. Nat. Shellfish. Assoc. 6549-58.

Goodwin, L., Shaul, W, Budd, C. 1979. Larval development of the geoduck clam (*Panope generosa*, Gould). Proceedings Natl. Shellfisheries Assoc., 69: 73-76.

Goodwin, C.L., and B. Pease. 1987. The distribution of geoduck (*Panope abrupta*) size, density and quality in relation to habitat characteristics such as geographic area, water depth, sediment type, and associated flora and fauna in Puget Sound Washington. Wash. Dep. Fish. Tech. Rep. No. 102. 44 pp.

Goodwin, L. y B. Pease. 1989. Pacific Geoduck Clam. Species Profiles: Life Histories and Environmental Requirements of Coastal Fish and Invertebrates (Pacific Northwest). Biological Report 82(11.120).

Guerrero-Martínez, L. M. Y. 1992. Caracterización del desarrollo embrionario y larval del caracol *Astraea undosa* (Mollusca: Gasteropoda) en condiciones de laboratorio y el efecto del uso de antibióticos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B. C. 32 pp.

INP-SAGARPA.2007. Plan de manejo para la pesquería de almeja generosa (*Panopea* spp.) en las costas de Baja California, México. 56 pp.

Kapusnik, J. E., C. J. Hackbarth, H. F. Chambers, T. Carpenter, and M. A. Sonde. 1988. Single, large, daily dosing versus intermittent dosing of tobramycin for treating experimental pseudomonas pneumonia. J. Infect. Dis., 755:7-12.

Kou G.H., C. I. Liu y C. K. Liu. 1988. Handbook of Fish Disease. Pig Research Institute Taiwan. Miaoli.129pp.

Lazaroff, C. 2002. Drug Traces Prompt Closer Look at Farmed Seafood. Environment News Service. <http://www.ens-newswire.com/ens/jun2002/2002-06-17-06.html>

Liao I. C., M. S. Su y C. F. Chang. 1992. Diseases of *Penaeus monodon* in Taiwan: a review from 1977 to1991. In: Fulks W, Main KL. eds. Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. p. 113-137. The Oceanic Institute, Waimanalo,HI.

Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 1999. Biología de los microorganismos. 8ª ed. Revisada. Ed. Prentice Hall Iberia. Madrid. 1064 pp.

- Morales, Y. E., M. C. Herrera y J. Muñoz-Rojas. 2007. Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 38 (1): 58-69.
- Pascual, M. y C. Castaños. 2000. Cultivo de ostras cóncavas en Argentina: desde el criadero hasta la cosecha en el mar. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA): 45 pp.
- Pillay, T.V.R. 1992. Aquaculture and environment Fishing News Book. pp. 48-98.
- RI1. 2002. Camarón sin cloranfenicol. El Universo. <http://www.eluniverso.com/2002/05/04/0001/71/9C6171795BF1417786C6EC025F5EF496.html>
- Robert, R., Nicolas, J.L., Miner, P., 1995. Mortality control of *Pecten maximus* larvae in hatchery. 10th International PectinidWorkshop. Cork, Ireland, pp. 51-52. Abstracts.
- Sanchez de Rivas, C. 2006. ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana...?. *Revista QuímicaViva*. 2 (5): 63-77.
- Shariff M., N. Gopinath, F. H. C. Chua y Y. G. Wang. 1996. The Use of Chemicals in Aquaculture in Malaysia and Singapore. In: Arthur J. R., C. R. Lavilla-Pitogo y R. P. Subasinghe eds. *Use of Chemicals in Aquaculture in Asia*. Pp. 127-140. Southeast Asian Fisheries Development Center Aquaculture Department Tigbauan, Iloilo, Philippines.
- Segura de Andrade, L., R. L. Barboza de Andrade, A. Geferson-Becker y B. Baldisserotto. 2006. Survival and behavior of silver catfish, *Rhamdia quelen*, submitted to antibiotics and sodium chloride treatments. *Ciencia Rural*, Santa María. 36 (3): 1004-1007.
- Sloan, N.k, and S.M.C. Robinson. 1984. Age and gonad development in the geoduck clam *Panope abrupta* (Conrad) from southern British Columbia, Canada. *J. Shellfish Res.* 4 (2):131-137.

- Smith, W. L. and M. H. Chanley. 1975. Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press. New York. 286 pp.
- Uriarte, I., A. Farías and J. C. Castilla. 2001. Effect of antibiotic treatment during larval development of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. Aquacultural Engineering. 25(3): 139-147.
- Uriarte, I. 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO. Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 61–75.
- Valero, J. L., C. Hand, J. M. Orensanz, A. M. Parma, D. Armstrong y R. Hilborn. 2004. Geoduck (*Panopea abrupta*) recruitment in the Pacific Northwest: Long-Term changes in relation to climate. CalCOFI Rep. Vol. 45. 7pp.
- Vaseeharan, B., J. Lin y P. Ramasamy. 2004. Effect of probiotics, antibiotic sensitivity, pathogenicity, and plasmid profiles of *Listonella anguillarum*-like bacteria isolated from *Penaeus monodon* culture systems. Aquaculture. 241:77–91.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de cubetas montado para la realización del experimento.

Figura 2. Larvas concentradas en un tamiz de 64 μm antes de ser distribuidas en los distintos tratamientos de antibiótico.

Figura 3. Tamices utilizados en la limpieza y bajado de larvas.

Figura 4. Concentración y homogenización de larvas, para su posterior evaluación.

Figura 5. Tallas (largo de concha) alcanzadas por las larvas durante el desarrollo del experimento en el que se utilizó cloranfenicol como tratamiento.

Figura 6. Tallas (ancho de concha) alcanzadas por las larvas durante el desarrollo del experimento en el que se utilizó cloranfenicol como tratamiento.

Figura 7. Tallas (largo de concha) alcanzadas por las larvas durante el desarrollo del experimento en el que se utilizó gentamicina como tratamiento.

Figura 8. Tallas (ancho de concha) alcanzadas por las larvas durante el desarrollo del experimento en el que se utilizó gentamicina como tratamiento.

Figura 9. Características de postlarvas. A) Espinas alrededor de la concha B) Branquias C) Pie muy desarrollado D) Sifón.

Figura 10. Larva con cilios (aún sin metamorfizar).

FIGURAS



Figura 1. Sistema de cubetas montado para la realización del experimento.



Figura 2. Larvas concentradas en un tamiz de 64 μm antes de ser distribuidas en los distintos tratamientos de antibiótico.



Figura 3. Tamices utilizados en la limpieza y bajado de larvas.



Figura 4. Concentración y homogenización de larvas, para su posterior evaluación.

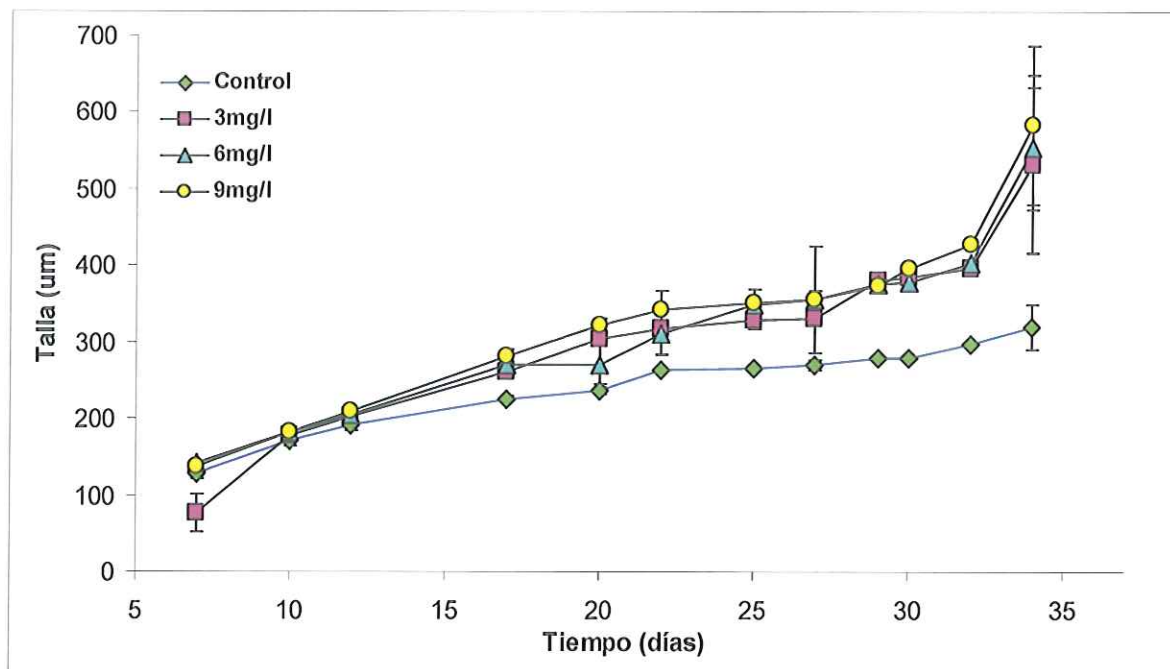


Figura 5. Cambios temporales en la talla (largo de concha) de larvas de *Panopea generosa* tratadas con distintas concentraciones de cloranfenicol.

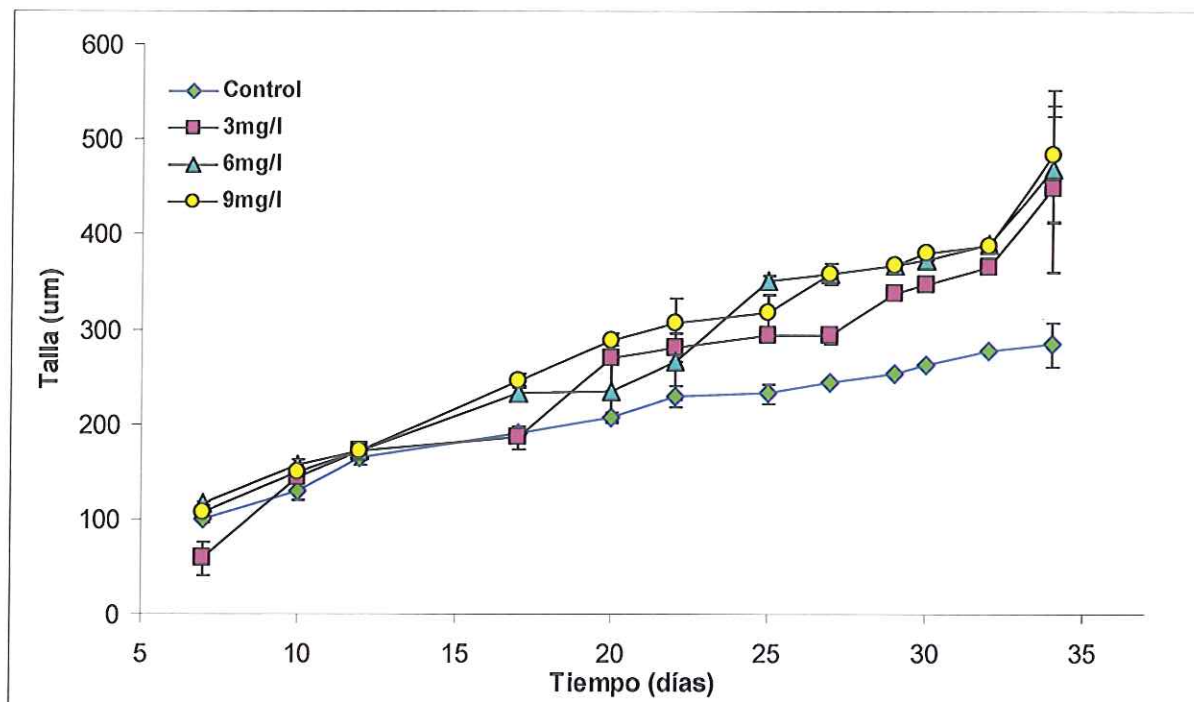


Figura 6. Cambios temporales en la talla (ancho de concha) de larvas de *Panopea generosa* tratadas con distintas concentraciones de cloranfenicol

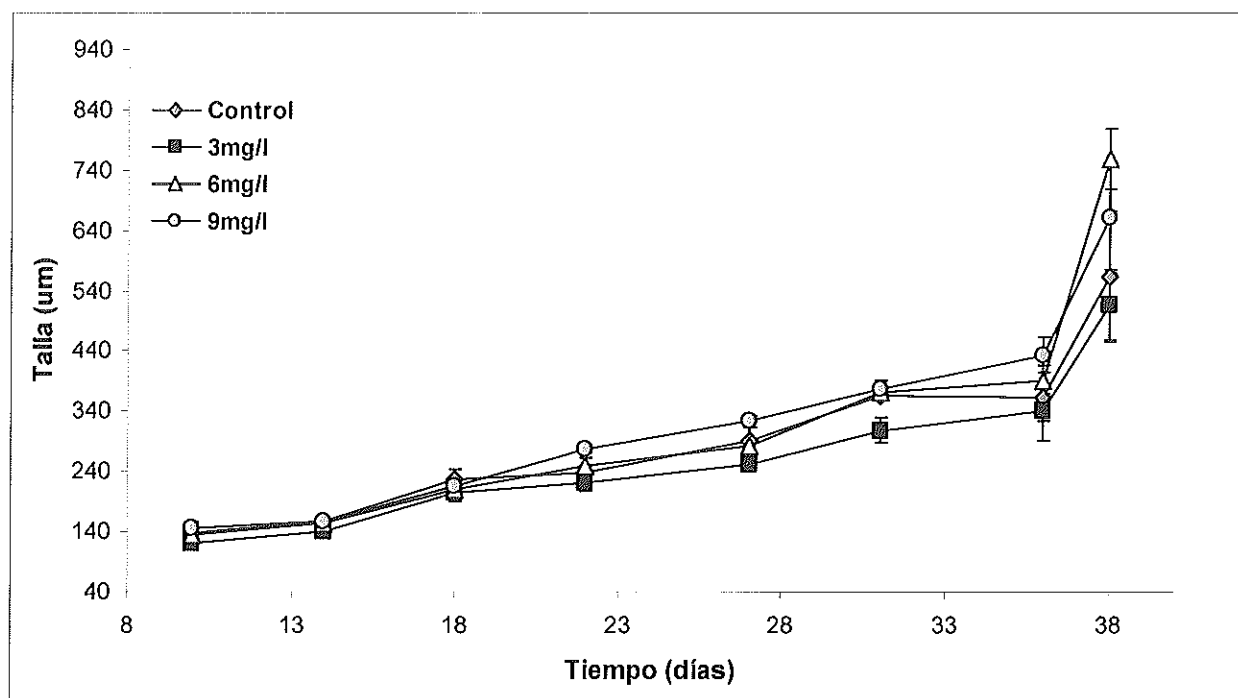


Figura 7. Cambios temporales en la talla (largo de concha) de larvas de *Panopea generosa* tratadas con distintas concentraciones de gentamicina.

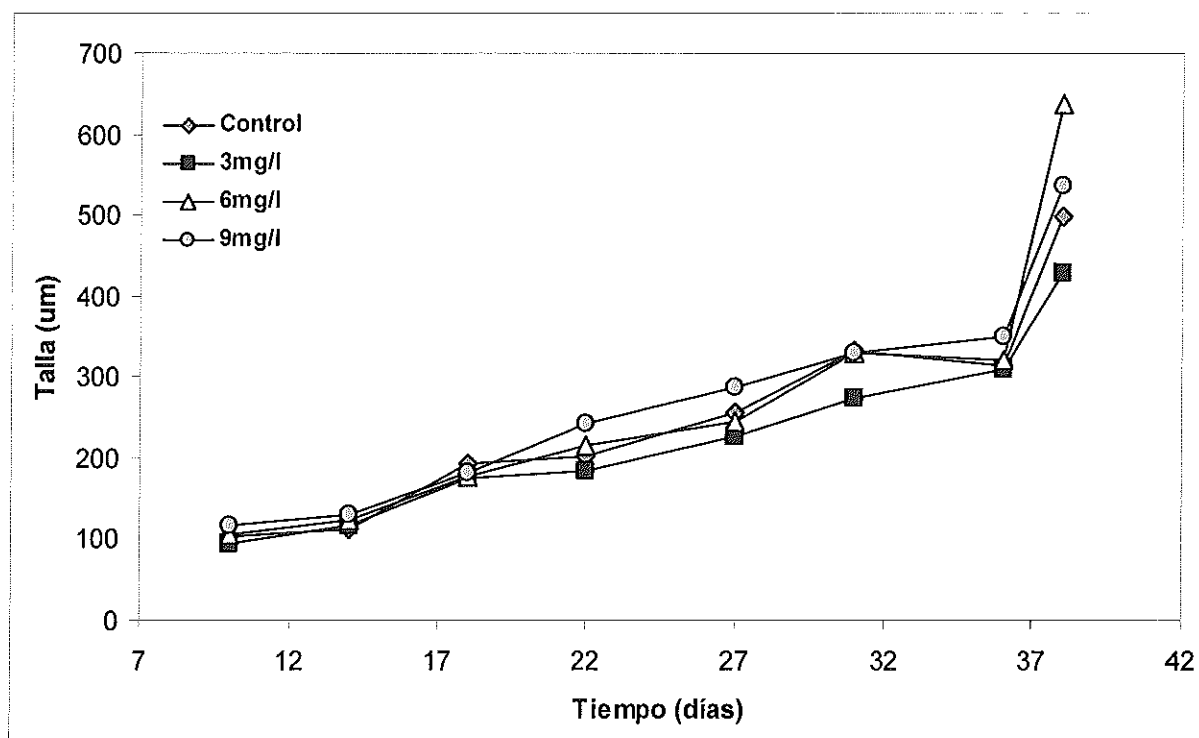


Figura 8. Cambios temporales en la talla (ancho de concha) de larvas de *Panopea generosa* tratadas con distintas concentraciones de gentamicina.

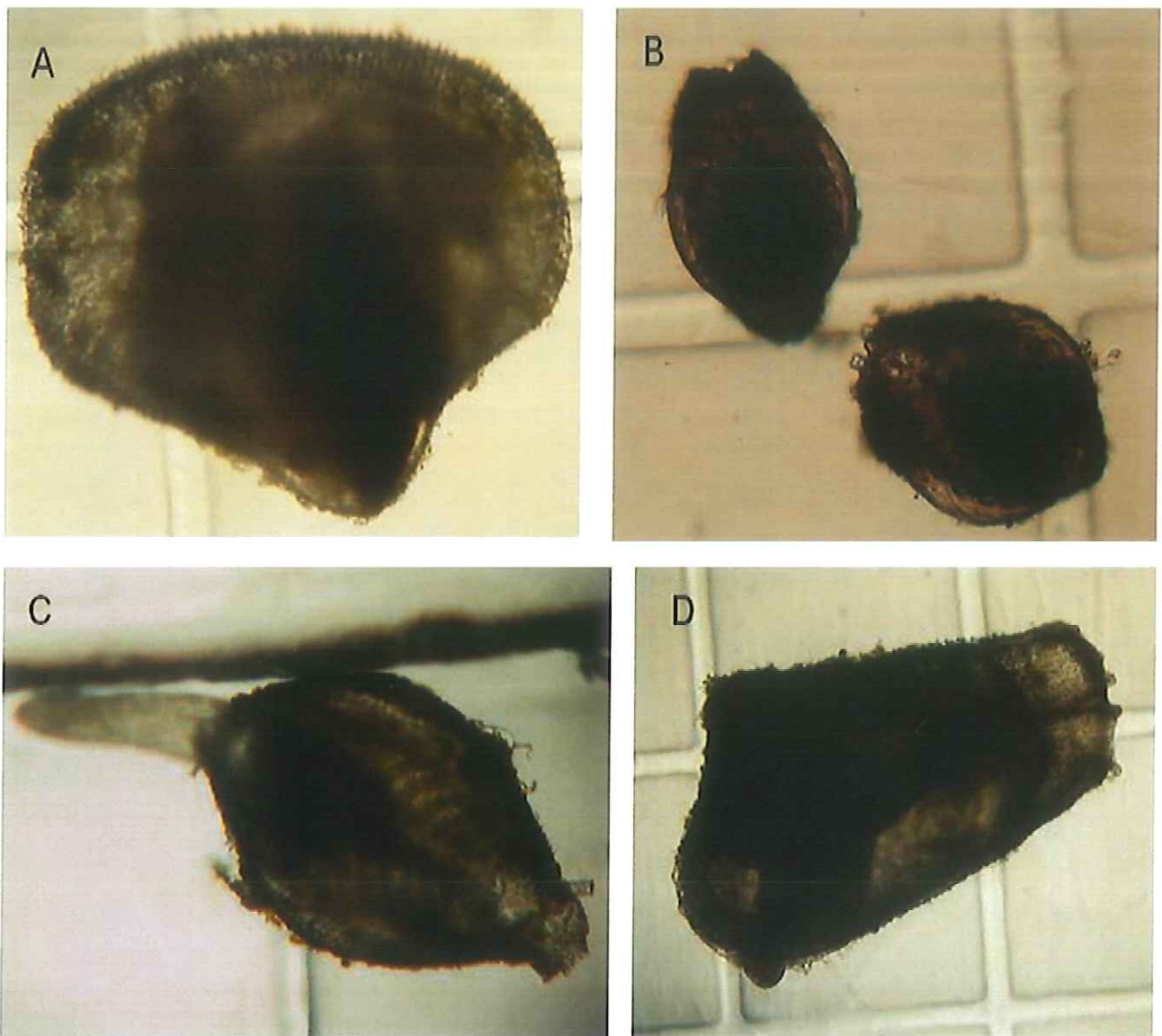


Figura 9. Características de postlarvas. A) Espinas alrededor de la concha B) Branquias C) Pie muy desarrollado D) Sifón.

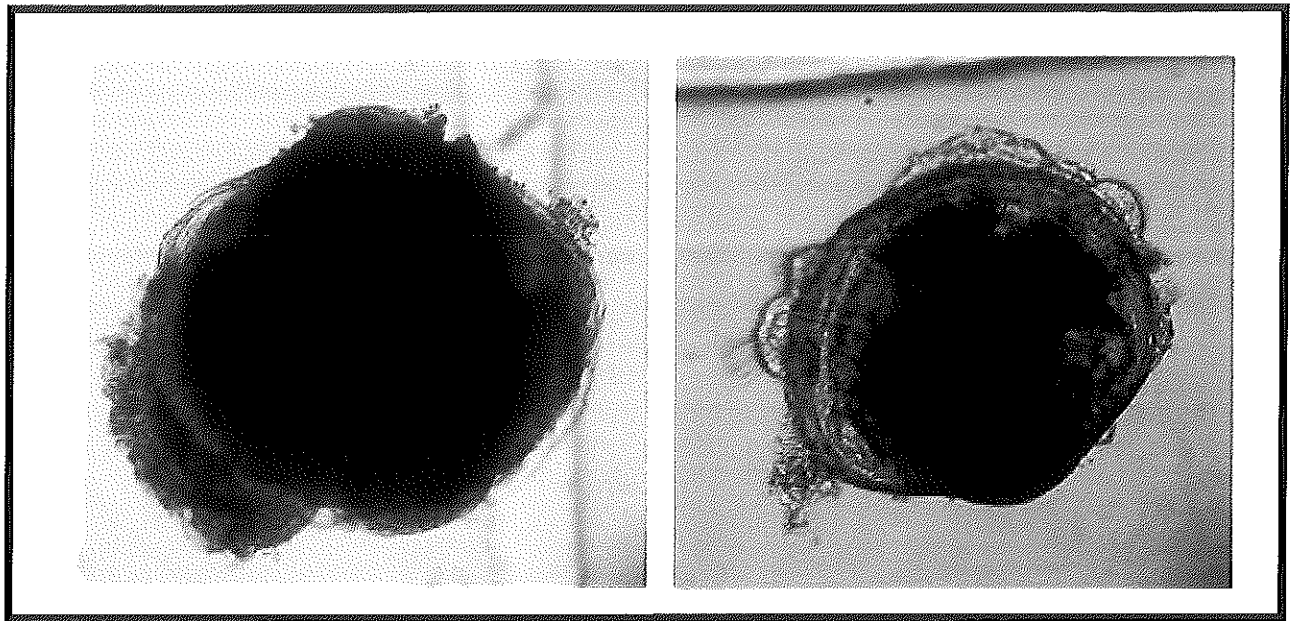


Figura 10. Larva ciliada de *P. abrupta* (aún sin metamorfizar).

TABLAS

Tabla I. Cambios temporales en la longitud (μm) promedio de la concha de las larvas $\pm$ error estándar en los cuatro tratamientos con cloranfenicol durante el tiempo de experimento (Julio 2009).

Tiempo (días)	Control	3mg/L	6mg/L	9mg/L
7	128 $\pm$ 6	76 $\pm$ 25	142 $\pm$ 3	138 $\pm$ 6
10	171 $\pm$ 7	179 $\pm$ 4	181 $\pm$ 2	182 $\pm$ 1
12	192 $\pm$ 7	202 $\pm$ 7	204 $\pm$ 2	208 $\pm$ 3
17	226 $\pm$ 3	262 $\pm$ 11	269 $\pm$ 6	282 $\pm$ 8
20	236 $\pm$ 5	304 $\pm$ 4	270 $\pm$ 25	322 $\pm$ 8
22	263 $\pm$ 3	316 $\pm$ 12	311 $\pm$ 28	341 $\pm$ 24
25	265 $\pm$ 0	328 $\pm$ 11	350 $\pm$ 3	350 $\pm$ 19
27	270 $\pm$ 7	330 $\pm$ 8	355 $\pm$ 11	355 $\pm$ 70
29	279 $\pm$ 0	380 $\pm$ 0	375 $\pm$ 0	373 $\pm$ 0
30	280 $\pm$ 0	385 $\pm$ 0	379 $\pm$ 0	397 $\pm$ 0
32	297 $\pm$ 0	396 $\pm$ 0	404 $\pm$ 0	428 $\pm$ 0
34	318 $\pm$ 29	532 $\pm$ 115	553 $\pm$ 80	583 $\pm$ 104

Tabla II. Cambios temporales en el ancho (μm) promedio de la concha de las larvas $\pm$ error estándar en los cuatro tratamientos con cloranfenicol durante el tiempo de experimento (Julio 2009).

Tiempo (días)	Control	3mg/L	6mg/L	9mg/L
7	100 $\pm$ 4	58 $\pm$ 18	116 $\pm$ 1	106 $\pm$ 6
10	129 $\pm$ 9	145 $\pm$ 4	156 $\pm$ 6	149 $\pm$ 3
12	164 $\pm$ 7	172 $\pm$ 6	172 $\pm$ 4	171 $\pm$ 3
17	191 $\pm$ 6	135 $\pm$ 13	234 $\pm$ 8	245 $\pm$ 8
20	207 $\pm$ 6	270 $\pm$ 3	233 $\pm$ 30	289 $\pm$ 6
22	229 $\pm$ 11	281 $\pm$ 14	265 $\pm$ 40	307 $\pm$ 26
25	152 $\pm$ 10	294 $\pm$ 7	350 $\pm$ 6	317 $\pm$ 18
27	213 $\pm$ 0	293 $\pm$ 9	318 $\pm$ 11	358 $\pm$ 4
29	253 $\pm$ 0	348 $\pm$ 0	368 $\pm$ 0	337 $\pm$ 0
30	252 $\pm$ 0	338 $\pm$ 0	343 $\pm$ 0	350 $\pm$ 0
32	247 $\pm$ 0	366 $\pm$ 0	320 $\pm$ 0	388 $\pm$ 0
34	283 $\pm$ 23	448 $\pm$ 87	468 $\pm$ 56	483 $\pm$ 69

Tabla III. Cambios temporales en la longitud (μm) promedio de la concha de las larvas $\pm$ error estándar en los cuatro tratamientos con gentamicina durante el tiempo de experimento (Mayo 2010).

Tiempo (días)	Control	3mg/L	6mg/L	9mg/L
10	138 $\pm$ 2	122 $\pm$ 11	133 $\pm$ 5	145 $\pm$ 13
14	156 $\pm$ 6	141 $\pm$ 9	154 $\pm$ 5	158 $\pm$ 3
18	227 $\pm$ 16	205 $\pm$ 14	210 $\pm$ 5	217 $\pm$ 2
22	238 $\pm$ 11	221 $\pm$ 14	250 $\pm$ 13	275 $\pm$ 4
27	289 $\pm$ 22	252 $\pm$ 3	281 $\pm$ 10	323 $\pm$ 9
31	366 $\pm$ 10	309 $\pm$ 22	373 $\pm$ 3	378 $\pm$ 14
36	362 $\pm$ 70	341 $\pm$ 15	392 $\pm$ 23	434 $\pm$ 29
38	564 $\pm$ 109	517 $\pm$ 59	759 $\pm$ 49	662 $\pm$ 92

Tabla IV. Cambios temporales en el ancho (μm) promedio de la concha de las larvas $\pm$ error estándar en los cuatro tratamientos con gentamicina durante el tiempo de experimento (Julio 2010).

Tiempo (días)	Control	3mg/L	6mg/L	9mg/L
10	104 $\pm$ 3	93 $\pm$ 9	105 $\pm$ 4	116 $\pm$ 12
14	111 $\pm$ 3	116 $\pm$ 4	124 $\pm$ 7	130 $\pm$ 2
18	192 $\pm$ 15	175 $\pm$ 12	177 $\pm$ 4	181 $\pm$ 3
22	203 $\pm$ 14	185 $\pm$ 14	216 $\pm$ 13	242 $\pm$ 6
27	255 $\pm$ 27	225 $\pm$ 6	243 $\pm$ 14	288 $\pm$ 8
31	332 $\pm$ 15	273 $\pm$ 16	330 $\pm$ 3	330 $\pm$ 12
36	314 $\pm$ 57	308 $\pm$ 16	321 $\pm$ 4	350 $\pm$ 19
38	497 $\pm$ 91	428 $\pm$ 37	636 $\pm$ 31	537 $\pm$ 63

Tabla V. Tasa de crecimiento promedio $\pm$ error estándar ($\mu\text{m}/\text{día}$) obtenidas en los cuatro tratamientos de los dos antibióticos utilizados.

	Cloranfenicol	Gentamicina
Control	6 ± 0.5	13 ± 2
3mg/l	12 ± 2	12 ± 1
6mg/l	13 ± 1	17 ± 0.5
9mg/l	14 ± 2	15 ± 2

Tabla VI. Supervivencia promedio $\pm$ error estándar (%) de las larvas con los cuatro tratamientos de los dos antibióticos utilizados.

Tratamiento	Cloranfenicol	Gentamicina
Control	56 ± 5	6 ± 0
3mg/l	86 ± 15	9 ± 5
6mg/l	83 ± 7	32 ± 1
9mg/l	93 ± 2	69 ± 2

ANEXO I

Tabla Ia. Resultado del ANOVA de dos vías para comparar la longitud promedio de las larvas de *P. generosa*, teniendo como factores el tiempo y la concentración de cloranfenicol (ver detalles de fechas de muestreos en Fig. 5)

Fuente de variación	GL	Sum Cuadr	Media Cuadr	F	P
Tiempo	11	1193634.9	108512.27	21.439	<0.001
Concentración	3	153345.31	51115.102	10.099	<0.001
Tiempo x Concentración	33	191162.84	5792.813	1.145	0.311
Residual	72	364418.61	5061.37		
Total	119	1931902.2	16234.473		

ANEXO II

Tabla Ib. Resultado del ANOVA de dos vías para comparar la longitud promedio de las larvas de *P. generosa*, teniendo como factores el tiempo y la concentración de gentamicina (ver detalles de fechas de muestreos en Fig. 7).

Fuente de variación	GL	Sum Cuadr	Media Cuadr	F	P
Tiempo	7	1191657.819	170236.831	9.670	<0.001
Concentración	3	121166.136	40388.712	2.294	0.086
Tiempo x Concentración	21	174645.371	8316.446	0.472	0.971
Residual	64	1126716.568	17604.946		
Total	95	2614185.895	27517.746		