

## Tratamiento físico-químico del agua para el cultivo larvario y el asentamiento de la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1975) Water Physical-chemical treatment for larval culture and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1975)

Daniel Rodríguez-Pesantes<sup>1,2</sup>, César Lodeiros<sup>2,3</sup>, Jormil Revilla<sup>4,5</sup>, Adrián Márquez<sup>1,2</sup>, Stanislaus Sonnenholzner<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, CENAIM, Campus Gustavo Galindo Km 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Biología y Cultivo de Moluscos, Escuela de Acuicultura y Pesquería, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Bahía de Caráquez EC131401, Ecuador

<sup>3</sup> Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, P.O. Box 245, Cumaná 6101, Venezuela

<sup>4</sup> Doctorado en Acuicultura. Programa Cooperativo Universidad de Chile, Universidad Católica del Norte, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile

<sup>5</sup> Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Larrondo 1281, Coquimbo, Chile

Correspondencia: Daniel Rodríguez-Pesantes  E-mail: [dfrodri@espol.edu.ec](mailto:dfrodri@espol.edu.ec)

Artículo original | Original article

### Palabras clave

Hipoclorito  
Vitamina C  
Larvas pedivelíger  
Tratamiento del agua  
Tratamiento UV

**RESUMEN** | La ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* es uno de los moluscos con mayor producción a escala global y el éxito de su cultivo depende principalmente de la producción de semillas bajo condiciones controladas, siendo la calidad del agua utilizada un factor preponderante. Se evaluó la producción de postlarvas, tanto en el desarrollo larvario como en etapa postlarvaria temprana, bajo distintos tratamientos físicos y químicos comúnmente utilizados en el cultivo de invertebrados, teniendo como base la filtración y exposición del agua a la luz ultravioleta-UV (tratamiento 1-control) y sus variantes con adición de: hipoclorito + tiosulfato, hipoclorito + vitamina C, hipoclorito + tiosulfato + ácido etilendiamino tetraacético-EDTA, hipoclorito + tiosulfato + vitamina C + EDTA y antibiótico oxitetraciclina. Los resultados en menor tiempo del desarrollo larvario, mayor tasa de crecimiento y talla de larvas competentes demuestran la eficacia del tratamiento físico del agua filtrada e irradiada con UV en flujos de 10 L min, y de la terapia basada en oxitetraciclina para aumentar la supervivencia, así como también afectar positivamente en la tasa de asentamiento; sin embargo, no recomendamos el uso de antibióticos en la producción de semillas de *C. gigas*, por generar menor condición fisiológica de las larvas (retardo de 2 días en el desarrollo larvario) y sus efectos de crear resistencia dentro y fuera de la *hatchery*. Se recomienda para la producción de postlarvas de *C. gigas* el uso del agua filtrada hasta 1 µm y posterior exposición a luz UV, así como estudios para la búsqueda de alternativas de desinfección o fortalecimiento inmunológico con el uso de productos naturales y probióticos para la optimización del desarrollo larvario y postlarvario.

### Keywords

Hypochlorite  
Vitamin C,  
Pediveliger larvae  
Water treatment  
UV treatment

**ABSTRACT** | The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is one of the mollusks with greater production on a global scale. The success of its cultivation depends mainly on the production of seeds under controlled conditions, for which the quality of water used is a preponderant factor. Production of *C. gigas* spat was evaluated, both in the larval and pediveliger stages, under physical and chemical treatments commonly used in the production of invertebrates. The different water treatments were based on the filtration and exposure of water to ultraviolet light-UV (1-control treatment) and its variants with the addition of hypochlorite + thiosulfate, hypochlorite + vitamin C, hypochlorite + thiosulfate + ethylenediaminetetraacetic acid -EDTA, hypochlorite + thiosulfate + vitamin C + EDTA and oxytetracycline antibiotic. The results, expressed in less time of larval development, higher growth rate and size of larvae competent to the settlement, demonstrate the effectiveness of the physical treatment of the filtered water and irradiated with UV in flows of 10 L min<sup>-1</sup>, and of the therapy based on oxytetracycline to increase the survival, as well as positively influencing the settlement rate. However, we do not recommend the use of antibiotics in the spat production of *C. gigas*, because it generated a lower physiological condition of the larvae (2-day delay in larval development) and its effects on promoting resistance inside and outside the hatchery. For the production of postlarvae of *C. gigas* the use of filtered water up to 1 µm and subsequent exposure to UV rays is recommended, as well as studies searching for alternatives of disinfection or immune strengthening with the use of natural products and probiotics for optimization of larval and postlarval development.

## INTRODUCCIÓN

Los moluscos producidos por cultivo suponen una remarcable cifra en la producción mundial, contando para el año 2017 unos 17.4 millones de toneladas. Dentro de este volumen, la ostra del pacífico u ostra japonesa *Crassostrea gigas* figura como una de las especies más importantes, aportando más de 600.000 t, siendo Asia (China, Corea, Japón y Taiwán), Europa (Francia) y Estados Unidos los principales productores (FAO 2020), lo cual es indicativo de la utilización de procesos optimizados para la producción de semillas a gran escala y del consecuente engorde en el mar y estuarios.

En Ecuador la ostra Japonesa fue introducida en 1990 (Alvarez *et al.* 2008), no obstante, recientemente es que su cultivo ha comenzado a desarrollarse, gracias al incentivo de producción de las comunidades costeras promovido por el gobierno nacional y regional, particularmente en las costas de la provincia de Santa Elena, así como de algunas iniciativas privadas e investigaciones que registran su gran factibilidad de cultivo tanto en el mar como en los estuarios (Lombeida 1997, Lodeiros *et al.* 2018, Treviño *et al.* 2020), todo ello prevé a futuro próximo una posible expansión a gran escala, por lo que se necesitará una producción masiva de semillas de la especie.

Aunque existen varios estudios de la producción de semillas de *C. gigas*, particularmente en zonas templadas y subtropicales, en el trópico estos estudios son prácticamente inexistentes. Dentro de los estudios realizados en otras latitudes, se dan a conocer la afección de variables exógenas en el cultivo de *C. gigas*, como por ejemplo la acidez, cuyo aumento en el agua afecta severamente el desarrollo embriogénico, larvario y la calcificación a nivel general (Kurihara *et al.* 2007, Barros *et al.* 2013, De Wit *et al.* 2016). Así mismo, sustancias tóxicas como el cobre, cromo, arsénico, níquel, mercurio y zinc causan una afectación significativa (Martin *et al.* 1981, Jones 2006), por otra parte, la necesidad de mantener una buena calidad físico-química del agua utilizada es muy importante para control de patógenos, e inclusive para la expresión genética (Sussarellu *et al.* 2018).

De esta manera, la composición química del agua así como sus cambios físicos, químicos y biológicos son muy complejos e influyentes (Boyd *et al.* 2016), por ello la importancia de la desinfección y el buen manejo del agua de cultivo, siendo fundamental además para prevenir la introducción y propagación de enfermedades infecciosas en acuicultura (Kasai *et al.* 2002).

Existen muchos métodos utilizados de desinfección, por ejemplo, para el tratamiento del agua, es frecuente utilizar hipoclorito en criaderos de larvas de crustáceos, y su uso está extendido a escala global (Boyd and Massaut 1999, Kasai *et al.* 2002), otros métodos de desinfección como la ozonización, hipoclorito por electrólisis, permanganato, agua pasteurizada, etc., cuyo uso incluye la desinfección de superficies, tanques y pequeños accesorios, además de antisépticos como el alcohol y jabón líquido usados por el personal de manejo son también importantes. Por otra parte, la irradiación adecuada del agua de mar con UV es también muy utilizada y ha mostrado resultados que han mejorado la producción acuícola, ya que su eficacia pueden disminuir en > 95% las bacterias Gram negativas (Kasai *et al.* 2002). Otra forma de control de calidad de agua es el uso de antibióticos como tratamiento antibacteriano, lo cual no es recomendado por la resistencia que éstos podrían generar en los cultivos de moluscos bivalvos y en la microbiota aledaña (Miranda *et al.* 2013, Dubert *et al.* 2016).

Helm *et al.* (2004) mencionan entre los factores que influyen en el asentamiento y metamorfosis de bivalvos, la superficie del sustrato, reducción de la temperatura del agua y la disponibilidad de reservas de energía acumuladas durante la fase larvaria, pero no mencionan la calidad físico-química del agua como un factor influyente en el proceso, lo cual es de importancia para el éxito de los cultivos.

El presente estudio tiene como objetivo determinar la influencia del tratamiento físico-químico del agua comúnmente utilizada en la producción de larvas de organismos acuáticos sobre el crecimiento, la supervivencia y la tasa de asentamiento de larvas de *C. gigas*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Cultivos previos a los bioensayos*

Los desarrollos larvarios se establecieron mediante la inducción de organismos de *Crassostrea gigas* de 80-100 mm, procedentes del banco de reproductores del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas de la Escuela Superior Politécnica del Litoral de Ecuador (CENAIM-ESPOL), mantenidos en acondicionamiento en el reservorio de la estación experimental Palmar (2° 00' 51,40" S ; 80° 43' 21,17" O), finca experimental de engorde de camarón con influencia estuarina. En el laboratorio, la inducción se realizó bajo procedimiento estandarizado del CENAIM-ESPOL; así unos 50 animales se limpiaron externamente, eliminando epibiontes de la concha, para someterlos a un proceso de desecación por 12 h.

Luego de este primer estímulo, los organismos se expusieron a *shock* térmico, haciendo cambios de temperatura de 24 a 31°C y viceversa, obteniéndose el desove de 4 hembras y 25 machos. Los organismos en desove se separaron por sexo ubicándolos en recipientes de 20 L. La fertilización se realizó en proporción 10:1 (espermatozoides:ovocito), y en unos 5 min se observó >90% de los óvulos fertilizados (observación de la formación del primer cuerpo polar), validando la producción de ovocitos competentes para su desarrollo; seguidamente, luego de 15 min empezaron las divisiones celulares y los embriones se transfirieron a un tanque de 1000 L, a una densidad de 50 embriones.mL<sup>-1</sup>, donde transcurrieron los restantes cambios embrionarios.

Las larvas veliger D de *C. gigas* (26 h postfertilización-PF) se recolectaron en tamices con malla de 30 µm, para ser luego transferirlas a 3 tanques de 1000 L (5 larvas.mL<sup>-1</sup>). El agua de mar utilizada fue filtrada por 10 µm (filtro celulosa), 5 y 1 µm (filtros de hilo), para finalmente ser irradiada con luz UV, con una velocidad de circulación para el llenado de las unidades experimentales de ~10 L.min<sup>-1</sup>. En esta etapa la alimentación consistió solo de *Tisochrysis lutea*=*Isochrysis galbana* a una dosis de 15-20.000 células.mL<sup>-1</sup>.

### *Tratamientos del agua*

Los tratamientos utilizados fueron la filtración y exposición del agua a la luz ultravioleta como se describió para los cultivos previos (tratamiento control C) y variantes con adición de hipoclorito + tiosulfato (FCT), hipoclorito + Vitamina C (FCV), hipoclorito + tiosulfato + EDTA (FCTE), hipoclorito + tiosulfato + Vitamina C + EDTA (FCVE) y oxitetraciclina (FO). Todos los tratamientos tanto para el desarrollo larvario como para el asentamiento y desarrollo postlarvario se realizaron por triplicado.

El hipoclorito de sodio se preparó tomando 249 ml de cloro comercial (10%) aforándolo luego a 1000 mL para dosificarlo en dosis de 0,25 mL<sup>-1</sup>.L de agua de cultivo, eliminando posteriormente el residual con tiosulfato de sodio (0,1 mg.L<sup>-1</sup>), de acuerdo con las recomendaciones de Torrentera y Tacon (1989). Para la declorinación con ácido ascórbico (AA) se titularon las soluciones para obtener la dosis a utilizar, necesitando una relación de 2 mg de AA para neutralizar 1 mg de cloro.

El ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) se utilizó en dosis de 1 mg. L<sup>-1</sup>, según recomendaciones en Helm *et al.* (2004). Finalmente, se incluyó un tratamiento con oxitetraciclina 98% en dosis de 4 mg<sup>-1</sup>.L siguiendo las recomendaciones en Miranda *et al.* (2013).

### *Ensayo en el desarrollo larvario*

Transcurridas 72 h PF, se inició el experimento con larvas colectadas de cada tanque en un tamiz con malla de 60 µm (larvas con tallas dorso-ventral de DV 71,4 ± 1,83 µm-índices de dispersión expresados en error estándar), y se transfirieron a unidades experimentales cilindro-cónicas de 50 L donde se desarrolló el cultivo larvario, a una densidad de 3 larvas.mL<sup>-1</sup> manteniendo durante todo el ensayo una aireación moderada y recambios cada dos días del 100% (con agua preparada según el tratamiento). La alimentación establecida fue con las microalgas *Chaetoceros gracilis* y *Tisochrysis lutea*. Las microalgas fueron producidas en medio f/2 (Guillard, 1975), enriqueciendo la diatomea con metasilicato de sodio al 1%. Las

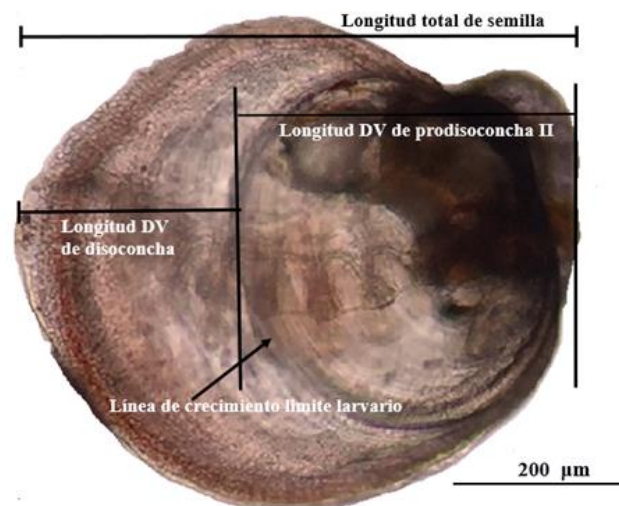
dosis alimenticias de la dieta bialgal se establecieron a partir de 25-30.000 células.mL<sup>-1</sup> en proporción 3:1 hasta el día 5 PF, de 30.000-50.000 células.mL<sup>-1</sup> en proporción 1:1 hasta el día 11 PF y de 50-70.000 células.mL<sup>-1</sup> en proporción 1:3 hasta la aparición de larvas pediveliger (15 a 19 días, dependiendo del tratamiento).

La evaluación del ensayo se realizó determinando la supervivencia y el crecimiento larvario, en cada réplica de los tratamientos; cada 2 días las larvas fueron concentradas en un tamiz de tamaño de poro adecuado, resuspendiéndose en un *beaker* de vidrio de 1 L. La relación entre la cantidad de larvas y el volumen total del recipiente permitió estimar la supervivencia tras un recuento de 3 réplicas de 1 mL en un porta objeto (vidrio-reloj). Esta misma muestra fue fotografiada, y las capturas de imágenes se usaron para la medición y análisis visual para determinar el porcentaje de larvas competentes al asentamiento (desarrollo de mancha ocular) utilizando una cámara LANOPTIK conectada a un microscopio trinocular Olympus, siendo las imágenes procesadas con el software Nahwoo iworks 2.0.

### ***Ensayo en el asentamiento y desarrollo postlarvario***

Cuando las larvas alcanzaron en >50% de la etapa pediveliger, se colocaron en jarras plásticas de 2 L (n=3) con fondo de malla 150 µm, a densidad de 1 larva.mL<sup>-1</sup>. El sustrato consistió en valvas molidas de organismos adultos de la misma especie en tamaños de 200-250 µm. Durante 5 días se mantuvieron las postlarvas en estos sistemas, con recambios del 50% del agua (con agua preparada según tratamiento), adicionando una dosis de alimento diario de 25.000 células.mL<sup>-1</sup> (*T. lutea* y *C. gracilis*) en proporción 1:3, manteniendo las unidades experimentales con aireación moderada.

El asentamiento se evaluó según el número de organismos fijados al sustrato en relación con la cantidad de larvas pediveliger, y el crecimiento en dimensión de concha luego de transcurridos 5 días de ser transferidos a los sistemas de fijación. La longitud de las larvas pediveliger antes de la metamorfosis (prodisoconcha II), de las postlarvas (prodisoconcha II+disoconcha), y de la disoconcha (deposición de concha luego de la metamorfosis) se midieron tomando la dimensión dorso-ventral máxima según Gosling (2015), tal y como se observa en la Fig. 1. La medición se realizó mediante captura de imágenes como fue descrita para las larvas, pero conectada a un estereomicroscopio Olympus. La tasa de crecimiento diario TCD (µm.día<sup>-1</sup>) se determinó siguiendo las recomendaciones señaladas en Abasolo-Pacheco *et al.* (2009).



**Figura 1** Postlarva de *Crassostrea gigas* luego de 5 días del asentamiento mostrando en eje dorso-ventral, la longitud total, compuestas por las longitudes de la prodisoconcha II y disoconcha, la cual es separada por la línea de crecimiento límite larvario.

### ***Análisis estadístico***

Los promedios de los tratamientos tanto en el crecimiento alcanzado en larvas competentes, su tasa de incremento diario y la supervivencia larvaria, así como la tasa de asentamiento, tamaño de prodisoconcha

II, disoconcha y longitud dorso-ventral total de las semillas obtenidas fueron contrastadas entre tratamientos con una ANOVA simple con análisis *a posteriori* de Tukey. Previamente al análisis se comprobó la normalidad y homogeneidad de varianzas con Shapiro Wilks y Bartlett test, respectivamente. La data de supervivencia fue transformada por logaritmo inverso en función de ser normalizada. Se estableció una probabilidad de significancia de  $P=0.05$  y los análisis se establecieron siguiendo las recomendaciones en Zar 2010.

## RESULTADOS

### Desarrollos larvarios

La Tabla 1 muestra la tasa de crecimiento, la longitud y supervivencia alcanzada en larvas competentes para el asentamiento, así como el tiempo del desarrollo larvario en los diferentes tratamientos.

**Tabla 1** Tasa de crecimiento ( $\mu\text{m}/\text{día}^{-1}$ ) durante el desarrollo larvario, longitud máxima y supervivencia (%) alcanzada en las larvas pediveliger ( $\mu\text{m}$ ) y tiempo alcanzado para culminar el desarrollo larvario, en los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Tasa crecimiento ( $\mu\text{m}/\text{día}^{-1}$ )	Longitud concha ( $\mu\text{m}$ )	Supervivencia (%)	Tiempo (días)
C	19 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>	285,5 $\pm$ 4,35 <sup>a</sup>	13,1 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>	15
FCT	14 $\pm$ 0,41 <sup>c</sup>	266,3 $\pm$ 4,80 <sup>b</sup>	10,6 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	19
FCV	-	198,7 $\pm$ 3,09 <sup>d</sup>	0,3 $\pm$ 0,06 <sup>e</sup>	*
FCTE	13,1 $\pm$ 0,67 <sup>c</sup>	249,0 $\pm$ 5,89 <sup>c</sup>	2,6 $\pm$ 0,19 <sup>d</sup>	19
FCVE	13 $\pm$ 0,78 <sup>c</sup>	248,0 $\pm$ 5,01 <sup>c</sup>	5,1 $\pm$ 0,68 <sup>c</sup>	19
FO	15,7 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup>	266,6 $\pm$ 4,44 <sup>b</sup>	21,7 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>	17

C= filtración por 10, 5 y 1  $\mu\text{m}$  +UV (control); FCT= Control+UV+hipoclorito+tiosulfato; FCV= Control +hipoclorito+Vitamina C; FCTE= Control+hipoclorito+tiosulfato+EDTA; FCVE= control+hipoclorito+Vitamina C+EDTA; FO= Control+UV+Oxitetraciclina.

Las letras superpuestas indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ), ( $\pm$ ES)

\*Larvas de este tratamiento no llegaron a formar mancha ocular, al día 19 se observó la mortalidad masiva de las larvas con este tratamiento.

El único tratamiento donde no se consiguió larvas competentes fue el que incluyó el aditivo de vitamina C (FCV), manifestando una supervivencia del 0,3% y tallas menores a las 200  $\mu\text{m}$  al día 19.

La mayor longitud obtenida ( $285,5 \pm 4,35 \mu\text{m}$ ), produjo también una significativamente mayor tasa de crecimiento ( $19 \mu\text{m}.\text{día}^{-1}$ ) y fue para las larvas que se desarrollaron con el tratamiento control (C), seguido por el tratamiento FO ( $266,6 \pm 4,44 \mu\text{m}$  y  $15,7 \pm 0,46 \mu\text{m}.\text{día}^{-1}$ ) y FCT ( $266,3 \pm 4,80 \mu\text{m}$  y  $14 \pm 0,41 \mu\text{m}.\text{día}^{-1}$ ), estos últimos representan un grupo significativamente igual. El resto de los tratamientos alcanzaron tallas con tasas de crecimiento inferiores ( $\sim 250 \mu\text{m}$ ;  $\sim 13 \mu\text{m}.\text{día}^{-1}$ ).

En el transcurso del desarrollo larvario todos los tratamientos mostraron un evidente descenso progresivo de la población en cada una de sus réplicas, siendo los animales bajo el tratamiento FO los que mostraron menor mortalidad, alcanzando supervivencias de  $21,7 \pm 0,43 \%$  al final del desarrollo larvario (aparición de  $>50\%$  de larvas pediveliger competentes para el asentamiento), las cuales fueron significativamente mayores a los demás tratamientos, y casi el doble del control ( $13,1 \pm 0,49 \%$ ), que mostró supervivencias significativamente iguales al tratamiento FCT ( $10,6 \pm 0,18 \%$ ); el resto de tratamientos mostraron supervivencias  $<6\%$ .

La obtención de las poblaciones larvarias en más del 50% en su nivel de larvas competentes se alcanzó en el tratamiento control a los 15 días PF, seguido el tratamiento con el antibiótico (día 17 PF). En el resto de los tratamientos el desarrollo larvario finalizó a los 19 días PF.

### Asentamiento y crecimiento postlarvario

Las larvas competentes del tratamiento FO mostraron un significativo mayor porcentaje de asentamiento ( $61,3 \pm 0,15\%$ ), seguido del control (C) con  $44,8 \pm 0,16\%$ . Estos porcentajes fueron muy superiores a los

demás tratamientos (<3%) (Tabla 2).

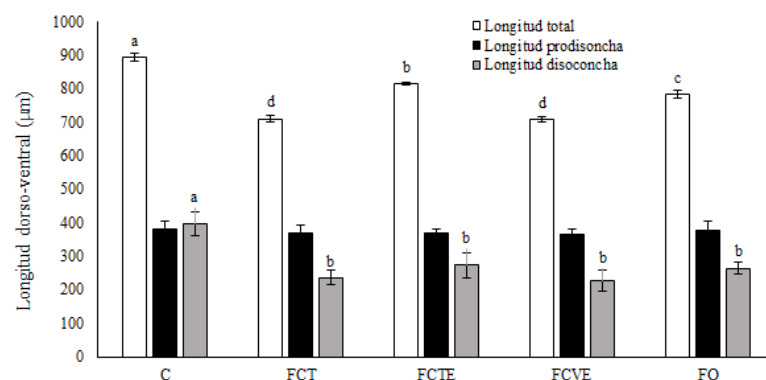
**Tabla 2** Porcentaje de asentamiento de las larvas pediveliger en los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Asentamiento (%)
C	44,8 ± 0,16 <sup>b</sup>
FCT	2,3 ± 0,10 <sup>c</sup>
*FCV	0
FCTE	0,8 ± 0,18 <sup>d</sup>
FCVE	0,2 ± 0,10 <sup>d</sup>
FO	61,3 ± 0,15 <sup>a</sup>

Las letras superpuestas indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ), ( $\pm$ ES)

\*Larvas de este tratamiento no llegaron a formar mancha ocular, al día 19 se observó la mortalidad masiva de las larvas con este tratamiento.

En las postlarvas, la longitud dorso-ventral de la prodisoconcha II no mostró diferencias significativas entre los tratamientos; sin embargo, en la longitud DV de la disoconcha, el tratamiento C mostró valores de  $396,6 \pm 34,8 \mu\text{m}$ , significativamente mayores a los demás tratamientos (<300  $\mu\text{m}$ ), estas diferencias provocaron también una significativa mayor longitud total de semillas ( $894 \pm 11,5 \mu\text{m}$ ) por encima de los demás tratamientos, le siguieron FCTE ( $815 \pm 5 \mu\text{m}$ ) y FO ( $782,6 \pm 13 \mu\text{m}$ ), y con igualdad estadística FCT y FCVE con valores  $\sim 710 \mu\text{m}$  (Fig. 2).



**Figura 2** Longitud dorso-ventral de prodisoconcha II, disoconcha y total de las semillas de *Crassostrea gigas* cultivadas a los diferentes regímenes de calidad del agua de cultivo.

Las barras indican el error estándar y las letras diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). C= filtración por 10, 5 y 1  $\mu\text{m}$  +UV (control); FCT= Control+UV+hipoclorito+tiosulfato; FCV=Control +hipoclorito+Vitamina C; FCTE= Control+hipoclorito+tiosulfato+EDTA; FCVE= Control+hipoclorito+Vitamina C+EDTA; FO= Control+UV+Oxitetraciclina.

## DISCUSIÓN

La respuesta en el desarrollo larvario y postlarvario de *Crassostrea gigas* ante los tratamientos del agua ensayados fue diferente en todos los parámetros evaluados. Los mejores resultados fueron alcanzados con el tratamiento control (C) y la adición de antibiótico (Oxitetraciclina 98% en dosis de  $4 \text{ mg}^{-1}$ ; FO): mientras en C se obtuvieron significativamente las mayores tallas en larvas competentes para el asentamiento, con mayor tasa de crecimiento en el desarrollo larvario en 15 días y con una mayor longitud postlarvaria; en el tratamiento FO se obtiene significativamente mayor supervivencia (casi el doble) y mayor tasa de asentamiento, pero con 2 días más que el obtenido con el tratamiento C. Estos resultados sugieren que las larvas al ser tratadas con el antibiótico sobreviven más, aunque con menor condición, ya que poseen menor crecimiento y un retardo de 2 días en el desarrollo larvario. El significativo mayor crecimiento de las postlarvas en el tratamiento C (sin antibiótico), soporta la hipótesis de mejor condición larvaria que en el tratamiento con el antibiótico.

El objetivo con el uso de antibióticos en desarrollos larvarios de moluscos bivalvos es principalmente disminuir la carga bacteriana, particularmente la de potencial patogenicidad, como bacterias tipo *Vibrio*

(Uriarte *et al.* 2001, Sowerby and Campa-Córdova 2005, Miranda *et al.* 2013) llegándose a sugerir que el tratamiento antibiótico mejora la condición y supervivencia post-metamorfica debido a que reduce la cantidad de energía asignada a la defensa de patógenos bacterianos (Pernet *et al.*, 2006). La notable mejor supervivencia en el tratamiento con antibiótico muestra un evidente problema bacteriano en el desarrollo larvario; sin embargo, las larvas sin antibiótico (control) muestran mejor condición, sugiriendo que el antibiótico puede afectar negativamente en el metabolismo y estado fisiológico larvario, lo cual sugiere aún más limitar el uso de antibióticos en la producción de semillas de *Crassostrea gigas*.

El tercer mejor tratamiento fue el FCT, el cual alcanzó tallas de larvas competentes significativamente iguales a FO y supervivencias similares a C, pero con longitud postlarvaria menor y una tasa de asentamiento mucho menor, lo cual muestra una evidente menor condición de las larvas tratadas con FCT con respecto al control y a FO. La clorinación del agua y declorinación con tiosulfato es una técnica bastante común en acuicultura, específicamente en el cultivo de crustáceos donde las dosis recomendadas van de 5 a 20 ppm (Lio-Po *et al.* 1989), demostrándose además que el cloro podría inactivar bacterias luminosas potencialmente patógenas (Jawahar *et al.* 2002), así como bacterias Gram positivas (Pascho *et al.* 1995) e incluso virus (Tree *et al.* 1997); no obstante, en nuestro estudio el cloro y/o tiosulfato de sodio pudo alterar la composición química del agua y con ello fisiológicamente las larvas de *C. gigas*, tal como lo muestra De Wit *et al.* (2018) quienes encontraron que al manipular químicamente el agua de mar el crecimiento de la concha de larvas de mejillones y ostras se ve afectado negativamente.

De igual manera, podría existir una toxicidad a partir de las reacciones químicas generadas en el proceso de clorinación sobre los organismos acuáticos, situación confirmada con el sulfato de sodio en moluscos (Jorge y Moreira 2005), o el sulfato de cobre en crustáceos (Mendoza-Rodríguez 2009, Scelzo 1997) y peces (Velasco-Santamaria *et al.* 2006; Wu *et al.* 2003), en vista de ello, se hace necesario investigaciones para determinar cómo interaccionan los químicos usados para causar su efecto en larvas de *C. gigas*, buscando dilucidar la hipótesis de toxicidad.

El resto de los tratamientos (FCV, FCTE y FCVE) que involucran la adición de vitamina y EDTA, mostraron los menores índices de condición en las larvas, especialmente el tratamiento con vitamina C, en el cual no se alcanzó a observar larvas competentes y al día 19 prácticamente existió una mortalidad casi total (supervivencia del 0,3 %). El uso de vitaminas en larvas de moluscos se limita generalmente a la que se encuentra en la composición de las microalgas. Aunque se desconoce actualmente la necesidad vitamínica en la fase larvaria de moluscos, en *Pecten maximus* se reporta un requerimiento de ácido ascórbico que va en incremento durante la fase larvaria (Seguineau *et al.* 1996). El ácido ascórbico se usa como un neutralizante eficaz del cloro y las cloraminas (Chu *et al.* 2010), más que para aprovechamiento por parte de las larvas, como es usado para algunos peces donde además de eliminar el cloro dañino, es usado también para brindar cierta protección contra las enfermedades, debido a la mejora del sistema inmunológico (Peterka 1998). En el presente estudio no se observó evidencia de un aporte benéfico al usar ácido ascórbico en el agua de cultivo, por el contrario, estos tratamientos fueron los de menor desempeño en la fase larvaria y en el asentamiento, lo cual sugiere que el ácido ascórbico no aportaría mejoras al desarrollo larvario en larvas de moluscos, al menos en *C. gigas*; una hipótesis alternativa es que la adición de ácido ascórbico pueda generar una reacción química en el agua al utilizarlo combinado con otros elementos, neutralizando su efecto. Experimentos de suministro único de este elemento vitamínico, contrastado con otros tratamientos son necesarios para dilucidar las hipótesis antes señaladas.

La lixiviación de metales pesados del agua de mar con EDTA es también muy común en acuicultura, así por ejemplo, la adición en dosis mayores a 2 ppm parece prevenir una mortalidad significativa, mejorando la supervivencia de las larvas del crustáceo *Penaeus monodon* (Licop 1988). En bivalvos Helm *et al.* (2004) sugiere el uso de EDTA para reducir metales pesados en el agua del cultivo. En contraparte, Tanyaros (2011) demostró que el agua no tratada con EDTA produce una mejor tasa de supervivencia en larvas de *C. belcheri*, situación muy parecida a los resultados obtenidos en esta investigación.

La respuesta de afección de los tratamientos al agua utilizada para la producción de semillas de moluscos, sin duda es especie dependiente (Gretchen *et al.* 2004), inclusive en especies dentro de una

misma familia taxonómica, por ejemplo Abasolo-Pacheco (2009) observó una respuesta diferencial en los desarrollos larvarios entre especies de pectínidos: para *Nodipecten subnodosus* las mejores tasas de supervivencia y asentamiento larvario fue conseguido cuando el cultivo larvario se realizó con agua de mar filtrada, en *Argopecten ventricosus* resultó mejor con agua de mar pasteurizada. Por otra parte, con el tratamiento control utilizado en este estudio, se hace necesario la adición de antibióticos para el desarrollo larvario de los pectinoides *N. subnodosus* (Revilla *et al.* 2019a) y *Spondylus limbatus* (Loor *et al.* 2016), e inclusive para la ostra de roca u ostra nativa *Striostrea prismatica* (Lodeiros *et al.* 2017); sin embargo, no es así con *C. gigas*, sugiriendo una mayor resistencia de esta especie ante patógenos larvarios.

Nuestros resultados demuestran la eficacia del tratamiento físico del agua filtrada e irradiada con UV en flujos de 10 L min, y de la terapia basada en Oxitetraciclina para aumentar la supervivencia, así como también influenciar positivamente en la tasa de asentamiento; sin embargo, no recomendamos el uso de antibióticos en la producción de semillas de *C. gigas*, por generar menor condición fisiológica de las larvas y sus efectos de crear resistencia dentro y fuera de la *hatchery*, más bien alentamos a la búsqueda de alternativas para mejorar y optimizar el desarrollo larvario, sin generar efectos colaterales, como el uso de aceites esenciales de comprobada efectividad en la mejora de al menos el desarrollo embrionario de moluscos bivalvos (Revilla *et al.* 2019b) o el uso de probióticos (García-Bernal *et al.* 2020).

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al personal auxiliar del laboratorio de investigación de moluscos de CENAIM-ESPOL. Esta investigación se realizó como parte complementaria del proyecto de investigación "Desarrollo del protocolo de domesticación para el uso sostenible de nuevas especies marinas para el consumo de alimentos y la repoblación de bancos naturales, financiado por SENESCYT, Ecuador".

## REFERENCIAS

- Abasolo-Pacheco F., Mazón-Suástegui J.M., Saucedo P.E. (2009). Response and condition of larvae of the scallops *Nodipecten subnodosus* and *Argopecten ventricosus* reared at the hatchery with different seawater sources. *Aquaculture*, 296:255–262. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.08.028>.
- Álvarez R., Cobo L., Sonnenholzner S., Stern S. 2008. Estado actual de la acuicultura de moluscos bivalvos en Ecuador. In Lovatelli A., Fariás A., Uriarte I. (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. 129-133.
- Barros P., Sobral P., Range P., Chicharo L., Matias D. (2013). Effects of sea-water acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 440:200-206. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.12.014>.
- Boyd C.E., Massaut L. (1999). Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 20: 113-132. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(99\)00010-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(99)00010-2)
- Boyd C.E., Tucker C.S., Somridhivej B. (2016). Alkalinity and Hardness: Critical but Elusive Concepts in Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47:6-41. DOI: <https://doi.org/10.1111/jwas.12241>.
- Chu W.H, Gao N.Y., Deng, Y. (2010). Formation of haloacetamides during chlorination of dissolved organic nitrogen aspartic acid. *Journal of Hazardous Materials*, 173:82-86. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.08.051>.
- De Wit, P., Durland, E., Ventura, A., Waldbusser, G. G., Langdon, C. J. (2016). Effects of pCO<sub>2</sub> stress on



- gene expression and biomineralization of developing larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In American Geophysical Union, Ocean Sciences Meeting 2016, abstract# AH11A-07.
- De Wit P., Durland E., Ventura A., Langdon C.J. (2018). Gene expression correlated with delay in shell formation in larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) exposed to experimental ocean acidification provides insights into shell formation mechanisms. *BMC Genomics*, 19 160.
- Dubert J., Osorio C.R., Prado S., Barja J.L. (2016). Persistence of Antibiotic Resistant *Vibrio* spp. in Shellfish Hatchery Environment. *Microbial Ecology*, 72(4):851-860. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0705-5>.
- FAO (2020). Fishery statistical collections. Global Aquaculture Production 1950–2017. FAO Fisheries and Aquaculture Department (on line), Roe. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en>, Accessed date: 15 February 2020.
- García-Bernal, M., Ossorio-Álvarezl, P. A., Medina-Marrero, R., Marrero-Chang, O., Casanova-González, M., & Mazón-Suástegui, J. M. (2020). Effect of *Streptomyces* sp. RL8 on the survival of *Artemia franciscana* nauplii and resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fisheries Science*, 86(1):137-144. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12562-019-01378-0>.
- Gosling E. (2015) Marine Bivalve Molluscs. 2nd Edition, Wiley-Blackwell, Hoboken, 258 pp. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/9781119045212>.
- Gretchen K.B., Stephen J.K., Joseph R.T., Raymon A.W. (2004). Changes in water quality after addition of sea salt to fresh water: implications during toxicity testing. *Chemosphere*, 57:1707-1711.
- Helm, M.M.; Bourne, N.; Lovatelli, A. (2004). Hatchery culture of bivalves. A practical manual.FAO Fisheries Technical Paper. No. 471. Rome, FAO. 177p.
- Jawahar T., Palamiappan R., Dhevendaran K. (2002). Inactivation of luminous *Vibrio* spp. by free chlorine. *Bangladesh Journal of Fisheries*. 6(1):53-58.
- Jones J.B. (2006). Why won't they grow? - Inhibitory substances and mollusc hatcheries. *Aquaculture International*, 14: 395-403. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10499-005-9040-z>.
- Jorge R.A., Moreira G.S. (2005). Use of sodium dodecyl sulfate and zinc sulfate as reference substances for toxicity tests with the mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61: 280-285. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.09.005>.
- Kasai H., Yoshimizu M., Ezura Y. (2002). Disinfection of Water for Aquaculture. *Fisheries Science*., 68:821-824. DOI: [https://doi.org/10.2331/fishsci.68.sup1\\_821](https://doi.org/10.2331/fishsci.68.sup1_821).
- Kurihara H., Kato S., Ishimatsu A. (2007). Effects of increased seawater pCO<sub>2</sub> on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Biology*, 1:91-98. DOI: <https://doi.org/10.3354/ab00009>.
- Licop M.S.R. (1988). Sodium-EDTA effects on survival and metamorphosis of *Penaeus monodon* larvae. *Aquaculture*, 74:239-247. DOI: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90368-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90368-7).
- Lio-Po G. D., Fernandez R. D., Cruz,E. R., Baticados M. C. L., Llobrera, A.T. (1989). Recommended practices for disease prevention in prawn and shrimp hatcheries. Tigbauan, Iloilo, Philippines. Aquac. Dep. Southeast Asian Fish. Dev. Center. Aquaculture extensión pamphlet 3, 15 pp.
- Lodeiros C., Marquez A., Revilla J., Rodríguez-Pesantes D., Sonnenholzner S. (2017). Spat production of

- the rock oyster *Striostrea prismatica* (Gray, 1825). *Journal of Shellfish Research*, 36 (3):729-735.
- Lodeiros C., Rodríguez-Pesantes D., Márquez A., Revilla J., Chávez-Villalba J., Sonnenholzner S. (2018). Suspended cultivation of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the Eastern Tropical Pacific. *Aquaculture International*, 26:337-347. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0217-z>.
- Lombeida P. (1997) Manual para el Cultivo de Ostras en Granjas Camaroneras. Proyecto JICA-CENAIM 25.
- Loor A., Ortega D., Lodeiros C., Sonnenholzner S. (2016) Early life cycle and effects of microalgal diets on larval development of the spiny rock-scallop, *Spondylus limbatus* (Sowerby II, 1847). *Aquaculture*, 450:328-334
- Martin M., Osborn K.E., Billig P., Glickstein N. (1981). Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and Cancer magister larvae. *Marine Pollution Bulletin*, 12:305–308. DOI: [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(81\)90081-3](https://doi.org/10.1016/0025-326X(81)90081-3).
- Mendoza-Rodríguez R. (2009). Toxicidad Aguda Del Sulfato de Cobre en Postlarvas de Camarón *Cryphiops Caementarius*. *Archivos de Zootecnia*, 58:103–110. DOI: <https://doi.org/10.4321/s0004-05922009000100011>.
- Miranda C.D., Rojas R., Abarca A., Hurtado L. (2013). Effect of florfenicol and oxytetracycline treatments on the intensive larval culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture Research*, 45:16-30. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03200.x>.
- Pascho, R.J., Landolt, M.L., Ongerth, J.E. (1995). Inactivation of *Renibacterium salmoninarum* by free chlorine. *Aquaculture*, 131:165-175. DOI: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00361-Q](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00361-Q).
- Pernet F., Bricelj V.M., Cartier S. (2006). Lipid class dynamics during larval ontogeny of sea scallops, *Placopecten magellanicus*, in relation to metamorphic success and response to antibiotics. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 329:265-280. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.09.008>.
- Peterka G. (1998). Vitamin C-A Promising Dechlorination Reagent. *Opflow*, 24:1-5. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1551-8701.1998.tb02153.x>.
- Revilla J, Márquez A., Lodeiros C., Sonnenholzner S. (2019a). Experimental cultures of giant lion's paw *Nodipecten subnodosus* in equatorial waters of the eastern Pacific: progress in larval development and suspended culture. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(5):818-825.
- Revilla J., Márquez A., Rodríguez-Pesantes D., Domínguez-Borbora C., Rodríguez J., Lodeiros C., Sonnenholzner S. (2019b). Oregano oil as a therapeutic treatment in the production of mixotrophic larvae of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Aquaculture*, 498:422-427.
- Scelzo M.A. (1997). Toxicidad del cobre en larvas nauplii del camarón comercial *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Investigaciones marinas*, 25:177-185. DOI: <https://doi.org/10.4067/s0717-71781997002500013>.
- Seguineau C., Laschi-Loquerie A., Moal J., Samain J.F. (1996). Vitamin requirements in great scallop larvae. *Aquaculture International*, 4: 315-324. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00120948>.
- Sowerby A.V., Campa-Córdova A.A.I. (2005). Prophylactic Use of Antibiotics in Larval Culture of *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1835). *Journal of Shellfish Research*, 24:923-930. DOI: [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[923:puoail\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[923:puoail]2.0.co;2).

- Sussarellu R., Lebreton M., Rouxel J., Akcha F., Rivière G. (2018). Copper induces expression and methylation changes of early development genes in *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic Toxicology* 196: 70-78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.001>
- Tanyaros, S., 2011. Na<sub>2</sub>-EDTA effects on the development of oyster, *Crassostrea belcheri* (Sowerby) Larvae. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 45:1058-1063.
- Torrentera L, Tacon A. (1989). La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. Una diagnosis. FAO-Italia. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB473S00.htm>.
- Tree J.A., Adams M.R., Lees D.N. (1997). Virus inactivation during disinfection of wastewater by chlorination and UV irradiation and the efficacy of F+ bacteriophage as a “viral indicator.” *Water Science and Technology*, 35:227-232. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00263-1](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00263-1).
- Treviño, L., Lodeiros, C., Vélez-Falcones, J., Chávez-Alcivar, C., Isea-León, F., Bermúdez-Medrandá, A. E., Vélez-Chica J.C., Cruz-Quintana Y., Leal D., Santana-Piñeros A.M. Rodríguez-Pesantes, D. (2020) Suspended culture evaluation of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in a tropical estuary. *Aquaculture Research*. DOI: <https://doi.org/10.1111/are.14556>.
- Uriarte I., Farías A., Castilla J.C. (2001). Effect of antibiotic treatment during larval development of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquacultural Engineering*, 25:139-147. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(01\)00078-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(01)00078-4).
- Velasco-Santamaría Y.M., Gómez-Manrique W., Calderón-Bernal J.M. (2006). Toxicidad aguda del sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) en alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) bajo condiciones de aguas blandas Acute copper sulphate (CuSO<sub>4</sub>) toxicity in cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) fingerlings under soft water co. *Revista Orinoquía*, 10:64–70.
- Wu S.M., Jong K.J., Kuo S.Y. (2003). Effects of copper sulfate on ion balance and growth in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45:357-363. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-003-0122-5>.
- Zar J. (2010). *Biostatistical Analysis*, 5th edition. Prentice- Hall, New Jersey, pp. 944.

Recibido: 21-01-2020  
Aprobado: 10-03-2020  
Versión final: 01-04-2020

