

LA CLOROMICETINA Y SU INFLUENCIA EN EL CRECIMIENTO DE LA VELIFERA DE LA PROTOTHACA THACA (MOLINA, 1782).

Miguel Padilla G.* y Christian Iraçabal O.**

ABSTRACT. The effects of Chloromycetin on the growth of the straight hinge *Protothaca thaca* clam larvae, were studied under experimental conditions.

The statistical analysis of the results showed a 1% significant difference in favor of the Chloromycetin treated culture.

INTRODUCCION

Una de las dificultades que más ha limitado el avance del cultivo de organismos marinos en el Laboratorio, ha sido la proliferación bacteriana. Se ha podido comprobar que las larvas de moluscos bivalvos se ven seriamente afectadas, cuando la cuenta bacteriana sobrepasa el umbral de 1×10^6 bacterias/ml (Guillard, 1958). El problema de la contaminación bacteriana se agudiza aún más, debido a que los monocultivos de algas que sirven de alimento a las larvas no son axénicos y, por lo tanto, constituyen en la mayoría de los casos una fuente de contaminación bacteriana ineludible. Esto, sumado al hecho que generalmente se cultiva en espacios pequeños, donde la relación superficie de contacto-volumen de agua es reducida, aumenta aún más la posibilidad de sobrepasar el umbral crítico establecido.

La utilización de agua de mar filtrada o irradiada con rayos ultravioletas, asociada a una rigurosa profilaxis durante todo el cultivo no son siempre suficientes, y es así como algunos investigadores como Spencer (1952), Loosanoff (1954), Walne (1966) y otros, han recurrido al uso de antibióticos que controlen el desarrollo bacteriano sin inhibir el crecimiento larvario. Spencer (1952), experimentó con diferentes concentraciones de Penicilina y

* Departamento de Oceanología, Universidad de Chile, Valparaíso, Casilla 13-D, Viña del Mar.

** Departamento de Matemáticas y Ciencias Naturales, Universidad de Chile, Sede Osorno, Casilla 933, Osorno.

Streptomocina y logró determinar las concentraciones de antibióticos que eliminaban las bacterias y permitían la reproducción normal de diferentes algas. Walne (1966) a su vez, desarrolló una fórmula basada en Streptomocina y Penicilina, que ha sido empleada extensamente, y que inhibe la proliferación bacteriana permitiendo el crecimiento de las larvas. Le Pénec (1973), haciendo una comparación entre diferentes agentes antibióticos, determinó que en el caso de *Mytilus edulis* el crecimiento larvario correspondiente al uso de la Cloromicetina, era mayor que aquel obtenido con los demás antibióticos. Spencer (1952) postuló que si bien los antibióticos eran efectivos en producir una inhibición bacteriana, el uso de ellos en monocultivos de algas destinadas a la alimentación de larvas de bivalvos podría afectar, aunque en forma transitoria, el crecimiento de las larvas.

Otros antibióticos como las sulfonamidas también han sido usados con buenos resultados; sin embargo, existen muy pocos estudios que determinen si su empleo afecta en alguna forma el crecimiento larvario, ya que es sabido que la mayoría de ellas actúa a nivel de síntesis proteica, quizás en parte, por bloqueo de la síntesis de ribosomas.

El objetivo del presente trabajo es analizar la influencia de la Cloromicetina sobre el crecimiento de la velífera de la almeja *P. thaca*.

MATERIALES Y METODOS

Método de cultivo

El cultivo de la velífera de *P. thaca* dio lugar a varios procedimientos, algunos de los cuales se repiten diariamente. Las etapas fueron:

Acondicionamiento de los reproductores.

Para obtener gametos maduros se colocaron 12 almejas adultas en un acuario de 40 lts con agua de mar corriente. Estas fueron extraídas de un banco natural del área de Montemar (Fig. 1). Los ejemplares fueron acondicionados durante 30 días bajo condiciones ambientales. Todas las tardes se procedía a alimentarlas agregando al acuario una mezcla de monocultivos de *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella* sp., *Nitzschia* sp. y un alga no identificada la que se denominó X-2. Con el fin de obtener un mejor aprovechamiento del alimento se procedía a cortar el flujo de agua durante la noche.

AREA DE MONTEMAR

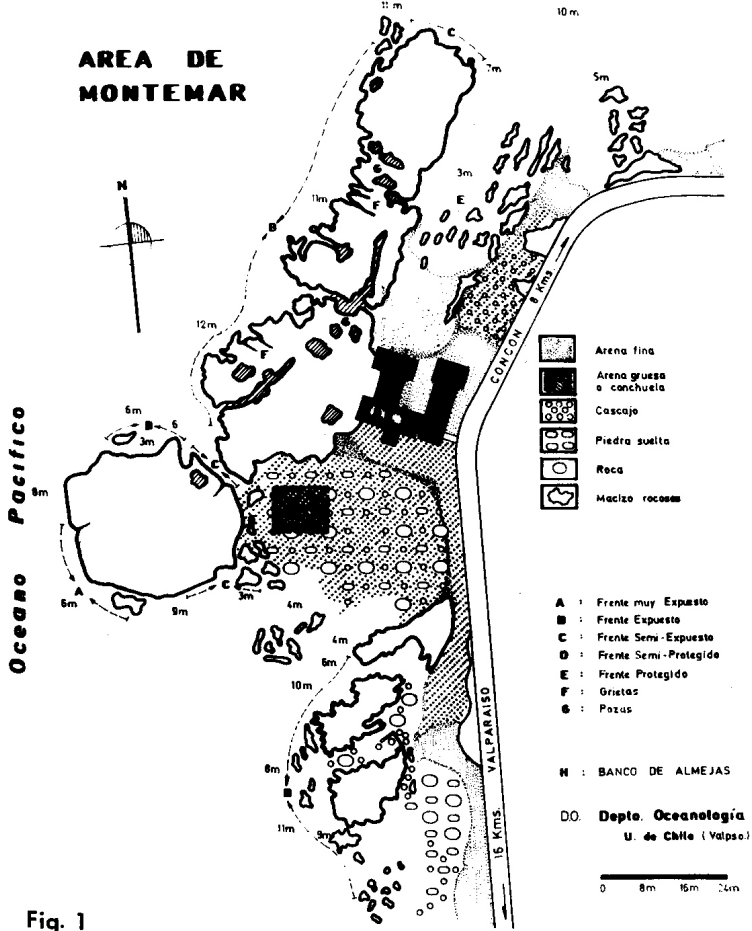
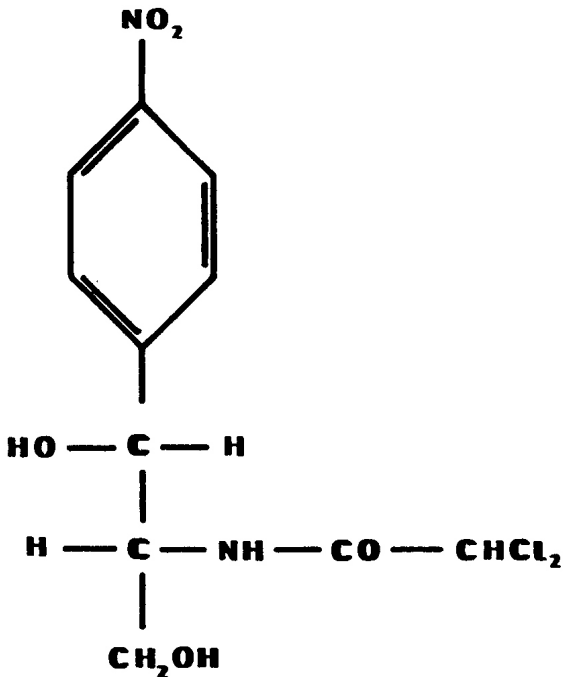


Fig. 1



ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA CLOROMICETINA

Extracción quirúrgica de los gametos.

Debido a las dificultades encontradas en inducir el desove de la *P. thaca* se optó por abrir un número determinado de almejas procediéndose de la siguiente forma:

Se abrieron las almejas con un cuchillo, el que se mantuvo entre sus valvas hasta cortar los músculos.

Se cortaron los músculos aductores y retractores con un bisturí.

Se extrajo la masa visceral completa de la que se eliminaron las branquias, el pericardio, los sifones y el manto.

Se efectuó un frotis de gónada para determinar el sexo, y verificar el estado de desarrollo de los óvulos así como la movilidad de los espermios.

Verificada la madurez de los gametos se recolectaron óvulos y espermios, en forma separada.

En la masa visceral de las hembras se hicieron dos incisiones a lo largo del gonoducto terminal procediéndose en seguida a separar el tejido externo que cubre la masa gonádica. A continuación se practicaron cortes verticales y transversales sobre los alvéolos de la gónada y luego se suspendió la masa visceral sobre un vaso precipitado de 250 ml. La masa gonádica se lavó repetidamente con una piseta con agua de mar filtrada, de manera de desalojar los óvulos de los folículos recibiendo en el vaso. Después de una hora la suspensión de óvulos se filtró y quedó lista para ser activada.

La masa visceral de los machos se disectó en la misma forma anterior y se depositó en otro vaso precipitado sin agregar agua de mar. A los espermios contenidos en el fluido seminal se les permitió escurrir libremente en el fondo del vaso.

Activación de los óvulos.

Los óvulos extraídos al no haber sido desovados en forma natural mantuvieron intacta su vesícula germinal. Esta membrana impide la unión del pronúcleo masculino con el femenino, razón por la que hay necesidad de someter la suspensión de óvulos a una solución de 0.1N de NH_4OH durante 15 minutos (Sagara, 1958 y D'Asaro, 1967). Los óvulos una vez activados en esta forma, fueron separados con filtro para eliminar el exceso de NH_4OH .

Fertilización.

Gray (1928), Rothschild (1948) y Tyler (1953) demostraron que tanto la actividad como la longevidad de los espermios en general

disminuye a medida que aumenta la dilución; de aquí que sea importante diluir a la concentración requerida solamente en el momento de efectuar la fertilización. La relación óvulo espermio debe aproximarse a la relación 1:5 (Gruffydd y Beaumont, 1972). Los espermios una vez diluidos y activados por el agua de mar demoran muy poco en fertilizar los óvulos (10 min) (Padilla, 1979). El grado de movilidad de los espermios, que generalmente se detecta durante la verificación de sexos, constituye un criterio importante de viabilidad y es preferible que aquellos especímenes reproductores machos que manifiesten debilidad en el movimiento espermático, sean descartados.

Alimentación.

Tanto las larvas como los adultos micro herbívoros suspensívoros que filtran partículas del plancton, requieren de monocultivos de microalgas para su alimentación en acuarios. Las partículas, sin embargo, para poder ser aprovechadas deben mantener una relación de tamaño con el esófago de la larva (Cole, 1956). Además hay que tener presente que las larvas sólo empiezan la ingestión de partículas (fase planctotrófica), cuando se han conformado las estructuras del sistema digestivo, lo que ocurre generalmente al 3er. día de cultivo. Durante la fase previa al desarrollo de las estructuras digestivas las larvas de bivalvos, que son isolecíticas, se alimentan de la reserva energética que contienen los gránulos de vitelo diseminados a través de su estructura (fase lecitotrófica). La suspensión de microalgas usadas como alimento debe centrifugarse a 1300 r.p.m. durante 15 min. para eliminar los catábolitos (Gruffydd y Beaumont, 1972), luego se reconstituye con agua de mar filtrada y se introduce en los receptáculos de cultivo a la concentración requerida (50 céls/ μ l).

Antibióticos.

El uso de antibióticos disminuye la proliferación bacteriana y su empleo debe efectuarse a concentraciones que no interfieran con el normal desarrollo larvario. Estas concentraciones han sido determinadas por Walne (1960) para los siguientes antibióticos:

Penicilina	30 mg/L
Streptomycin	50 "
Cloromicetina	2 "

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, nos han inducido al empleo exclusivo de la Cloromicetina, la que se agrega a los

acuarios a una concentración de 2 mg/L.

Mantención de huevos y larvas.

Los huevos fecundados fueron filtrados para eliminar el exceso de espermios y luego se colocaron en sus receptáculos de cultivo, con agua de mar filtrada (45 μ). La mantención de las larvas en buen estado requiere, además de las condiciones ya estipuladas, de un lavado riguroso del material que está en contacto con las larvas, de la capacidad de filtrar el agua de mar necesaria y de la retención de las larvas en una abertura de malla adecuada.

Método Estadístico

Cuando se comparan resultados de dos experimentos en los que se ha alterado una condición manteniendo el resto de las variables constantes, generalmente se obtiene una diferencia en los valores promedios de los resultados. Lo que no se sabe es si esta diferencia es significativa y por lo tanto, no debida al producto del azar, sino seguramente a la manipulación de la variable efectuada; o, si es insignificante, debido al azar y que, por lo tanto, no puede ser atribuída a la manipulación de la variable efectuada.

Para establecer si esta diferencia es significativa o no, se puede emplear la prueba "t" de Student (1908), la que es sensible para menos de 10 observaciones.

Cálculo de la significancia.

Tabulación de los datos

Experimento 1				Experimento 2			
N	\bar{X}	$(X-\bar{X})$	$(X-\bar{X})^2$	N	\bar{X}	$(X-\bar{X})$	$(X-\bar{X})^2$
1				1			
2				2			
3				3			
4				4			
5				5			
6				6			
7				7			
8				8			
9				9			
10				10			
$\bar{X} =$		$\Sigma (X-\bar{X})^2 =$		$\bar{X} =$		$\Sigma (X-\bar{X})^2 =$	

Cálculo de la Desviación Std. y Error Std.

$$N^{\circ} \text{ Obs} = N$$

$$N^{\circ} \text{ Obs} = N$$

$$\text{Media} = \bar{X}$$

$$\text{Media} = \bar{X}$$

$$\text{Desv. Std.} = \sqrt{\frac{\Sigma (X-X)^2}{N-1}}$$

$$\text{Desv. Std.} = \sqrt{\frac{\Sigma (X-X)^2}{N-1}}$$

$$\text{Error Std.} = \frac{\text{Desv. Std.}}{\sqrt{N}}$$

$$\text{Error Std.} = \frac{\text{Desv. Std.}}{\sqrt{N}}$$

Cálculo del Error Std. de la diferencia

$$\text{Error Std de la dif.} = \sqrt{\text{Suma de los cuadrados de E Std. 1 y 2}}$$

Cálculo de la Prueba "t" de Student

$$"t" = \frac{\text{diferencia entre las medias}}{\text{error Std. de la diferencia}}$$

Cálculo de los grados de libertad (GL)

$$(N-1) + (N-1) = \text{G.L.}$$

TABLA "t"

df				5% level	1% level	0.001
	0.50	0.20	0.10	0.05	0.01	
1	1.00	3.078	6.314	12.706	63.657	636.619
2	.816	1.886	2.920	4.303	9.925	31.598
3	.765	1.638	2.353	3.182	5.841	12.924
4	.741	1.533	2.132	2.776	4.604	8.610
5	.727	1.476	2.015	2.571	4.032	6.869
6	.718	1.440	1.943	2.447	3.707	5.959
7	.711	1.415	1.895	2.365	3.499	5.408
8	.706	1.397	1.860	2.306	3.355	5.041
9	.703	1.383	1.833	2.262	3.250	4.781
10	.700	1.372	1.812	2.228	3.169	4.587
11	.697	1.363	1.796	2.201	3.106	4.437
12	.695	1.356	1.782	2.179	3.055	4.318
13	.694	1.350	1.771	2.160	3.012	4.221
14	.692	1.345	1.761	2.145	2.977	4.140
15	.691	1.341	1.753	2.131	2.947	4.073
16	.690	1.337	1.746	2.120	2.921	4.015
17	.689	1.333	1.740	2.110	2.898	3.965
18	.688	1.330	1.734	2.101	2.878	3.922
19	.688	1.328	1.729	2.093	2.861	3.883
20	.687	1.325	1.725	2.086	2.845	3.850
30	.683	1.310	1.697	2.042	2.750	3.646
40	.681	1.303	1.684	2.021	2.704	3.551
60	.679	1.296	1.671	2.000	2.660	3.460
∞	.674	1.282	1.645	1.960	2.576	3.291

Método de cuantificación de huevos

Para mantener constante el número de huevos y larvas en ambos controles del experimento, se procedió de la siguiente manera:

Se mantuvo homogénea la solución de huevos mediante un agitador magnético.

Se extrajo una muestra la que se colocó en una celda volumétrica cuadrada de 1 ml de capacidad.

Se contaron los huevos contenidos en 38 cuadrados elegidos al azar y se obtuvo un promedio de huevos por cuadrado.

El promedio por cuadrado se multiplicó por el total de retículos de la celda (380) con lo cual se obtuvo el número por ml.

El número por ml se multiplicó por el volumen total de la suspensión de huevos.

Para los efectos del experimento el volumen total de la suspensión se dividió en dos, colocándose cada fracción en un balde.

Medición de huevos y larvas

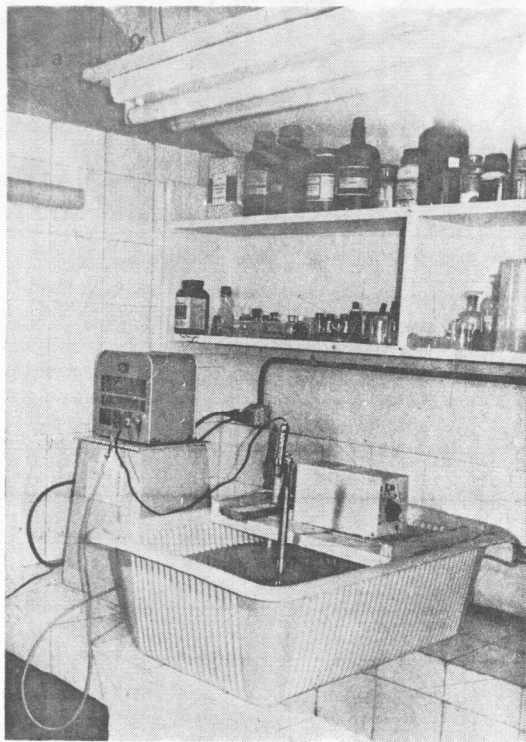
Para los efectos de medir las diferencias de tamaño que pudieran ocurrir entre las observaciones pareadas del experimento, se procedió a calibrar el ocular milimetrado del microscopio con un portaobjeto graduado. Conocidas las medidas del ocular se procedió a medir el diámetro, en el caso de los huevos y el eje ántero-posterior en el caso de las larvas.

Diseño experimental

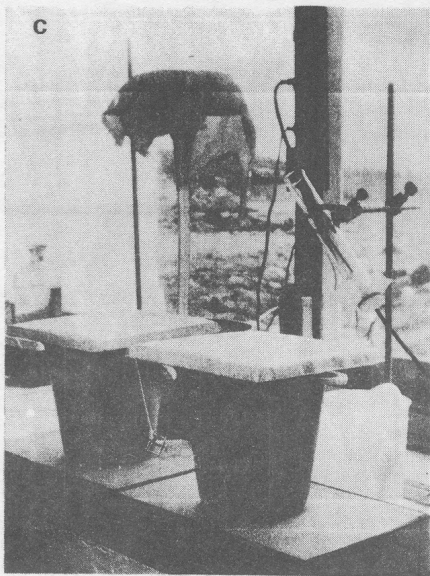
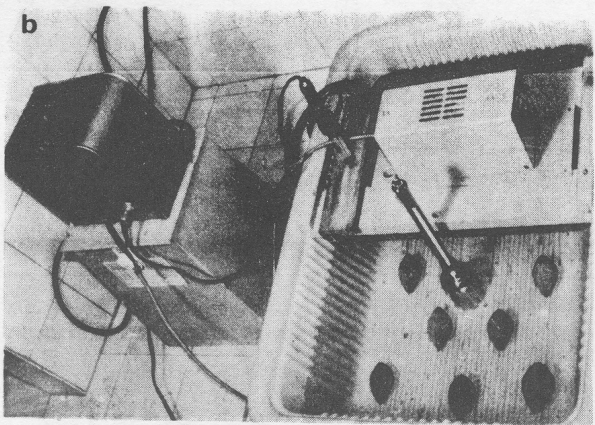
El experimento se llevó a cabo en dos baldes plásticos idénticos, debidamente marcados, que constituyeron las observaciones pareadas. A estos baldes se les colocó el mismo volumen de agua, la misma cantidad de larvas, el mismo flujo de aire y la misma calidad y cantidad de alimento. No existieron mayores dificultades en mantener las variables constantes, salvo en el caso de la aireación que debió ser ajustada mediante un regulador de flujo, el cual fue diseñado en el propio laboratorio. Si bien es cierto que el flujo de aire pudo ser equilibrado para ambos baldes de cultivo, éste sufrió variaciones debido a que no se pudo contar con un regulador de corriente que mantuviera uniforme el voltaje. Sin embargo, como las variaciones de voltaje actuaron sobre ambos baldes al mismo tiempo, esta variación fue estimada constante.

La condición que constituyó la variable del presente experimento, fue la adición al cultivo de 2 mg/L de Cloromicetina a uno de los dos baldes comparados; el otro, que permaneció sin antibiótico, constituyó el control del experimento.

Materiales empleados



a. Sistema de regulación de temperatura



b. Acuario de acondicionamiento de los reproductores
c. Implementos de cultivo