



TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Herramientas para el manejo de la almeja
amarilla *Mesodesma mactroides* en
condiciones experimentales

Carlos Proverbio

Orientador: Dr. Diego Lercari

Co-orientador: Dr. Daniel Carnevia

UNDECIMAR - Facultad de Ciencias

Instituto de Investigaciones Pesqueras - Facultad de Veterinaria

Mayo 2017

“El camino es la recompensa”

O. W. Tabárez

Agradecimientos

Gracias a mi familia, en especial a mis padrinos por apoyarme en este retorno a mis estudios.

Gracias a Daniel Carnevia, Alejandro, Maite, Daniela y a todo el equipo del Instituto de Investigaciones Pesqueras de la Facultad de Veterinaria, que pusieron a disposición desde el principio (allá por el 2015) su tiempo, conocimiento, equipo y materiales.

Gracias a Nacho, Luis, Eleonora, Omar y a toda la gente de UNDECIMAR, por sus aportes, sugerencias y conocimientos. En especial agradezco a Diego Lercari, no hubiera sido posible este trabajo sin contar con su apoyo moral, intelectual y material.

Gracias a Beatriz, Bruno, Marinela, María, Daniel y a todo el personal del Servicio ECCA de la IMM, por su apoyo material e intelectual, en especial a Gustavo Saona, quién aportó para este trabajo su invaluable experiencia y conocimientos en bioensayos y análisis de supervivencia.

Agradezco a todos los que ayudaron a construir y recorrer este camino, que no es solo mío, que nos pertenece a todos.

Tabla de contenido

Resumen	4
1.Introducción.....	5
1.1. Importancia ecológica y comercial de los moluscos bivalvos	5
1.2. <i>Mesodesma mactroides</i>	7
1.3. Fundamentación	13
1.4. Objetivo general	13
1.5. Hipótesis	14
2. Materiales y métodos	15
2.1. Muestreo de campo y transporte a laboratorio	15
2.2.1. Biometría.	16
2.2.2. Acondicionamiento.	16
2.3. Diseño experimental	17
2.3.1. Evaluación del método de marcaje	17
2.3.2. Experiencias de alimentación	18
2.3.3. Experiencias de producción de biofloc.....	20
2.3.4. Evaluación de AMAs.....	21
2.3.5. Experimentos de posición anatómica.	23
3. Resultados	23
3.1. Método de marcaje	23
3.2. Dietas alternativas y biofloc.....	26
3.3.Experiencias de producción de biofloc	30
3.4.Evaluación de las AMAs	36
3.5.Posición anatómica.....	37
4. Discusión.....	38
4.1.Método de marcaje	38
4.2. Dietas alternativas y biofloc.....	39
4.3.Producción de biofloc.....	42
4.4.Evaluación de las AMAs	44
4.5.Posición anatómica.....	44
5. Conclusiones y perspectivas	46
6. Bibliografía	48
7. Anexos	56
7.1. Cálculos de ración	56
7.2. Evaluación de los índices de condición (IC)	57

Resumen

Los moluscos bivalvos son componentes fundamentales de los ecosistemas marinos. Afectan significativamente los procesos fisicoquímicos, brindando importantes servicios ecosistémicos. Son importantes recursos acuícolas y pesqueros, también son utilizados como herramientas de monitoreo y manipulación ambiental. La almeja amarilla *Mesodesma mactroides* es una especie infaunal habitante de la zona intermareal de playas arenosas oceánicas de Uruguay. La especie se encuentra en régimen de explotación por co-manejo, buscando la comercialización de la captura como producto gastronómico gourmet. Para ello se realiza un proceso de depuración en cautiverio, donde la calidad del agua y el manejo de los organismos es clave para la obtención de un producto seguro y de calidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar experimentalmente diversas técnicas que permitan mantener en buen estado a ejemplares de *Mesodesma mactroides* en condiciones de laboratorio. Se realizaron ensayos de supervivencia evaluando un método de marcaje por etiquetado, la alimentación (dietas alternativas y biofloc), producción de biofloc, tipos de agua marina artificial (AMA) y posición anatómica de los organismos en cautiverio. Los resultados muestran que el método de marcaje no afectó la supervivencia y no se alteró la legibilidad de las marcas. La Spirulina seca resultó adecuada como dieta alternativa y el biofloc fue eficaz como sistema de tratamiento de aguas de cultivo, cuando la producción de biofloc se separa del recipiente que contiene a los animales (macrocosmo-microcosmo). El AMA de composición más simple y menor costo, afectó significativamente la supervivencia luego de la primera semana de experimentación. Por último, se comprobó que mantener a los individuos en posición vertical aumenta significativamente la supervivencia respecto a la posición horizontal. Estos resultados tienen aplicabilidad experimental inmediata, contribuyendo a mediano plazo al desarrollo acuícola de la especie.

1. Introducción

1.1. Importancia ecológica y comercial de los moluscos bivalvos

El Phylum Mollusca es uno de los más diversificados y cosmopolitas del reino animal, habitan ambientes terrestres y acuáticos de agua dulce, salobre o marina en todas las latitudes (Gosling 2003). La Clase Bivalvia (también llamada Lamellibranchia o Pelecípoda) son invertebrados celomados, que presentan el cuerpo comprimido lateralmente y dos valvas compuestas de CaCO_3 , que encierran total o parcialmente las partes blandas del animal (FAO 2006).

Los bivalvos filtradores (entre ellos las almejas) cumplen un importante rol en el flujo de materia y energía, impactando de manera significativa en los procesos fisicoquímicos de los ecosistemas en que habitan. Proveen refugio y alimento a otras especies, promoviendo el establecimiento de redes tróficas, aumentando la biodiversidad y resiliencia de ambientes ricos en recursos pero inestables como los ambientes costeros y estuarinos (Dame 1993, Gutiérrez 2003, Wright 2006, Sousa 2009). Son entonces componentes fundamentales de la salud de estos sistemas, brindan importantes servicios ecosistémicos (Coen 2007, Dame 2012), lo cual los transforma en poderosas herramientas de manipulación ambiental (Newell 2004, Lindahl 2005, Coen 2007, Cole 2011).

Los bivalvos son la macrofauna bentónica predominante en términos de biomasa de ecosistemas costeros y estuarinos, los cuales se hallan expuestos a un aumento continuo de estrés provocado por el hombre y el cambio climático (Sherman 1994). Su carácter sedentario, los grandes volúmenes de agua que filtran y los efectos mensurables en ellos a todas las escalas, tanto de organización como espacio-temporales, los hacen excelentes biomarcadores de la presencia y nivel de la contaminación, polución y eutrofización en

ecosistemas de alto valor socio-económico (Dame 1993, 2012, Morley 2009, Lagadic 1994). Su característica de bioconcentradores de varias sustancias los hace muy útiles como indicadores de la presencia de metales. En 1976 Estados Unidos estableció el “Mussel Watch Monitoring Program”, que utiliza las poblaciones de mejillones y ostras como herramienta de monitoreo para detectar la presencia de contaminación química en ambientes costeros y estuarinos (metales pesados, hidrocarburos, organoclorados, radionucléotidos, nanopartículas y biotoxinas). Reino Unido, Francia, Canadá, Taiwan, India, Australia, Japón, Sud África y Rusia tienen programas similares (Dame 2012).

Por otro lado la explotación de los bivalvos por el hombre como fuente de alimento de calidad se remonta a los orígenes la humanidad. En la actualidad las poblaciones sujetas a explotación sufren los mismos problemas que otros recursos pesqueros: sobreexplotación y deterioro de las condiciones ambientales debido a la contaminación, eutrofización y cambio climático (Defeo 1995, Lercari 2002).

El desarrollo y crecimiento de la acuicultura de moluscos en los últimos 30 años explican los niveles actuales donde la producción acuícola supera varias veces los volúmenes de la captura por pesca (FAO 2008). La producción acuícola mundial alcanzó los 66,6 millones de toneladas en 2012, entre peces, crustáceos y moluscos, continentales o marítimos. De ellos 15,2 millones de toneladas (22,8%) corresponden a la acuicultura de moluscos, casi exclusivamente marinos; especies de almejas y berberechos (Familia Veneridae) constituyen la tercera parte de esta producción (FAO 2008, 2012, 2014).

Las etapas de cultivo de moluscos bivalvos incluyen el acondicionamiento de reproductores, obtención de gametos, fecundación, cultivo de larvas, fijación y cultivo de semilla (hatchery). Luego esta semilla es sembrada en el medio natural para terminar el engorde o crecimiento hasta la talla comercial (Coutteau 1993, FAO 2006, 2008). El proceso de

comercialización para consumo humano implica un paso previo de depuración, necesario para asegurar la calidad sanitaria (FAO 2010).

En Uruguay la acuicultura se encuentra en un estado incipiente de desarrollo, siendo el principal objetivo de cría especies exóticas. Diversos diagnósticos coinciden en que los limitados avances se deben a un conjunto de factores que incluyen variables de orden técnico, ambientales, de mercado y de carencia de políticas de estado específicas (DINARA 2008). En este contexto, el cultivo de moluscos bivalvos solo tiene como antecedentes algunos intentos de cultivo de mejillón en las costas de Rocha y Maldonado, con dificultades técnicas para mantener las estructuras de cultivo en la costa uruguaya.

1.2. *Mesodesma mactroides*

Mesodesma mactroides es un molusco bivalvo infaunal, habitante de la zona intermareal en playas de la costa Atlántica de América del Sur, desde Santos (Brasil, 24° S) hasta Río Negro (Argentina, 41° S) (Fiori 2004). *M. mactroides* vive enterrada en la arena en posición vertical a profundidades mayores a los 10,0 cm (Maneiro 2014), preferentemente en la zona intermareal de playas disipativas en la costa oceánica de Rocha, un ambiente rico en nutrientes y oxígeno, pero a la vez dinámico. Su cuerpo está recubierto por dos valvas de carbonato de calcio y proteínas, unidas y articuladas en la charnela. Las partes blandas están recubiertas por el manto que forma una cavidad que contiene los órganos. Posee dos sifones en posición posterior, uno exhalante (posterior dorsal) y otro inhalante (posterior ventral), éstos se comunican con un par de hemibranquias colocadas a cada lado del cuerpo (izquierda y derecha). Las branquias cumplen una doble función respiratoria y de captación de alimento. En la parte anteroventral se encuentra un pie musculoso que el animal utiliza para enterrarse.

En Uruguay la pesca artesanal de almeja amarilla se desarrolla en una franja de costa de 22 Km de extensión entre la Coronilla y Barra de Chuy (Gianelli 2015). En una primera etapa

(1940-1987), se realizó bajo régimen de acceso abierto al recurso, lo que llevó a su sobreexplotación, colapso y cierre de la pesquería por tres años (1987-1990) (Defeo 1992). Desde el año 2009 la explotación se realiza bajo régimen de co-manejo (Gianelli 2015), otorgándose permisos personales de extracción y buscando la comercialización viva para consumo humano (FAO 2015) como producto gourmet.

El tratamiento previo a la venta implica un período de 48 horas de depuración en recipientes de 700 L conteniendo agua marina tomada de la costa. La depuración es el proceso por el cual se eliminan contaminantes microbianos y químicos de los moluscos bivalvos, colocándolos en recipientes con agua limpia para que lleven a cabo su actividad normal de filtración y bombeo durante períodos variables de tiempo de horas a varios días. Es una etapa previa a la venta para consumo, exigida por la legislación internacional o nacional como medio para proteger a los consumidores garantizando un producto seguro (NSSP GUIDE 2009, Richards 2010, FAO 2010).

Tabla 1. Riesgos sanitarios asociados al consumo de moluscos bivalvos contaminados por los agentes más comúnmente encontrados en la zona costera. Tomado de FAO 2010.

Riesgo	Contaminante
Infecciones	Bacterias <i>Salmonella spp.</i> , <i>Shigella</i> spp., <i>Vibrio parahaemolyticus.</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Campylobacter spp.</i> , <i>Lysteria monocytogenes</i>
	Virus Norovirus, virus de la hepatitis A
Intoxicaciones	Químicas Metales pesados: Hg, Cd, Pb Orgánicos: Dioxinas, Bifenoles policlorados (PCB) Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), plaguicidas
	Biotoxinas Toxina paralizante de los moluscos (PSP), toxina diarreica de los moluscos, toxina amnésica de los moluscos (ASP), neurotoxina de los moluscos (NSP)

En muchos sistemas legislativos el factor que determina la necesidad de realizar el proceso de depuración es la clasificación de la zona de producción o extracción según criterios de evaluación de los riesgos sanitarios. Sistemas de clasificación de zonas y depuración están implementados en varios países incluyendo la UE, USA, Japón, Nueva Zelanda, México, Chile y Argentina. El éxito de este procedimiento implica la reanudación de la actividad filtradora por parte de los individuos de la especie objetivo. Para ello se deben suministrar las condiciones fisicoquímicas de salinidad, temperatura, oxígeno y calidad de agua óptimas para cada especie. Por esto se debe asegurar la provisión continua de agua marina natural o artificial con los adecuados parámetros fisicoquímicos y microbiológicos para el correcto desarrollo del proceso de depuración. El tiempo necesario para lograr la eliminación efectiva total o parcial del contaminante depende de la naturaleza del mismo. Aunque el criterio mayormente utilizado es de períodos de depuración de 48 horas en condiciones óptimas, este ha demostrado no ser efectivo para eliminar o reducir *Vibrio spp.*, virus, biotoxinas y distintos contaminantes químicos (FAO 2010).

No se encontró una caracterización de la zona de extracción y depuración de *M. mactroides* en Uruguay, ni para los criterios establecidos en la legislación internacional o según criterios propios. Tampoco se encontraron estudios sobre el potencial o efectividad del proceso de depuración en la eliminación de los posibles contaminantes a los que se expone *M. mactroides* en la zona de extracción.

Los estudios de marcaje y recaptura son una herramienta importante en investigaciones eco-fisiológicas, proveen información sobre tasas de crecimiento y supervivencia, dispersión, productividad del área de estudio, estructura y volumen de los stocks, etc. (Riley 2010, Shanshan 2017). Es variado y extendido el uso de métodos de marcaje en investigación de moluscos bivalvos. Estos incluyen marcas dibujadas directamente en las valvas, varios métodos de etiquetado y la utilización de sustancias químicas como la calceína o alzeína.

Existen referencias sobre la utilización de métodos de marcaje químico, como herramientas experimentales *in situ* en esta especie (Lepore 2009).

El método de etiquetado elegido en este estudio (etiqueta plástica pegada a las valvas con cianoacrilato) es un método no invasivo, de bajo costo y de manipulación sencilla y rápida (Todolí 2014), como contrapartida podrían perderse un número significativo de marcas, o que estas quedaran ilegibles por efecto de la abrasión.

En otro orden, no se encontraron estudios previos sobre alimentación *in vitro* en *M. mactroides*, la información disponible sobre alimentación *in vitro* en moluscos bivalvos proviene de su investigación y aplicación en las etapas de hatchery, con el fin de obtener semilla de calidad en cantidad para terminar su engorde en el medio ambiente (FAO 2006).

La alimentación de adultos es un punto crítico en la etapa de acondicionamiento de los reproductores, el cultivo controlado busca las condiciones óptimas fisicoquímicas y nutricionales para obtener la mayor cantidad de gametos viables. Realizar este procedimiento implica disponer de un criadero de algas, sincronizar su producción con el acondicionamiento y quedar expuesto a mayores riesgos y costos en el proceso productivo (FAO 2006, 2008). Una posible solución tanto para asegurar el stock de ración como para mejorar su calidad, es la utilización de algas secas (Utting 1997).

En el cultivo de semilla se alimenta a larvas y juveniles hasta alcanzar el tamaño adecuado para ser sembrados en el ambiente. Al igual que los adultos, larvas y juveniles son alimentados con algas cultivadas, aunque en esta etapa de cultivo el punto crítico es la calidad del agua de cría, sobre todo el aspecto microbiológico (Elston 1984, FAO 2006, Beaz-Hidalgo 2010). Sin embargo el cultivo de algas como alimento tiene un peso importante en los costos operativos (Coutteau 1992).

Las dietas alternativas permiten mejorar la calidad del alimento, disponer de un stock y bajar los costos de producción. Se utiliza la sustitución total o parcial de las algas frescas por levaduras, levaduras tratadas para facilitar su digestión, emulsiones lipídicas, microcápsulas, algas centrifugadas o algas secas (entre ellas la cianobacteria *Arthrospira platensis*) (Coutteau 1992, 1993, 1994, 1994, Nell 1996, Caers 1999).

La aplicación del biofloc en la experimentación y cría de moluscos bivalvos tiene potenciales aplicaciones en el manejo de la calidad de agua y la alimentación. La tecnología de biofloc optimiza el manejo de algunos recursos durante el cultivo de especies acuáticas. Por un lado se optimiza el recurso agua, ya que se evita el recambio durante toda la fase de cultivo (Crab 2010, Schweitzer 2013, Luis-Villaseñor 2015, Manan 2016). Por otro lado se optimiza la alimentación, ya que los animales pueden alimentarse de los flocs y esto disminuye el costo de alimentación (Azim 2008, Crab 2012, Emerenciano 2013). A la vez permite controlar variables como los residuos orgánicos (Ebeling 2006, De Shryver 2008, Ekasari 2014, Bakar 2015, Collazos-Lasso 2015), la introducción de parásitos y toxinas producto de los recambios de agua necesarios para evitar la acumulación de estos residuos en los estanques (Zhao 2012).

A través del manejo de la relación C:N y la oxigenación del medio, se genera un ambiente favorable para la proliferación de bacterias heterótrofas (Ray 2010, Monroy-Dosta 2013), punto de partida de un loop microbiano que recicla los desechos de las aguas de cría evitando su acumulación y transformándolos en materia orgánica (Ebeling 2006). Dependiendo de la especie cultivada este loop microbiano puede acoplarse a la cadena trófica y ser utilizado como alimento por los animales de cría (Azim 2008).

El uso de esta tecnología a nivel mundial está sumamente extendido y se aplica principalmente a la cría de varias especies de camarón y de tilapia (Emerenciano 2013), pero no se han encontrado referencias de su uso para la cría de moluscos bivalvos. Se ha

probado el uso de biofloc producido en la cría de camarón, en el uso como alimento de mejillones (Ekasari 2014). Aunque no hay registro de la utilización en Uruguay de este método acuícola a nivel industrial, si hay experiencias de su aplicación experimental a la cría de especies de peces autóctonas con buenos resultados (Carnevia 2014).

El suministro de agua de cultivo de calidad es un requisito imprescindible para el éxito en la cría y experimentación en moluscos bivalvos. En todas las etapas del cultivo comercial o experimental deben ser monitoreados y controlados parámetros fisicoquímicos (temperatura, salinidad, turbidez, presencia de toxinas) y microbiológicos (virus, patógenos y parásitos) (Héral 1991, FAO 2006).

La supervivencia y calidad del cultivo están determinados por el cumplimiento de estrictos requisitos fisiológicos. En la etapa de acondicionamiento se consigue la maduración de los gametos a través del manejo de la temperatura del agua de cultivo de los reproductores (FAO 2006), las larvas y juveniles obtenidos son susceptibles a infecciones y parásitos (Elston 1984, Sugumar 1998, Beaz-Hidalgo 2010) y el engorde extensivo de la semilla se encuentra expuesto a toxinas presentes en el medio ambiente (Héral 1991).

La calidad del agua asegura la obtención de un producto final seguro, a través de la depuración de los moluscos antes de su comercialización (FAO 2010). El uso de agua marina artificial (AMA) está extensamente probado en experimentación con moluscos bivalvos (Kester 1967, Gallager 1989, Tamburrini 1999), también se ha probado su uso en bioensayos en *M. mactroides* (Saucó 2013). Las sales para preparar el AMA se encuentran disponibles en el mercado, también se encuentran distintas fórmulas para su preparación.

1.3. Fundamentación

La investigación experimental de esta especie posee potenciales aplicaciones en el monitoreo ambiental de una zona de la costa uruguaya de gran valor socioeconómico y ecológico. *M. mactroides* es una especie autóctona de posible interés acuícola (Carnevia 2007), este estudio incorpora herramientas y métodos experimentales ampliamente utilizados en acuicultura, de bajo costo, técnica sencilla y tecnología básica, evaluando su aplicación en la almeja amarilla *M. mactroides*.

Los actuales usuarios de este recurso se enfrentan a una serie de problemas entre los cuales se encuentran el suministro de agua de depuración y la imposibilidad de mantener con vida y en buenas condiciones las almejas capturadas por relativamente largos períodos de tiempo con el fin de disponer de un stock de comercialización. El estudio de aspectos post extractivos brindará herramientas para la obtención y certificación del producto almeja amarilla como producto de consumo seguro y de calidad.

Actualmente la investigación más básica acerca de las condiciones de cría de este recurso resulta insuficiente. Al respecto son desconocidos métodos de marcaje e identificación individual de los organismos vivos, condiciones óptimas en cuanto a la calidad y tipo de agua de cría, u opciones básicas de alimentación natural o artificial entre otros aspectos.

Objetivo general

Este trabajo busca evaluar métodos que permitan mantener en buen estado y estimar la condición fisiológica (Anexo 7.2) de *M. mactroides* en laboratorio, a los efectos de avanzar en los conocimientos hacia un manejo que permita el desarrollo *in vitro* de estudios ecofisiológicos en esta especie.

Objetivos específicos

- 1- Evaluar un método de marcaje individual en *M. mactroides*.
- 2- Comparar dos raciones como alimento para *M. mactroides* y a su vez compararlas con el biofloc producido a partir de ellas.
- 3- Evaluar un método de producción de biofloc a partir de dos fuentes de nitrógeno diferentes.
- 4- Comparar el uso y costo de dos aguas marinas artificiales en ensayos de laboratorio en *M. mactroides*.
- 5- Evaluar el efecto de la posición anatómica y del sustrato sobre la supervivencia de *M. mactroides* en laboratorio.

Hipótesis de trabajo

- 1- Si el método de marcaje es inocuo no habrá diferencias significativas en la supervivencia de almejas marcadas y sin marcar. Si el método es efectivo no se perderán o borrarán más del 10% de las etiquetas.
- 2- Si alguno de los tratamientos promueve condiciones favorables en la calidad del agua y la alimentación, la supervivencia será mayor.
- 3- Habrá diferencias en la cantidad de sólidos sedimentables (SS), pH y NH_3 entre los tratamientos con y sin biofloc, esperando un aumento en los SS, una disminución del pH y del NH_3 si se desarrolla biofloc.
- 4- Si alguna de las AMAs es más apropiada para el mantenimiento de los animales, entonces la supervivencia será significativamente mayor en ésta.
- 5- La posición de las almejas afectará la supervivencia, esperando que sea significativamente mayor en los tratamientos donde el animal se encuentra en posición de vida.

2. Materiales y métodos

2.1. Muestreo de campo y transporte a laboratorio

La extracción de las almejas se realizó en la franja de playa entre el canal Andreoni y el arroyo Chuy, costa oceánica del departamento de Rocha (Figura 1).

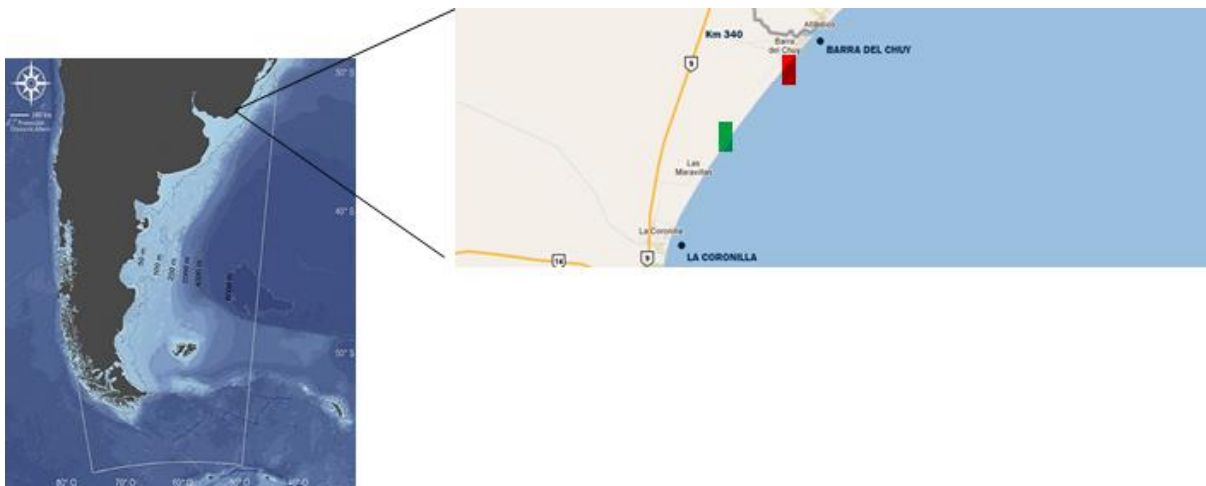


Figura 1. Lugares de extracción de los ejemplares de *M. mactroides* utilizados en las experiencias. En rojo Puimayen, lugar de extracción de las almejas utilizadas en las experiencias de posición y alimentación. En verde Atalaya, de donde se extraen los ejemplares utilizados en las experiencias de marcaje.

El día 12/04/2016 se extrajeron 37 ejemplares de *M. mactroides*, en playa Atalaya 10 Km al W de la barra del arroyo Chuy utilizando el método tradicional, realizando pozos en la arena con una pala para extraer los animales. Se registró la salinidad y temperatura en el lugar con termosalinómetro YSI EC300. El día 25/05/2016 se extrajeron en playa Puimayen, 4 Km al W de la Barra del Chuy, 145 ejemplares de *M. mactroides*. Por último el 13/07/2016 se extrajeron 40 ejemplares de playa Puimayen, 5 Km al W de la Barra del Chuy.

Las almejas extraídas se acondicionaron para su transporte a laboratorio enterradas en recipientes conteniendo arena seca. En todas las experiencias se utilizaron almejas sin roturas. En los experimentos de marcaje se clasificaron los animales en dos tallas, una

menor a 50 mm y otra mayor o igual a 50 mm, correspondiente a la talla comercial (Gianelli 2015). En el resto de las experiencias se utilizaron animales de talla comercial.

2.2.1. Biometría

En laboratorio las almejas fueron sacadas de la arena, enjuagadas en agua salina artificial (salinidad = $21,9 \pm 0,1$) y colocadas 5' sobre papel secante. Se midieron la longitud máxima del eje antero posterior con vernier Stronger y se masan (MHTi) en balanza digital de precisión OHAUS Adventurer.

2.2.2. Acondicionamiento

El acondicionamiento previo a las experiencias se realizó en un recipiente de 100 L, conteniendo AMA Sera marine basic salt, libre de nutrientes (nitratos, fosfatos y silicatos). La salinidad registrada durante la experiencia fue de $21,9 \pm 0,1$ (Carvalho 2015), manteniéndose constante durante el experimento, al igual que el pH= $8,00 \pm 0,15$. La temperatura promedio fue de $12,0 \pm 1,0$ °C. El período de acondicionamiento fue de 6 días, las almejas se colocaron horizontales sin suficiente sustrato para enterrarse y sin alimento (Sauco 2013). El recipiente contó con un sistema de recirculación a través de un filtro externo Resun EF-1200U, provisto de filtros físicos y bioquímicos. Una cabeza de poder Resun SP-1100L suministró la aireación (Figura 2).

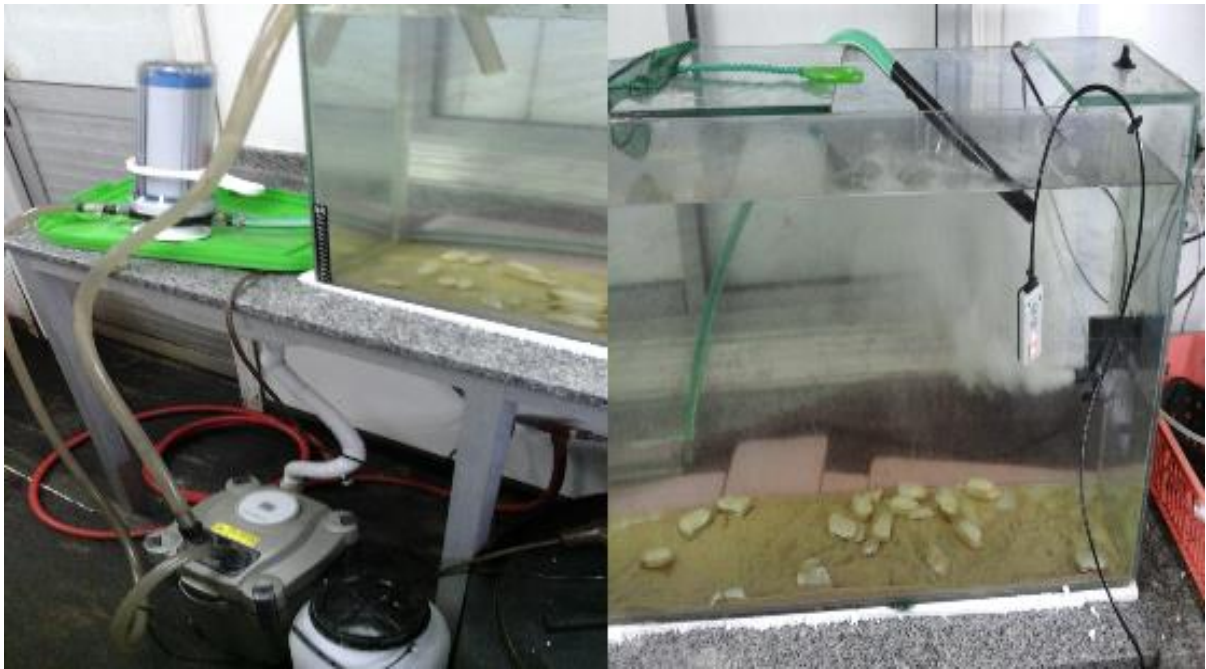


Figura 2. Recipiente de acondicionamiento, se observa la bomba de recirculación, sistema de filtros externos y el sistema de aireación. Las almejas no dispusieron de sustrato suficiente para enterrarse.

2.3. Diseño experimental

2.3.1. Evaluación del método de marcaje

El día 14/04/2016 se recibieron en laboratorio 37 almejas. Fueron medidas y clasificadas en dos tallas; 18 individuos corresponden a la talla 1 menor a 50,00 mm y 19 a la talla 2 mayor o igual a 50,00 mm. Fueron seleccionados 18 individuos de cada talla y 9 elegidos al azar fueron marcados según el método descrito (Figura 3).



Figura 3. Almejas con etiquetas numeradas adheridas.

Se colocaron en el recipiente de acondicionamiento, registrándose la mortalidad durante 6 días. Los análisis de supervivencia se realizaron en el programa estadístico R (R Development Core Team 2008), utilizando el paquete R commander (Fox 2005) y el plugin RcmdrPlugin.survival (Fox 2012). Se obtuvieron las curvas de supervivencia por el método Kaplan-Meir (Molinero 2001) para los tratamientos 1M, 1SM, 2M, 2SM, para las almejas marcadas (M) y sin marcar (SM) sin tener en cuenta la talla y para la talla $1 < 50,00$ mm y talla $2 \geq 50,00$ mm, sin tener en cuenta el marcaje. Las curvas de supervivencia se compararon por el método log-rank (Molinero 2001) para determinar si existieron diferencias significativas entre ellas. Por último se informó la cantidad de marcas que se perdieron o borraron durante el experimento.

2.3.2. Experiencias de alimentación

El día 26/05/2016 se recibieron en laboratorio 145 ejemplares de *M. mactroides*, todos fueron medidos y masados según el método descrito, 118 de ellos de talla mayor a 50,00 mm se destinaron a ensayos en laboratorio. Cien individuos seleccionados al azar fueron marcados y colocados 6 días en el recipiente de acondicionamiento. En las experiencias de alimentación se colocaron 60 almejas en recipientes individuales conteniendo 0,50 L de

AMA Sera y aireación suministrada por una bomba de aire Resun. La salinidad fue de $21,0 \pm 0,5$ y se mantuvo constante durante los 30 días de experimentación. Se distribuyeron en seis tratamientos con 10 réplicas cada uno (Figura 4).



Figura 4. Almejas dispuestas en recipientes individuales con aireación. Cada tratamiento constó de 10 réplicas independientes.

Los tratamientos evaluados fueron:

N: tratamiento negativo, sin alimentación.

AS: almeja alimentada con 0,021 g de Spirulina por día.

ASB: alimentada con 0,021 g de Spirulina por día. Se agrega 0,071g de sacarosa (azúcar blanca) por día.

AR: alimentada con 0,021 g de harina de krill por día.

ARB: alimentada con 0,021 g de harina de krill más 0,071 g de azúcar.

MA-MI: experimentos macrocosmo-microcosmo (Monroy Dosta 2013).

Las almejas se colocaron en recipientes individuales y se alimentaron con 0,021 g diarios de Spirulina (Microcosmo). Se realizó un intercambio de 0,05 L de agua al día de cada réplica con agua de un recipiente que contiene 4,0 L de AMA Sera a la misma salinidad, donde se agrega 0,071 g de azúcar para que se produzca biofloc (Macrocosmo).

Se registró la mortalidad todos los días, se obtuvieron y compararon las curvas de supervivencia (Idem 2.3.1) y la media de los tiempos de supervivencia. Se realizó una regresión de los tiempos de supervivencia por el modelo de Cox (Molinero 2001) para determinar si existieron efectos significativos de los tratamientos sobre el tiempo de supervivencia y los riesgos relativos de los tratamientos de alimentación en comparación con el tratamiento negativo.

2.3.3. Experiencias de producción de biofloc

La relación C:N elegida fue de 15:1 (Ebeling 2006, Bakar 2015) y no se utilizó un inóculo para promover la producción de biofloc. Los ensayos de producción de biofloc se realizaron en recipientes individuales conteniendo 0,5 L de AMA Sera a una salinidad constante de $21,0 \pm 0,5$ y fuerte aireación, se realizaron 10 réplicas por tratamiento y la duración del ensayo fue de 30 días. Los tratamientos fueron los mismos que en las experiencias de dietas alternativas (N, AS, ASB, AR, ARB y MA-MI), más dos tratamientos de biofloc sin almeja, SB, RB y sus respectivos negativos S y R.

S: tratamiento sin almeja, se agrega 0,021 g de Spirulina por día

SB: sin almeja, se agrega 0,021 g Spirulina y 0,071 g de sacarosa por día

R: sin almeja, se suministra 0,021 g de harina de kril

RB: sin almeja, 0,021 g de harina y 0,071 g de azúcar

Las variables de respuesta utilizadas en el análisis sobre producción de biofloc fueron: Sólidos sedimentables (SS): es la variable de respuesta y monitoreo por excelencia utilizada en acuicultura de biofloc. Los SS fueron medidos a los 15'-20' de reposo de las aguas de cría en conos Imhoff de 1,0 L de capacidad (Avnimelech 2009). La medida se expresó en mL/L con una estimación variable según el volumen de SS medido.

NH₃: utilizado como indicador de la calidad de las aguas de cría ya que es tóxico. Aunque los moluscos bivalvos son tolerantes a concentraciones que serían tóxicas y mortales para otros organismos, no se encontraron referencias a ensayos en *M. mactroides*. El amoníaco es medido con una sonda de monitoreo continuo Seneye, que demora aproximadamente 1 hora en tomar una medida estable. Se toman varias medidas por día de varios tratamientos. Pasados 7 días se promedian los valores obtenidos para cada tratamiento.

pH: utilizado como indicador de actividad microbiana y de calidad de agua, fue medido con pHmetro pH tester con una precisión de 0,01.

Las condiciones iniciales fueron las mismas para todos los tratamientos, SS= 0,0 mL/L y NH₃= 0,013 mg/L, pH= 8,15 ± 0,05.

Se realizaron 4 muestreos durante la experiencia uno por semana. En los tratamientos con almejas se registran los datos el día de la muerte y se ingresan las medidas en el muestreo inmediato posterior. Con los datos obtenidos se construyen los gráficos de pH=f(t), SS= f(t) y NH₃= f(t) para todos los tratamientos. Se realizó un análisis de la media de los tiempos de supervivencia, utilizando un ANOVA de una vía.

2.3.4. Evaluación de AMAs

En este ensayo se compararon los costos y la supervivencia de *M. mactroides* en dos aguas marinas artificiales, el agua marina Sera marine basic salt de composición desconocida y un AMA preparada según una fórmula provista por FAO (FAO 2010).

Tabla 2. Composición y costo por litro de las aguas artificiales comparadas en la experiencia. Los costos son calculados a partir de los precios de mercado, para obtener 1,0 L de agua de salinidad $\cong 22,0$. No se consiguió la composición de las sales SERA.

Agua marina artificial (AMW)	Composición	g/L	Costo (\$UR/L)
SERA	Desconocida	22	5,87
FAO	Cloruro de Sodio	17,25	
	Sulfato de Magnesio	4,24	
	Cloruro de Magnesio	3,36	5,2
	Cloruro de Calcio	0,88	
	Cloruro de Potasio	0,42	

Para ello se colocaron 10 almejas en recipientes individuales conteniendo 0,5 L de AMA Sera a $21,0 \pm 0,5$ y aireación (tratamiento N) y 10 almejas en recipientes conteniendo 0,5 L de AMA FAO a $21,0 \pm 0,5$ y aireación (tratamiento NF). Se registró la mortalidad durante los 30 días de experimentación, se obtuvieron y compararon las curvas de supervivencia. Se obtuvo la media de los tiempos de supervivencia para ambas aguas artificiales y se compararon utilizando un ANOVA de una vía.

2.3.5. Experimentos de posición anatómica

El día 15/07/2016 se recibieron 40 almejas en laboratorio. Fueron medidas y se seleccionaron 30 individuos sanos de talla mayor o igual a 50,00 mm. Estos se distribuyeron en 3 tratamientos con 10 réplicas cada uno y se colocaron en el recipiente de acondicionamiento. En el tratamiento H las almejas fueron colocadas en una bandeja sin sustrato, el tratamiento V contuvo almejas verticales con los sifones hacia arriba en recipientes individuales, en el tratamiento VS las almejas fueron colocadas enterradas en recipientes individuales conteniendo arena como sustrato (Figura 5).



Figura 5. Almejas colocadas en el recipiente de acondicionamiento en posición vertical sin sedimento (tratamiento V), vertical con sedimento (VS) y horizontal sin sedimento (H).

Se registró la mortalidad durante los 30 días de experimentación, se construyeron y compararon las curvas de supervivencia.

3. Resultados

3.1. Método de marcaje

La salinidad y temperatura registradas en el lugar de extracción fueron de $30.8 \pm 0,1$ y $20,4 \pm 0,1$ °C en la orilla. Luego de medidas y marcadas se colocan a una salinidad de $21,9 \pm 0,1$ y una temperatura de $12,0 \pm 1,0$ °C. El tiempo de marcaje (con las etiquetas hechas previamente) es de aproximadamente 1 minuto por individuo. En la Tabla 3 se muestran los datos obtenidos durante los 6 días del experimento de marcaje. No se perdieron marcas y todas fueron legibles al término del experimento.

Tabla 3: Efecto del método de marcaje sobre la supervivencia en *M. mactroides*. 1M: talla 1 < 50 mm con marca. 1SM: talla 1 sin marca. 2M: talla 2 ≥ 50 mm con marca. 2SM: talla 2 sin marca. Supervivencia: 1- muerta, 0- viva. Tiempo: día de experimentación en que ocurre la muerte.

Tratamiento	Supervivencia	Tiempo	Tratamiento	Supervivencia	Tiempo
1M	1	1	2M	1	1
1M	1	2	2M	1	5
1M	1	3	2M	1	6
1M	1	3	2M	0	6
1M	1	3	2M	0	6
1M	1	4	2M	0	6
1M	0	6	2M	0	6
1M	0	6	2M	0	6
1M	0	6	2M	0	6
1SM	1	1	2SM	1	1
1SM	1	2	2SM	1	6
1SM	1	3	2SM	0	6
1SM	1	3	2SM	0	6
1SM	1	4	2SM	0	6
1SM	0	6	2SM	0	6
1SM	0	6	2SM	0	6
1SM	0	6	2SM	0	6
1SM	0	6	2SM	0	6

Con estos datos se obtuvieron las funciones de supervivencia por el método Kaplan-Meier para los tratamientos M y SM para ambas tallas, para M y SM sin tener en cuenta las tallas y para las dos tallas sin tener en cuenta el marcaje.

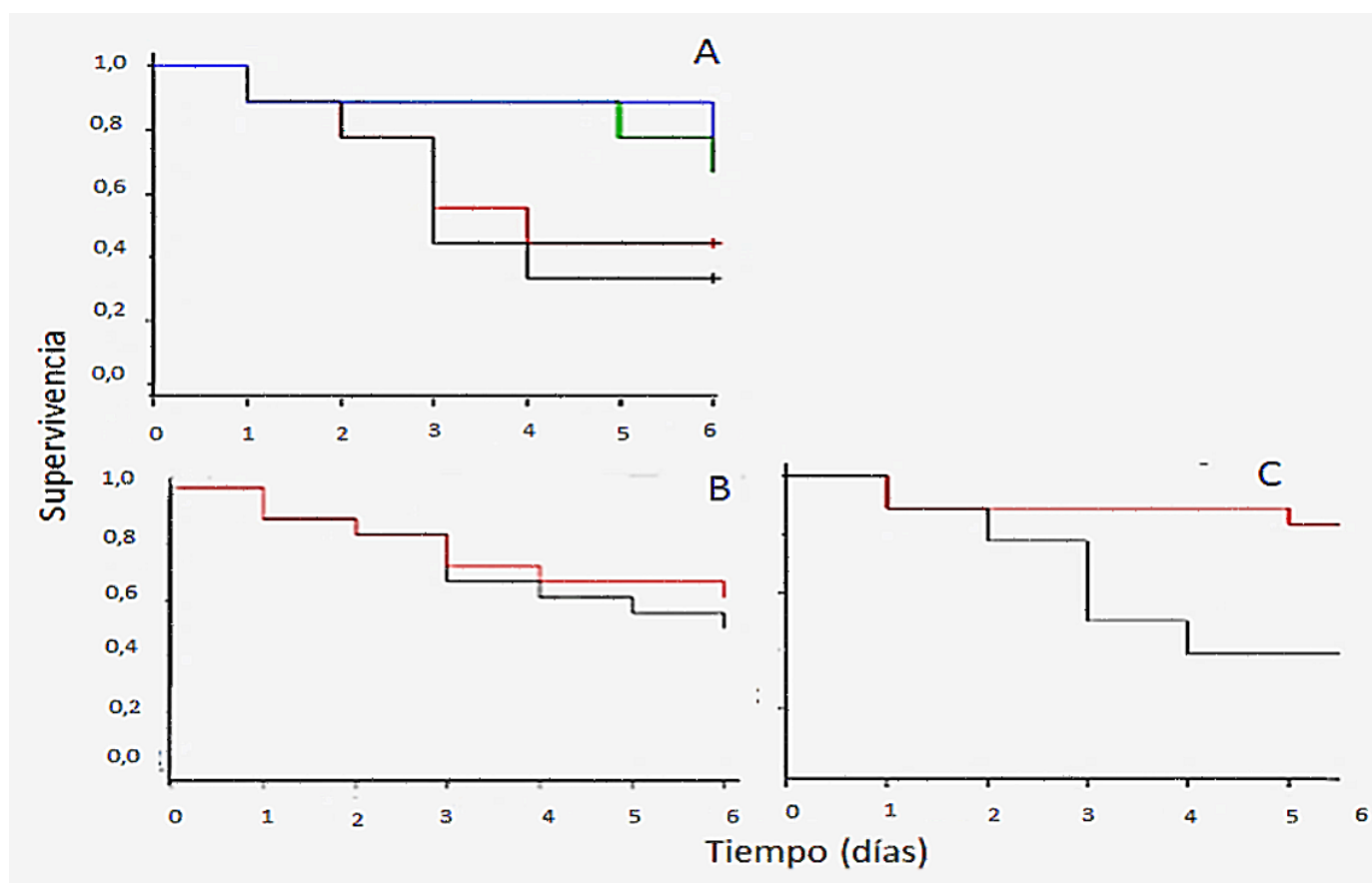


Figura 6. Funciones de supervivencia para los experimentos de marcaje.

A: Tratamientos 1M (---), 1SM (---), 2M (---), 2SM (---); B: Almejas marcadas M (---) y sin marcar SM (---). C: Talla 1 (---) y talla 2 (---).

La comparación de las curvas supervivencia por el método Log-rank (Figura 6) no muestra diferencias significativas entre las funciones ($p > 0,05$) para los tratamientos 1M, 1SM, 2M y 2SM. Tampoco existen diferencias significativas en las funciones de supervivencia de almejas marcadas y sin marcar. La comparación de las curvas de supervivencia muestra diferencias significativas para el análisis de las tallas ($p < 0,05$), siendo mayor la probabilidad de supervivencia para la talla $2 \geq 50\text{mm}$ luego del segundo día de experimentación.

Tabla 4. Comparación de las funciones de supervivencia por el método Log-rank. N: tamaño de la muestra. Muertes: cantidad de individuos muertos durante los 6 días de experimentación. *p*: valor de probabilidad de que las curvas de supervivencia comparadas sean diferentes, con un nivel de confianza del 95%, en negrita se presenta el valor significativo.

Factor	N	Muertes	chi²	<i>p</i>
Talla/Tratamiento				
1M	9	6	5	0,174
1SM	9	5		
2M	9	3		
2SM	9	2		
Tratamiento				
M	18	9	0,4	0,548
SM	18	7		
Talla				
1	18	11	4,5	0,0332
2	18	5		

Para las experiencias de alimentación se marcaron 100 almejas. Al final del período de acondicionamiento (6 días) se perdieron 6 marcas (6%), posteriormente no se perdió ninguna marca y fueron todas legibles al finalizar la experiencia.

3.2. Dietas alternativas y biofloc

El día 26/05/2016 se reciben en laboratorio 145 ejemplares de *M. mactroides*, extraídos el día anterior, la salinidad registrada fue de $12,6 \pm 0,1$, la temperatura fue de $15,0 \pm 0,1$ °C.

Luego de ser medidos, marcados y acondicionados se distribuyen aleatoriamente en los diferentes tratamientos. Con los datos obtenidos en los ensayos de alimentación se construyen las curvas de supervivencia para los distintos tratamientos.

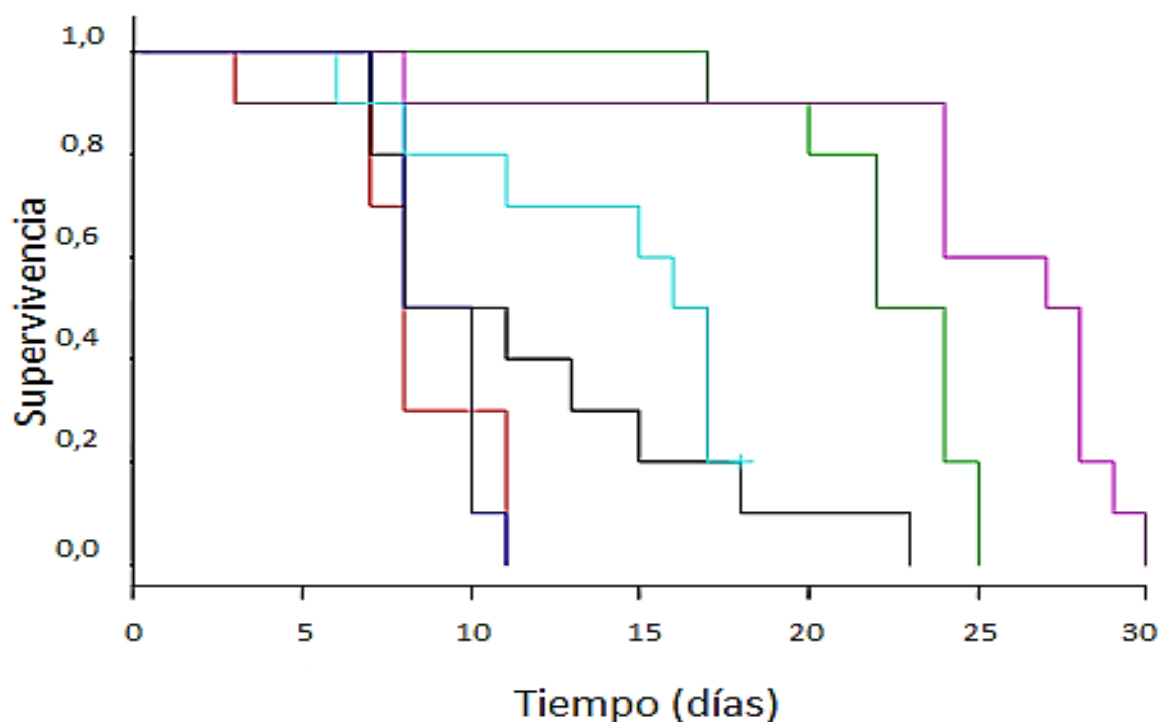


Figura 7. Curvas de supervivencia para los tratamientos AR(---) ,ARB(---), AS(---), ASB(---), MA-MI(---) y N(---).

La comparación de las funciones de supervivencia por el método Log-rank muestra que existen diferencias significativas entre ellas ($p < 0,05$) (Figura 7). Para saber entre cuales curvas hay diferencias significativas, se comparan de a dos por el método Log-rank. Los resultados se presentan en la Tabla 5. El ajuste de los datos al modelo de regresión de Cox por el método Efron se muestra ordenado desde un riesgo relativo de muerte menor a mayor, en comparación con el tratamiento negativo (tratamiento N) (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de p para la comparación pareada de las funciones de supervivencia. Los valores en negrita corresponden a diferencias significativas de las funciones de supervivencia comparadas.

Tratamiento	N	AS	MA-MI	AR	ASB
N	---				
AS	0,00587	---			
MA-MI	0,00347	0,00129	---		
AR	4,06E-05	0,000188	0,229	---	
ASB	7,94E-05	5,91E-6	0,00205	0,131	---
ARB	7,08E-05	8,7E-6	0,00231	0,079	0,96

Todos los tratamientos influyen significativamente sobre la probabilidad de supervivencia dentro de sus respectivos intervalos de confianza (Tabla 6). El modelo ajusta para cualquiera de los criterios de bondad: test de razón de verosimilitud ($p=3.798e-12$), test de Wald ($p=7.469e-08$) y test Score ($p=4.59e-11$), con una concordancia= $0,81 \pm 0,05$, $R^2=0,647$. No hay evidencia significativa de que se viole la hipótesis de riesgos proporcionales.

Tabla 6. Resultados de modelo de Cox para los tratamientos de alimentación. RR: riesgo relativo de cada tratamiento, tomando N como referencia, p : valor de probabilidad de que los tratamientos afecten la probabilidad de supervivencia, en un intervalo de confianza del 95%

Tratamiento	RR	95%IC	p
N	---	---	---
AS	4,6	1,4-15,2	0,0121
MA-MI	22,4	4,9-103,2	6,5E-05
AR	35,1	8,4-146,6	1.00E-06
ASB	109,5	21,9-547,5	1.10E-08
ARB	121,0	24,6-594,4	3.60E-09

La Figura 8 muestra los tiempos medios de supervivencia para los tratamientos de alimentación.

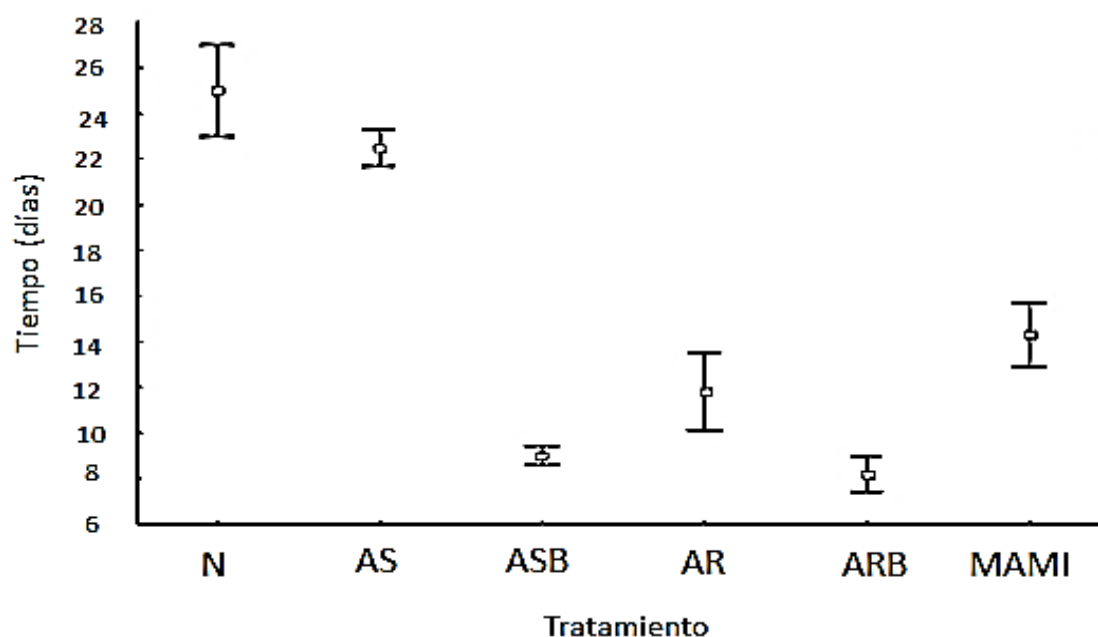


Figura 8. Tiempo de supervivencia medio con su desvío estándar para los tratamientos de alimentación.

La agrupación de los tratamientos por la comparación de sus tiempos de supervivencia en un intervalo de confianza del 95% muestra que no hay diferencias significativas entre los tratamientos N y AS, pero sí entre estos y el resto (Figura 8). El tratamiento MA-MI es significativamente diferente a todos, siendo mayor la media de supervivencia en este tratamiento que en AR, ASB y ARB.

La Tabla 7 muestra la media de los tiempos de supervivencia para cada tratamiento, ordenados de mayor a menor.

Tabla 7. Media $\pm$ desvío estándar para un intervalo de confianza del 95%, de los tiempos de supervivencia para los tratamientos de alimentación. Entre paréntesis se muestran los resultados de la agrupación de tratamientos por su similitud en la media de los tiempos de supervivencia, obtenidos mediante ANOVA.

Tratamiento	Media $\pm$ SD
N	25,0 $\pm$ 6,4(a)
AS	22,5 $\pm$ 2,5(a)
MA-MI	14,3 $\pm$ 4,4(b)
AR	11,8 $\pm$ 5,4(ab)
ASB	9,0 $\pm$ 1,3(ab)
ARB	8,2 $\pm$ 2,4(c)

3.3. Experiencias de producción de biofloc

Los tratamientos Spirulina-biofloc (ASB y SB) aumentan el volumen de SS con mayor rapidez que los sin biofloc (N, AS y S) (Figura 9). El tratamiento ASB termina la semana 2 por muerte de todos los sujetos. Se observa la misma tendencia, los tratamientos con biofloc (ARB, RB) aumentan la cantidad de SS más rápidamente que los sin biofloc (N, AR y R). El tratamiento ARB termina la semana 2 con la muerte de todos los sujetos.

La media de los SS de los tratamientos sin biofloc (N, AS, AR, S y R) y con biofloc (ASB, ARB, SB, RB) para los 4 muestreos realizados se muestran en la Tabla 8. Todos los tratamientos parten de la misma condición inicial $SS = 0,1 \pm 0,1$

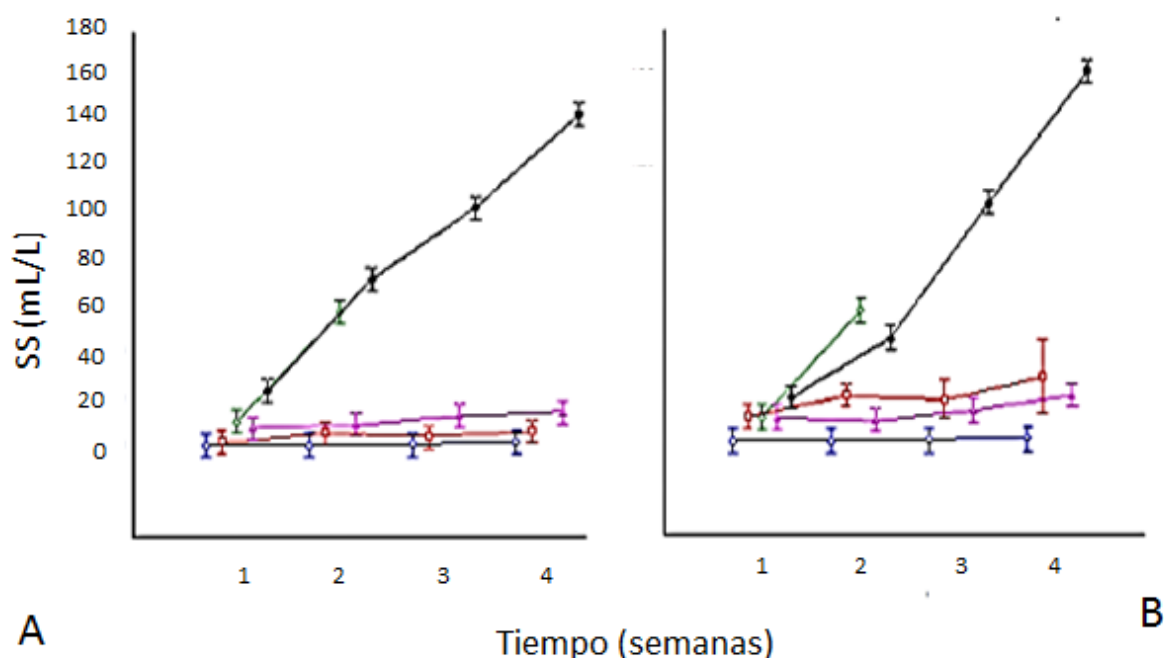


Figura 9. A: Media de sólidos sedimentables (mL/L) con la barra de desvío estándar para los tratamientos negativo y con Spirulina en los 4 muestreos realizados cada 7 días. B: Tratamientos negativo y agregado de harina de kril. N(---), AR(---), R(---), ASB(---), RB(---).

A los 7 días de experimentación (muestreo 1) no existen diferencias significativas entre la media de los SS del tratamiento N y el de AS, pero sí entre estos (cuya media es significativamente menor) y el resto de los tratamientos. No hay diferencias entre los tratamientos AR, S, R, ASB y ARB. Los tratamientos de biofloc sin almeja (SB y RB) tienen una media de SS superior al resto. En el muestreo 2 (14 días) se mantienen agrupados los tratamientos N y AS, siendo su media significativamente menor al resto. El AR aumenta su media que pasa a tener diferencias significativas con los tratamientos S y R.

Tabla 8. Media del volumen en mL/L de los sólidos sedimentables $\pm$ desvío estándar para los tratamientos sin biofloc y sin almeja: negativo (N), spirulina (S) y ración (R), sin biofloc con almeja: almeja+spirulina (AS), almeja+ración (AR), con biofloc sin almeja: spirulina-biofloc (SB) y ración-biofloc (RB) y con biofloc y almeja: almeja+spirulina-biofloc (ASB) y almeja+ración-biofloc. Entre paréntesis se encuentra el resultado de la agrupación por similitud en la media de los SS obtenidos mediante un ANOVA de una vía.

Tratamiento	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4
N	0,1 $\pm$ 0,1(a)	0,1 $\pm$ 0,1(a)	0,3 $\pm$ 0,3(a)	1,2 $\pm$ 0,3(a)
AS	1,01 $\pm$ 0,6(a)	4,7 $\pm$ 1,7(a)	3,5 $\pm$ 2,5(ab)	5,7 $\pm$ 3,6(a)
AR	10,0 $\pm$ 1,7(b)	19,0 $\pm$ 11,0(b)	17,4 $\pm$ 2,2(b)	NA
S	7,2 $\pm$ 3,7(b)	8,6 $\pm$ 3,5(ab)	12,5 $\pm$ 1,7(b)	14,2 $\pm$ 2,6(a)
R	9,9 $\pm$ 1,0(b)	8,6 $\pm$ 3,5(ab)	12,7 $\pm$ 5,0(b)	19,3 $\pm$ 6,3(a)
ASB	9,9 $\pm$ 4,6(b)	56,6 $\pm$ 15,0(d)	NA	NA
ARB	9,9 $\pm$ 2,4(b)	55,4 $\pm$ 11,0(d)	NA	NA
SB	22,9 $\pm$ 4,9(c)	70,9 $\pm$ 6,4(c)	101,6 $\pm$ 14,7(c)	141,5 $\pm$ 22,8(b)
RB	18,5 $\pm$ 3,0(d)	43,5 $\pm$ 7,5(e)	100,7 $\pm$ 13,5(c)	156,4 $\pm$ 21,1(b)

Todos los tratamientos con biofloc pasan a tener una media de los SS significativamente mayor a los tratamientos sin biofloc. A los 21 días se mantienen los tratamientos N y AS significativamente menores que el resto. Se observa una gran diferencia entre los tratamientos con biofloc y sin biofloc, siendo la media de los SS de los tratamientos con biofloc casi 10 veces superior. En el último muestreo se encuentran diferencias significativas en los tratamientos con biofloc y sin biofloc, siendo mayor la media en los tratamientos con biofloc.

En la Figura 10 y Tabla 9 se observa un rápido incremento de la concentración de amoníaco para los tratamientos sin biofloc a partir de los 7 días de experiencia. El control negativo incrementa la concentración a una tasa menor que los tratamientos con alimentación.

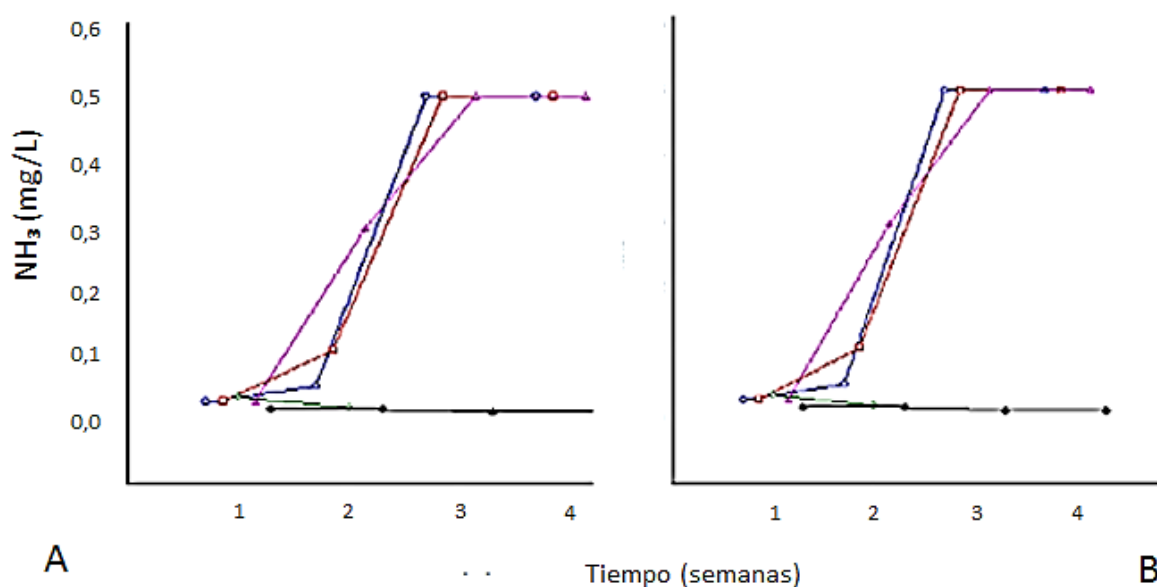


Figura 10. A: Promedio semanal de la $[\text{NH}_3]$ en mg/L obtenidos con la sonda Seneye, para los tratamientos con Spirulina. Los tratamientos con biofloc se separan de resto al segundo muestreo (día 14) manteniéndose la $[\text{NH}_3]$ menor que para el tratamiento negativo y sin biofloc. B: Tratamientos con agregado de harina de krill. N(---), AR(-.-.), R(-.-.-), ARB(-.-.-.-), RB(-----).

Todos los tratamientos sin biofloc alcanzan el límite superior de detección el día 21 de experimentación. Los tratamientos con biofloc con y sin almejas muestran un incremento inicial de la concentración de amoníaco, descendiendo luego y manteniéndose baja durante el resto de la experiencia.

Tabla 9. Promedio semanal de la $[\text{NH}_3]$ en mg/L obtenidos con la sonda Seneye.

Tratamiento	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4
N	0,028	0,052	0,5	0,5
AS	0,028	0,107	0,5	0,5
AR	0,02	0,38	0,5	NA
S	0,03	0,296	0,5	0,5
R	0,03	0,303	0,5	0,5
ASB	0,035	0,02	NA	NA
ARB	0,036	0,015	NA	NA
SB	0,017	0,017	0,013	0,013
RB	0,024	0,015	0,015	0,014

Tabla 10. Comparación de la media de la $[\text{NH}_3]$ mediante ANOVA de una vía para los tratamientos negativo, con biofloc y sin biofloc.

Tratamiento	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4
N	a	a	b	b
Sin biofloc	a	b	b	b
Con biofloc	a	a	a	a

A partir de los 14 días de experimentación el promedio de la concentración de amoníaco de los tratamientos con biofloc es significativamente menor al del control negativo y a los tratamientos sin biofloc (Tabla 10, Figura 10).

Al final de la experiencia los tratamientos con biofloc tienen un pH significativamente menor que los tratamientos sin biofloc (Figura 11 y Tabla 11).

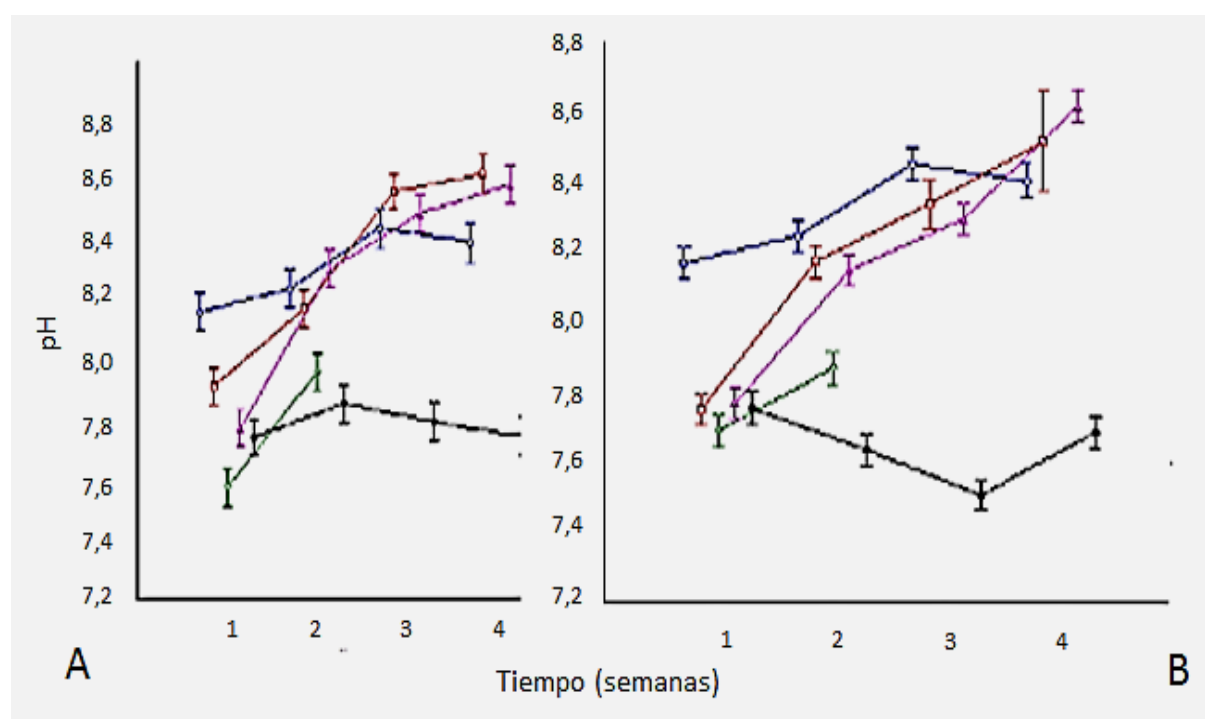


Figura 11. A: pH promedio (± desvío estándar) para los tratamientos con Spirulina. B: Tratamientos con harina de kril. N(---), AR(---), R(---), ARB(---), RB(---).

Tabla 11. Media del pH $\pm$ desvío estándar. Entre paréntesis se encuentra el resultado de la agrupación por similitud en la media del pH obtenidos mediante un ANOVA de un vía.

Tratamiento	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4
N	8,17 $\pm$ 0,02(e)	8,25 $\pm$ 0,01(de)	8,46 $\pm$ 0,02(cd)	8,41 $\pm$ 0,04(b)
AS	7,92 $\pm$ 0,08(d)	8,18 $\pm$ 0,03(d)	8,60 $\pm$ 0,32(d)	8,64 $\pm$ 0,02(c)
AR	7,75 $\pm$ 0,02(c)	8,18 $\pm$ 0,06(d)	8,34 $\pm$ 0,10(cd)	NA
S	7,78 $\pm$ 0,02(c)	8,32 $\pm$ 0,03(e)	8,50 $\pm$ 0,02(d)	8,60 $\pm$ 0,04(c)
R	7,77 $\pm$ 0,01(c)	8,15 $\pm$ 0,04(d)	8,30 $\pm$ 0,02(c)	8,62 $\pm$ 0,07(c)
ASB	7,58 $\pm$ 0,06(a)	7,97 $\pm$ 0,05(c)	NA	NA
ARB	7,69 $\pm$ 0,04(b)	7,87 $\pm$ 0,03(bc)	NA	NA
SB	7,75 $\pm$ 0,04(c)	7,86 $\pm$ 0,15(d)	7,80 $\pm$ 0,06(b)	7,75 $\pm$ 0,18(a)
RB	7,76 $\pm$ 0,02(c)	7,64 $\pm$ 0,10(a)	7,51 $\pm$ 0,04(a)	7,69 $\pm$ 0,22(a)

La Figura 12 presenta las gráficas obtenidas para los recipientes Micro del tratamiento MA-MI, para los sólidos sedimentables, amoníaco y pH. La Tabla 12 presenta los resultados de los muestreos realizados en el recipiente Macro donde se agregó azúcar para la producción de biofloc.

Tabla 12. SS, NH₃ y pH para el recipiente Macro.

Macro	SS (mL/L)	NH ₃ (mg/L)	pH
t=0	5,0	0,014	8,15
Muestreo 1	9,8	0,035	8,26
Muestreo 2	50,0	0,02	8,17

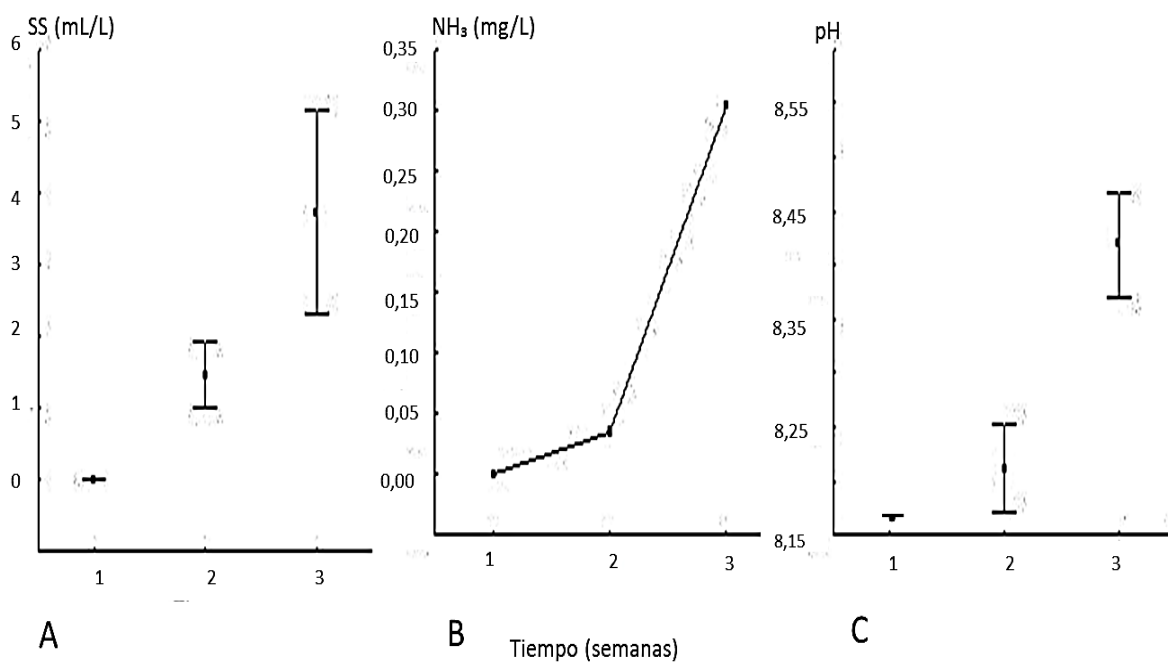


Figura 12. A: Media $\pm$ desvío estándar de los sólidos sedimentables para las réplicas Micro del tratamiento MA-MI. B: Valores promedio de la concentración de amoníaco para los Micro. C: Media $\pm$ desvío estándar del pH de los Micro.

3.4. Evaluación de las AMAs

El análisis ANOVA muestra un efecto significativo del tratamiento sobre el tiempo de supervivencia ($F(1,18)=5,737$, $p=0,0277$), siendo mayor la media del tiempo de supervivencia en el tratamiento con AMA SERA que en AMA FAO (Tabla 13).

Tabla 13. Media $\pm$ desvío estándar, para un intervalo de confianza del 95% de los tiempos de supervivencia para los tratamientos de agua marina artificial.

Tratamiento	Media $\pm$ SD
N AMA SERA	25 $\pm$ 6,4
NF AMA FAO	17 $\pm$ 8,4

La comparación de las curvas de supervivencia (Figura 13) para las AMAs, no muestra diferencias significativas entre ellas ($\chi^2=1,9$ en 1 grado de libertad, $p=0,168$).

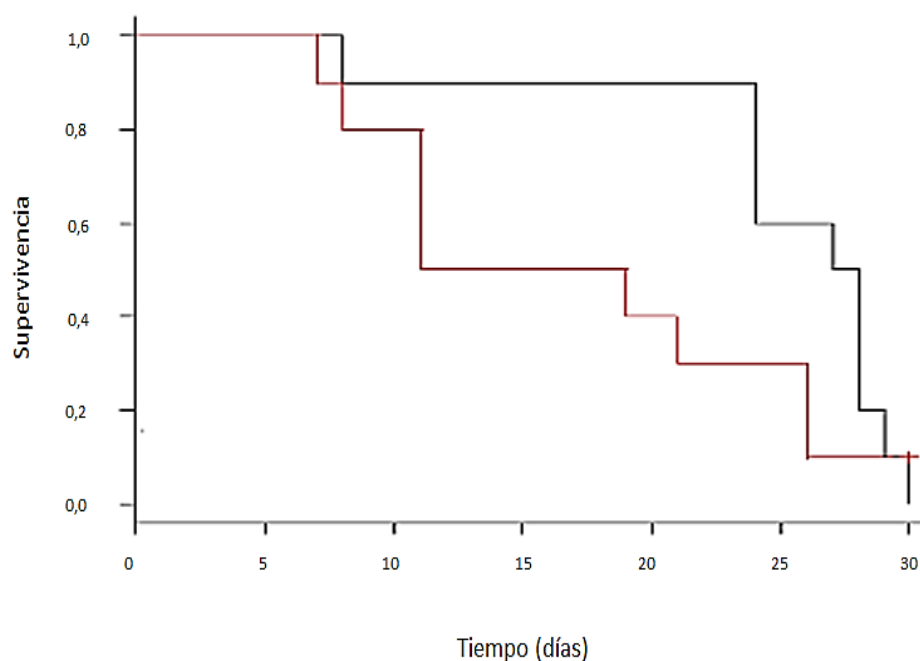


Figura 13. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para los tratamientos N (---), negativo AMA SERA y NF (----), AMA FAO.

3.5. Posición anatómica

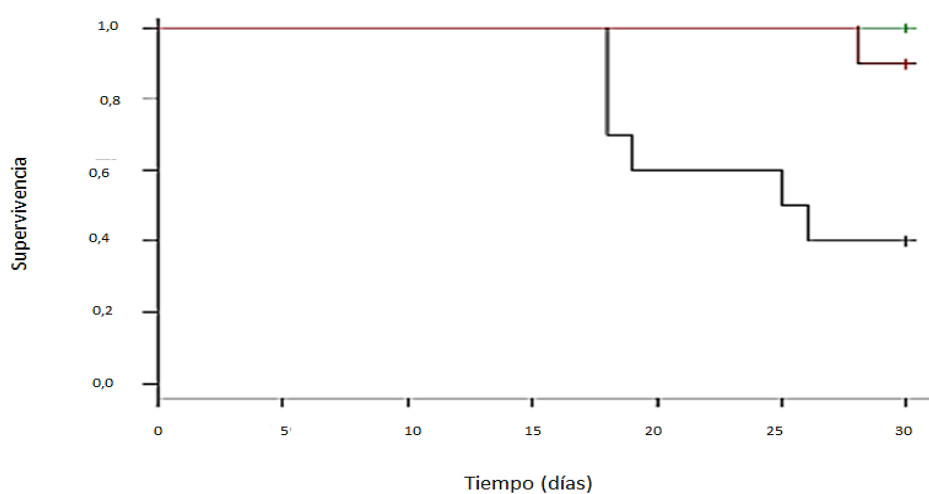


Figura 14. Curvas de Kaplan-Meier para los experimentos de posición anatómica. Tratamiento horizontal H (----), tratamiento vertical con sedimento VS (----), tratamiento vertical sin sedimento V (----). Las curvas divergen el día 18, a partir de ese día probabilidad de supervivencia es menor para las almejas en posición horizontal.

El análisis pareado por el método Log-rank de las curvas de supervivencia (Figura 14) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos verticales V y VS ($\chi^2=1$ en un grado de libertad, $p= 0.317$), pero sí entre los tratamientos verticales y horizontal ($\chi^2=13,5$ en 2 grados de libertad, $p=0,00116$).

4. Discusión

En esta Tesis se exploraron de manera satisfactoria algunas condiciones de sustento artificial para la almeja *M. mactroides*, evaluando diferentes técnicas necesarias para el mantenimiento a largo plazo de la especie en laboratorio.

4.1. Método de marcaje

El método de marcaje seleccionado ha sido ampliamente utilizado en experimentos ecofisiológicos *in situ* en varias especies de moluscos bivalvos (Todolí 2014, Riley 2010), pero no se encontraron referencias específicas sobre su aplicación en *M. mactroides*. En este estudio no se encontró un efecto significativo del método de marcaje utilizado sobre la supervivencia para ninguna de las tallas, permitiendo el seguimiento individual durante toda la experiencia, lo que puede ser necesario en el diseño experimental. El método seleccionado es inocuo y efectivo, además es económico, las etiquetas se hicieron con folios plásticos transparentes, marcador indeleble y se adhieren con pegamento de cianoacrilato.

Durante los experimentos de marcaje se observó un efecto significativo de la talla sobre la probabilidad de supervivencia, siendo mayor para la talla $2 \geq 50$ mm. Esta diferencia en los tiempos de supervivencia puede deberse a distintos factores: diferencias en los estados fisiológicos entre tallas, distinta sensibilidad al método y tiempo de transporte al laboratorio,

diferencias en la capacidad de tolerar el cambio entre las condiciones fisicoquímicas del medio ambiente (salinidad = $30.8 \pm 0,1$, $T^{\circ} = 20,4 \pm 0,1$ °C) y las condiciones de acondicionamiento (salinidad = $21,9 \pm 0,1$, $T^{\circ} = 12,0 \pm 1,0$ °C), una suma de estas posibles causas u otras no consideradas. En definitiva, el método de marcaje probado provee una herramienta de manejo experimental de bajo costo, inocuo y efectivo para tamaños muestrales no muy grandes ($N \leq 200$) y tallas no muy pequeñas (longitud $\geq 2,0$ cm) en *M. mactroides*. Sin embargo el procedimiento es algo demandante en el tiempo de manipulación y adicionalmente, es incierto si las marcas se desprenderían en un medio natural altamente abrasivo como las playas arenosas. Por lo tanto, si la cantidad de sujetos que se necesita marcar es relativamente grande, el tamaño de los individuos es pequeño y/o no es necesario en el diseño experimental la identificación individual, existen otros métodos de marcaje cuya implementación podría ser más adecuada. La tinción química con calceína ya ha sido utilizada y probada en estudios de crecimiento *in situ* en *M. mactroides* (Lepore 2009), siendo una alternativa para los casos anteriores.

4.2. Dietas alternativas y biofloc

La alimentación provoca el aumento de los detritos (al mismo tiempo nutrientes para los microorganismos presentes en el contenedor experimental), disponibles en el medio a través de los aportes de los restos de alimentos, de las heces y excreciones por parte de los animales. La utilización de estos residuos por microorganismos y su respiración conlleva el descenso de la concentración de oxígeno hasta niveles de hipoxia y anoxia, pudiendo provocar la muerte de los animales de cultivo. También el aumento de la concentración de amoníaco en el medio por la acumulación de las excretas puede alcanzar niveles tóxicos para la especie objetivo (Boyd 1998, Wright 2001).

Al alimentar los animales y no realizar recambio de agua durante los experimentos, se espera un aumento de la concentración de amoníaco, indicador del deterioro progresivo de

la calidad del agua y al mismo tiempo una disminución de la probabilidad de supervivencia de los sujetos. Varias especies de moluscos bivalvos muestran una gran tolerancia a la exposición a altas concentraciones de amoníaco, durante tiempos relativamente cortos (Epifanio 1975, Reddy 1979), pero los efectos sobre la supervivencia aumentan con la exposición prolongada a concentraciones no tan altas, como las registradas durante los experimentos (Zischke 1987, Hickey 1999).

Los tiempos de supervivencia más prolongados se logran con el tratamiento control (N), donde no se les suministró alimento a los animales y en el que la concentración de NH_3 aumenta hacia el final de la experiencia. En experiencias anteriores se observó una gran tolerancia a largos períodos de inanición en moluscos bivalvos (84 días), manteniendo una buena calidad de agua (Albentosa 2006).

A partir de la tercer semana de experimentación, el descenso de la condición fisiológica por inanición y el deterioro de calidad del agua, reflejado en el aumento de la concentración de NH_3 , acompañan al descenso abrupto de la supervivencia. Asumiendo que la única fuente de nitrógeno son las excretas de las almejas, el aumento de $[\text{NH}_3]$ a partir de las dos semanas es un indicio de la utilización de las reservas metabólicas para la nutrición (Ansell 1973, Albentosa 2006). A la vez que aumenta la concentración de una sustancia potencialmente tóxica (NH_3), estando los sujetos expuestos durante tiempos prolongados. No se han encontrado estudios sobre los efectos de la exposición corta o prolongada a concentraciones medias y altas de amoníaco en *M. mactroides*, por lo que el presente trabajo reporta las primeras observaciones al respecto.

Los tratamientos de alimentación con Spirulina y harina de krill muestran un rápido aumento de la concentración de NH_3 . Sin embargo existen diferencias entre la probabilidad de supervivencia y los sólidos sedimentables entre ambos tratamientos. Mientras la Spirulina

parece ser consumida por *M. mactroides*, la harina de krill no, ya que no muestra diferencias en el volumen de sólidos sedimentables en los tratamientos de harina de krill con y sin almeja. El tamaño de partícula podría ser la causa de esta diferencia en el consumo entre ambas raciones. El rango de tamaño de partícula consumido por los bivalvos varía entre 1 μm a 100 μm (Mamat 2010), mientras la harina de krill utilizada tiene un tamaño de 100 μm a 150 μm (KrillCanadaProductList 2015), la Spirulina tiene un tamaño de célula de entre 6 μm y 16 μm (Ali 2010). No se han encontrado referencias anteriores sobre el rango de tamaño de partícula consumido por *M. mactroides*.

Aunque en ambos tratamientos la calidad del agua se deterioró rápidamente, las almejas alimentadas con Spirulina tienen una probabilidad de supervivencia mayor, probablemente por estar consumiendo el alimento suministrado y a la calidad del mismo. Existen experiencias previas de utilización de Spirulina en la alimentación de moluscos bivalvos en etapas de hatchery o con fines experimentales (Benemann 1992, Berthet 1992, Coutteau 1992, 1993, Bonner 1994, Arney 2015), con resultados variables según la especie objetivo y la etapa de desarrollo. No se ha encontrado bibliografía previa sobre la utilización de Spirulina, otras dietas alternativas o algas vivas en la alimentación de *M. mactroides*, con fines experimentales o de cultivo. Tampoco se han encontrado referencias sobre los requerimientos nutricionales para esta especie.

No se obtuvieron buenos resultados respecto a la supervivencia al colocar las almejas en los mismos recipientes donde se produce biofloc. La probabilidad de supervivencia es la más baja y el riesgo relativo es superior al resto de los tratamientos. Aunque se logra mantener baja la concentración de NH_3 , el rápido aumento de los sólidos sedimentables podría explicar la baja probabilidad de supervivencia en los tratamientos con biofloc y almejas. La producción de biofloc implica la resuspensión continua de las partículas en la columna de agua, por lo cual es un punto clave el control de los sólidos en suspensión para el éxito del cultivo de algunas de las especies objetivo (Ray 2010, Schweitzer 2013). En los

moluscos bivalvos es conocido el efecto negativo de la turbidez sobre el fitness, la respiración, la abundancia y la supervivencia (Steele-Petrovic 1975, Murphy 1985, Ellis 2001, Newell 2004).

Los experimentos Macrocosmo-Microcosmo buscaron acoplar la producción de biofloc (Macrocosmo) al tratamiento de aguas de cría y alimentación en *M. mactroides* (Microcosmo), en un sistema cerrado (cero recambio de agua), con recirculación entre Macro y Micro (Azim 2008, Monroy-Dosta 2013, Ekasari 2014). Con este manejo se busca alimentar las almejas con spirulina y biofloc proveniente del Macro y a la vez mantener la $[NH_3]$ baja por dilución. Se consigue aumentar significativamente la supervivencia con respecto a los tratamientos donde el biofloc se produce en el mismo recipiente donde se encuentran las almejas. Este manejo resultó adecuado para gestionar la cantidad de sólidos sedimentables, pero insuficiente para manejar la $[NH_3]$. El aumento de la supervivencia obtenido con el tratamiento Macrocosmo-Microcosmo nos inducen a proponer un método de este tipo en futuras investigaciones sobre manejo experimental en *M. mactroides* y otros bivalvos filtradores.

4.3. Producción de biofloc

Con la aplicación de este manejo 15C:1N y sin utilizar un inóculo inicial, se consigue rápidamente la producción de biofloc a partir de los dos alimentos utilizados (Spirulina y harina de krill). El aumento del volumen de sólidos sedimentables y el descenso de pH es consistente con estudios anteriores (Azim 2008, Nootong 2011, Ray 2011, da Silva 2013, Bakar 2015). La concentración de NH_3 es menor que en otros resultados experimentales. El amoníaco fue medido con una sonda Seneye de monitoreo continuo, el período de 1 hora por medida impidió la obtención de la concentración de NH_3 para todas las réplicas el mismo día, por lo que se utilizó el promedio semanal de las medidas por tratamiento. Este dato

debe ser analizado cualitativamente y en ese aspecto los tratamientos con biofloc muestran un comportamiento análogo a experiencias anteriores, logrando una excelente gestión de los residuos nitrogenados (Megahed 2010, Emerenciano 2013, Hargreaves 2013, Collazos-Lasso 2015).

Aunque hay indicios del consumo de biofloc por las almejas, este estudio no abarca aspectos nutricionales como la composición, calidad y tamaño de partícula apropiado para ser ingerido por *M. mactroides*. Tampoco abarcó aspectos microbiológicos, no se analizó la composición y desarrollo temporal de la microflora, ni se buscó y cuantificó la presencia de potenciales patógenos.

Para la futura utilización de un sistema Macrocosmo-Microcosmo en el manejo de *M. mactroides* será necesario implementar estudios previos sobre producción y manejo de sistemas de biofloc, como la utilización de un inóculo inicial para favorecer su producción e influir sobre la composición de este (Crab 2012). El acoplamiento de la vía autótrofa no ha sido tomada en cuenta, siendo la producción primaria fotosintetizadora una parte sustancial e importante en los sistemas de biofloc (Ebeling 2006). En esta experiencia se inhibe esta vía al desarrollarse en un lugar cerrado y por la utilización de una relación C:N alta. En futuras investigaciones se tendrá que considerar la vía autótrofa en la producción y composición de biofloc, buscando su manejo (a través de la inoculación, relación C:N elegida y fotoperíodo) y acoplamiento a la vía heterótrofa.

Otras formas de manejo de la cantidad y composición de biofloc que no se abordaron en este trabajo son la utilización de distintas fuentes de carbono o la incorporación de otras especies en el manejo acoplando niveles tróficos a la experiencia (Newell 2004, Troell 2009, Reid 2010). Regular el tamaño de partícula de biofloc suministrado a las almejas a través de filtros, podría ser una forma de manejo del tamaño, composición y valor nutritivo del biofloc suministrado como alimento (Ekasari 2014).

4.4. Evaluación de las AMAs

Para evitar los efectos de la eutrofización de las aguas de cultivo, manteniendo una adecuada calidad de agua, se utilizan varios métodos de manejo. El recambio de agua entre el medio de cultivo y el ambiente es el método más utilizado tanto en las etapas de cultivo en laboratorio (hatchery) y depuración de moluscos bivalvos (FAO 2006).

La utilización de un agua artificial elaborada a partir de una fórmula proporcionada por la FAO, de menor costo y con las sales componentes a disposición en el mercado, no es recomendable en manejos que requieran tiempos mayores a 7 días, debido a la disminución de la probabilidad de supervivencia. Sin embargo podría ser una alternativa para manejos a corto plazo como un proceso de depuración de 48 horas. El agua artificial FAO es ampliamente utilizada para el almacenamiento de langostas y en la depuración de la ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) y la almeja *Mercenaria mercenaria*. Pero puede no ser adecuado su uso en ciertas especies, por lo cual debe probarse su uso específicamente.

Podemos suponer que la composición del agua elaborada a partir de la mezcla de sales SERA se adecúa mejor a los requerimientos fisiológicos en *M. mactroides*. Existe poca información sobre los requerimientos específicos de *M. mactroides*, serían recomendables estudios fisiológicos y testear AMAs con otras formulaciones disponibles.

4.5. Posición anatómica

El acondicionamiento de reproductores, en algunas especies de moluscos bivalvos infaunales, se realiza en bandejas que contienen un sustrato para permitir que se entierren adoptando su posición de vida. Esto facilita la filtración, alimentación y respiración, teniendo importantes consecuencias fisiológicas (FAO 2006) (Figura 15).



Figura 15. Diagrama de recipiente de acondicionamiento para bivalvos infaunales (Tomado de FAO 2006).

Por ejemplo *Panopea generosa* es acondicionada para su transporte viva sujetando las valvas con una banda elástica. La presión ejercida reduce el esfuerzo realizado por los músculos aductores para mantener las valvas cerradas, permitiendo conservar las almejas en mejores condiciones por mayor tiempo. Los efectos fisiológicos de permitir a los animales adoptar la posición de vida parecen ser más determinantes para la supervivencia en *M. mactroides*, que la presencia de un sustrato que ejerza presión sobre las valvas.

En futuros manejos experimentales será fundamental permitir o colocar los animales en la posición de vida, una solución para ello será suministrar un sustrato. El uso de arena u otro sustrato particulado acarrea consecuencias a tener en cuenta en los sistemas de recirculación de agua, la higiene y depuración de estos animales, la utilización de sustratos artificiales (algún tipo de espuma sintética inerte e inocua) podría ofrecer una solución a estos problemas.

5. Conclusiones y perspectivas

Este trabajo aplica varias herramientas de manejo experimental y cría en *M. mactroides*, algunas utilizadas con anterioridad en otras especies de moluscos bivalvos y otras (el biofloc) de las que no se ha encontrado registro de su utilización en bivalvos.

El uso de etiquetas plásticas numeradas, pegadas con cianoacrilato, mostró ser un método de marcaje inocuo, efectivo y económico, siendo viable su utilización como herramienta experimental en esta especie.

La utilización de la Spirulina ofrece buenas perspectivas como alimento o como parte de una dieta alternativa, faltando aún estudios fisiológicos que brinden información sobre aspectos nutricionales de *M. mactroides*.

La calidad del agua es fundamental para la supervivencia en esta especie como en otras de moluscos bivalvos. La gestión de los residuos nitrogenados y los sólidos en suspensión es por lo tanto un requisito indispensable para su mantenimiento en buenas condiciones.

Dicha gestión se puede lograr a través del recambio de agua, para lo que se debe asegurar un suministro constante de agua de calidad. Este suministro de agua del medio ambiente es uno de los problemas que enfrenta en la actualidad el proceso de depuración que se realiza antes de la comercialización, debido aumento de las floraciones potencialmente nocivas y la falta de cualificación de las zonas de toma de agua.

Este trabajo evalúa dos opciones, la utilización de un agua artificial de menor costo (AMA FAO) y la tecnología de biofloc aplicada al tratamiento y reciclaje de agua.

La utilización de un AMA de menor costo podría ser una alternativa en un proceso de depuración corto, como el que se realiza en la actualidad, aunque no sería recomendable su utilización en procesos o manejos que requieran tiempos más prolongados debido a la disminución de la supervivencia.

Otra consecuencia de aplicación inmediata para el manejo de esta especie *in vitro* es el efecto de la posición sobre la supervivencia. Cualquier manejo a mediano y largo plazo deberá permitir a los animales adoptar la posición de vida.

Como perspectiva a largo plazo queda la utilización de la tecnología de biofloc en un manejo de tipo Macrocosmo-Microcosmo, como herramienta de gestión de agua y fuente de alimento aplicada a la cría de *M. mactroides* u otros moluscos bivalvos.

6. Bibliografía

Albentosa M., Fernández-Reiriz M., Labarta U. & Pérez-Camacho A. (2006). Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: Physiological and biochemical parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 146, pp. 241–249.

Ali S. & Saleh M. (2012). *Spirulina—An Overview*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 4, No 3, pp. 9-15.

Ansell A. (1973). Some effects of temperature and starvation on the bivalve *Donax vittatus* (da Costa) in experimental laboratory populations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Issue 3, Vol. 13, pp. 229-262.

Arney B., Liu W., Forster I., McKinley R. & Pearce C. (2015). Feasibility of dietary substitution of live microalgae with spray-dried *Schizochytrium* sp. or *Spirulina* in the hatchery culture of juveniles of the Pacific geoduck clam (*Panopea generosa*). *Aquaculture*, Vol. 444, pp. 117-133.

Avnimelech Y. (2009). *Biofloc Technology: A Practical Guide Book*. World Aquaculture Society.

Azim M. & Little D. (2008). The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 283: 29–35.

Bakar N., Nasir N., Lananan F., Hamid S., Lam S. & Jusoh A. (2015). Optimization of C/N ratios for nutrient removal in aquaculture system culturing African catfish, (*Clarias gariepinus*) utilizing Bioflocs Technology. *International Biodeterioration & Biodegradation* 102: 100-106.

Beaz-Hidalgo R., Balboa S., Romalde J. & Figueras M. (2010). Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental Microbiology Reports*. Vol. 2(1), 34–43.

Benemann J. (1992). Microalgae aquaculture feeds. *Journal of Applied Phycology*. Issue 3, Vol. 4, pp 233–245.

Berthet B., Amiard J., Amiard-Triquet C., Martoja M. & Jeantet A. (1992). Bioaccumulation, toxicity and physico-chemical speciation of silver in bivalve molluscs: ecotoxicological and health consequences. *The Science of the Total Environment*, No. 125, pp. 97-122.

Bonner T. & Rockhill R. (1994). Ultrastructure of the Byssus of the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*, Mollusca: Bivalvia). *American Microscopical Society*. No. 113, Issue 3, pp. 302-315.

Boyd C. & Tucker C. (1998). Pond aquaculture water quality management. Springer Science+ Business Media, LLC.

Brown J. & Hartwick B. (1988). Influences of Temperature, Salinity and Available Food Upon Suspended Culture of the Pacific Oyster, *Crasostrea gigas* II. Condition Index and Survival. *Aquaculture*, 70, 253-267.

Caers M., Coutteau P. & Sorgeloos P. (1999). Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. *Aquaculture* 170, 307–322.

Carnevia D. (2007). Análisis de las oportunidades de cultivo de especies acuáticas en Uruguay. DINARA.

Carnevia D., Proverbio C. & Limongi P. (2014). Cría intensiva de *Mugil platanus* (Osteichthyes, Mugilidae) en sistemas de biofloc y filtro biológico: comparación de crecimiento. Tercer Congreso Uruguayo de Zoología.

Carvalho Y., Romano L. & Poersch L. (2015). Effect of low salinity on the yellow clam *Mesodesma mactroides*. *Brazilian Journal of Biology*. Vol. 75, No. 1, 8-12.

Coen L., Brumbaugh R., Bushek D., Grizzle R., Luckenbach M., Posey M., Powers S. & Tolley G. (2007). Ecosystem services related to oyster restoration. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES*. Vol. 341: 303 – 307.

Collazos-Lasso L. & Arias-Castellanos J. (2015). Fundamentos de la tecnología biofloc (BFT). Una alternativa para la piscicultura en Colombia. Una revisión. *ORINOQUIA* - Universidad de los Llanos - Villavicencio, Meta. Colombia Vol. 19 - No 1.

Cole M., Lindeque P., Halsband C. & Galloway T. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*. Issue 12, Vol 62, pp. 2588–2597.

Coutteau P. & Sorgeloos P. (1992). The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *Journal of Shellfish Research*. Vol. 11, No. 2, 467-476.

Coutteau P., Dravers M., Dravers P., Léger P. & Sorgeloos P. (1993). Manipulated yeasts diets and dried algae as a partial substitute for live algae in the juvenile rearing of the Manila clam *Tapes philippinarum* and the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Production, environment and quality. *European Aquaculture Society, Special Publication No. 18*.

Coutteau P., Hadley N., Manzi J. & Sorgeloos P. (1994). Effect of algal ration and substitution of algae by manipulated yeast diets on the growth of juvenile *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture*, 120, 135-150.

Coutteau P., Curé K. & Sorgeloos P. (1994). Effect of algal ration on feeding and growth of juvenile Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve). Journal of Shellfish Research. Vol. 13, No. 1, 47-55.

Crab R., Lambert A., Defoirdt T., Bossier P. & Verstraete W. (2010). The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. Journal of Applied Microbiology 109, pp. 1643–1649.

Crab R., Defoirdt T., Bossier P. & Verstraete W. (2012). Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. Aquaculture 356–357: 351–356.

Dame R. (1993). Bivalve filter feeders and estuarine and coastal ecosystem processes: conclusions. NATO ASI Series. Vol. G 33.

Dame R. (2012). Ecology of Marine Bivalves An Ecosystem Approach. CRC Press, Second Edition.

da Silva K., Wasielesky W. & Abreu P. (2013). Nitrogen and Phosphorus Dynamics in the Biofloc Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. JOURNAL OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY, Vol. 44, No. 1, pp. 30-41.

Defeo O., Ortiz E. & Castilla J. (1992). Growth, mortality and recruitment of the yellow clam *Mesodesma mactroides* on Uruguayan beaches. Marine Biology. Issue 3, Vol. 114, pp 429–437.

Defeo O. & de Alava A., (1995). Effects of human activities on long-term trends in sandy beach populations: the wedge clam *Donax hanleyanus* in Uruguay. MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES. Vol. 123: 73-82.

De Schryver P., Crab R., Defoirdt T., Boon N. & Verstraete W. (2008). The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. Aquaculture 277: 125–137.

DINARA (2008). Política Nacional para el Desarrollo de la Acuicultura Sostenible en la República Oriental del Uruguay.

Ebeling J., Timmons M. & Bisogni J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. Aquaculture 257: 346–358.

Ekasari J., Angela D., Waluyo S., Bachtiar T., Surawidjaja., Bossier P. & DeSchryver P. (2014). The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. Aquaculture 426–427: 105–111.

Elston R. (1984). Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusc husbandry. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 15: 284-300.

Ellis J., Cummings V., Hewitt J., Thrush S. & Norkko A. (2001). Determining effects of suspended sediment on condition of a suspension feeding bivalve (*Atrina zelandica*): results

of a survey, a laboratory experiment and a field transplant experiment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, No. 267, pp. 147 – 174.

Emerenciano M., Gaxiola G. & Cuzon G. (2013). Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. *Biomass Now - Cultivation and Utilization*. Cap. 12, pp. 301-328.

Epifanio C. & Srna R. (1975). Toxicity of Ammonia, Nitrite Ion, Nitrate Ion, and Orthophosphate to *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Marine Biology* 33, 241-246.

FAO (2006). Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. Documento técnico de pesca 471.

FAO (2008). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura. Factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. *Actas de pesca y acuicultura* 12.

FAO (2010). Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos. Documento técnico de pesca 511.

FAO (2012). El estado mundial de la pesca y la acuicultura.

FAO (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura.

FAO (2015). Enfoque ecosistémico pesquero. Conceptos fundamentales y su aplicación en pesquerías de pequeña escala de América Latina. Documento técnico de pesca y acuicultura 592.

Fiori S. & Morsán E. (2004). Age and individual growth of *Mesodesma mactroides* (Bivalvia) in the southernmost range of its distribution. *ICES Journal of Marine Science*, 61: 1253-1259.

Fox, J. (2005). The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. *Journal of Statistical Software*, 14(9): 1--42.

Fox J. & Carvalho M. (2012). The RcmdrPlugin.survival Package: Extending the R Commander Interface to Survival Analysis. *Journal of Statistical Software*. Vol. 49, No.7, pp. 1-32.

Gallager S., Bidwell J. & Kuzirian A. (1989). Strontium is required in artificial seawater for embryonic shell formation in two species of bivalve molluscs. *Evolution, and Modern Aspects of Biomineralization in Plants and Animals*.

Galvao P., Longo R., Machado J. & Malm O. (2015). Estimating the Potential Production of the Brown Mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) Reared in Three Tropical Bays by Different Methods of Condition Indices. *Journal of Marine Biology* Volume 2015, Article ID 948053, 11 pages.

Gaspar M., Santos M. & Vasconcelos P. (2001). Weight-length relationships of 25 bivalve species (Mollusca: Bivalvia from the Algarve coast (southern Portugal). Journal of the Marine Biological Association UK, 81, 805-807.

Gianelli I., Martínez G. & Defeo O. (2015). An ecosystem approach to small-scale co-managed fisheries: The yellow clam fishery in Uruguay. Marine Policy 62, 196–202.

Gosling E. (2003). Bivalve Molluscs. Biology, Ecology and Culture. Fishing News Books.

Gutiérrez J., Jones C., Strayer D. & Iribarne O. (2003). Mollusks as ecosystem engineers: the role of shell production in aquatic habitats. OIKOS 101: 79 – 90.

Hargreaves J. (2013). Biofloc Production Systems for Aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center. No. 4503.

Héral M. & Berthomé J. (1991). Water quality criteria and monitoring for marine mollusc culture: the French experience

Hickey C. & Martin M. (1999). Chronic Toxicity of Ammonia to the Freshwater Bivalve *Sphaerium novaezelandiae*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. Issue 1, Vol. 36, pp 38–46.

Kester D., Duedall I., Connors D. & Pytkowicz R. (1967). Preparation of artificial seawater. Limnology and Oceanography. Vol.12. Issue 1, pp. 176-179.

Lagadic L., Caquet T. & Ramade F. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. Ecotoxicology 3, 193-208.

Lepore M., Penchaszadeh P., Alfaya J. & Herrmann M. (2009). Aplicación de calceína para la estimación del crecimiento de la almeja amarilla *Mesodesma mactroides* Reeve, 1854. Revista de Biología Marina y Oceanografía 44(3): 767-774.

Lercari D., Defeo O. & Celentano E. (2002). Consequences of a freshwater canal discharge on the benthic community and its habitat on an exposed sandy beach. Marine Pollution Bulletin 44, 1397–1404.

Lindahl O., Hart R., Hernroth B., Kollberg S., Loo L., Olrog L., Rehnstam-Holm A., Svensson J., Svensson S. & Syversen U. (2005). Improving Marine Water Quality by Mussel Farming: A Profitable Solution for Swedish Society. Ambio. Vol. 34, No. 2, pp. 131-138.

Lucas A. & Beninger P. (1985). The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. Aquaculture, 44, 187-200.

Luis-Villaseñor I., Voltolina D., Audelo-Naranjo J., Pacheco-Marges M., Herrera-Espericueta V. & Romero-Beltrán E. (2015). Effects of biofloc promotion on water quality, growth, biomass yield and heterotrophic community in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) experimental intensive culture. Italian Journal of Animal Science. Vol. 14:3726

Mamat N. (2010). Nutrition and Broodstock Conditioning of the New Zealand Pipi, *Paphies australis*. Aut.researchgateway.ac.nz

Manan H., Moh J., Kasan N., Suratman S. & Ikhwanuddin M. (2016). Identification of biofloc microscopic composition as the natural bioremediation in zero water exchange of Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, culture in closed hatchery system. Applied Water Science.

Maneiro P. (2014). Patrones de distribución vertical y transversal de la almeja amarilla *Mesodesma mactroides* en una playa disipativa de Uruguay. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Colibri.udelar.edu.uy

Mann R. (1978). A comparison of morphometric, biochemical, and physiological indexes of condition in marine bivalve molluscs. Energy and environmental stress in aquatic systems.whoi.edu

Megahed M. (2010). The Effect of Microbial Biofloc on Water Quality, Survival and Growth of the Green Tiger Shrimp (*Penaeus semisulcatus*) Fed with Different crude Protein Levels. Journal Of The Arabian Aquaculture Society, Vol. 5 No 2, pp. 119-142.

Molinero L. (2001). Modelos de regresión de Cox para el tiempo de supervivencia. Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión.

Monroy Dosta M., De Lara-Andrade R., Castro-Mejía J., Castro-Mejía G. & Coelho-Emerenciano M. (2013). Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia. Revista de Biología Marina y Oceanografía Vol. 48, No. 3, pp. 511-520

Morley N. (2009). Interactive effects of infectious diseases and pollution in aquatic molluscs. Aquatic Toxicology 96, 27–36.

Murphy R. (1985). Factors affecting the distribution of the introduced bivalve, *Mercenaria mercenaria*, in a California lagoon - The importance of bioturbation. Journal of Marine Research. Vol. 43, pp. 673-692.

Nell J., Diemar J. & Heasman M. (1996). Food value of live yeasts and dry yeast-based diets fed to Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* spat. Aquaculture 145, pp. 235-243.

Newell R. (2004). Ecosystem influences of natural and cultivated populations of suspension-feeding bivalve molluscs: a review. Journal of Shellfish Research. Vol. 23, No. 1, 51-61.

Nootong K. & Pavasant P. (2011). Effects of Organic Carbon Addition in Controlling Inorganic Nitrogen Concentrations in a Biofloc System. Journal of the world aquaculture society. Vol. 42, No. 3, pp. 339-346.

NSSP GUIDE (2009). Guide for the Control of Molluscan Shellfish. U. S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration.

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Ray A., Venero J., Browdy C. & Leffler J. (2010). Simple Settling Chambers Aid Solids Management In Biofloc System. Global Aquaculture Alliance.

Ray A., Dillon K. & Lotz J. (2011). Water quality dynamics and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production in intensive, mesohaline culture systems with two levels of biofloc management. Aquacultural Engineering, No. 45, pp. 127–136.

Reddy N. & Menon N. (1979). Effects of Ammonia and Ammonium on Tolerance and Bysso-genesis in *Pernaviridis*. Marine Ecology-Progress Series. Vol.1, 315-321.

Reid G., Liutkus M., Bennett A., Robinson S., Mac Donald B. & Page F. (2010). Absorption efficiency of blue mussels (*Mytilus edulis* and *M. trossulus*) feeding on Atlantic salmon (*Salmo salar*) feed and fecal particulates: Implications for integrated multi-trophic aquaculture. Aquaculture No. 299, pp. 165–169.

Richards G., McLeod C. & Le Guyader F. (2010). Processing Strategies to Inactivate Enteric Viruses in Shellfish. Food and Environmental Virology. Vol. 2, No 3, 183-193.

Riley L., Baker S. & Philips E. (2010). Self-Adhesive Wire Markers for Bivalve Tag and Recapture Studies. American Malacological Bulletin. Vol. 28(2):183-184.

Wright J. & Jones C. (2006). The Concept of Organisms as Ecosystem Engineers Ten Years On: Progress, Limitations, and Challenges. BioScience. Vol. 56 No. 3, pp. 203-209.

Sauco S., Gómez J., Barboza F., Lercari D. & Defeo O. (2013). Modified whole effluent toxicity test to assess and decouple wastewater effects from environmental gradients. PLOS ONE. Vol. 8, Issue 6.

Schveitzer R., Arantes R., Costódio P., do Espírito Santo C., Arana L., Seiffert W. & Andreatta E. (2013). Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. Aquacultural Engineering. Vol. 56: pp. 59-70.

Shanshan Z., Xiumei Z., Wentao L., Long L. & Xingyuan C. (2017). Experimental evaluation of fluorescent (alizarin red S and calcein) and clip-tag markers for stock assessment of ark shell, *Anadara broughtonii*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology.

Sherman K. (1994). Sustainability, biomass yields, and health of coastal ecosystems: an ecological perspective. Marine Ecology Progress Series. Vol. 112: 277-301.

Sousa R., Gutiérrez J. & Aldridge D. (2009). Non-indigenous invasive bivalves as ecosystem engineers. Biol Invasions 11:2367–2385

Steele-Petrovic H. (1975). An explanation for the tolerance of brachiopods and relative intolerance of filter-feeding bivalves for soft muddy bottoms. *Journal of paleontology*, Vol. 49, No. 3, pp. 552-556.

Stevenson R. & Woods W. (2006). Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Society for Integrative and Comparative Biology*. From the symposium "Ecophysiology and Conservation: The Contributions of Energetics".

Sugumar G., Nakai T., Hirata Y., Matsubara D. & Muroga K. (1998). *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases Of Aquatic Organisms*. Vol. 33: 111-118.

Tamburrini A. & Pozio E. (1999). Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal for Parasitology* 29: 711-715.

Todolí J. (2014). Propuesta de un sistema de marcaje para el estudio del crecimiento de tellina (*Donax trunculus*) en el área de explotación de la Cofradía de Gandia. Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Politécnica Superior de Gandia.

Troell M., Joyce A., Chopin T., Neori A., Buschmann A. & Fang J. (2009). Ecological engineering in aquaculture — Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture* No. 297, pp. 1–9.

Utting S. & Millican P. (1997). Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*. Issues 1–4, Vol. 155, pp. 45-54.

Wright P. & Anderson P. (2001). Nitrogen excretion. *Fish Physiology series*, Vol. 20.

Wright J. & Jones C. (2006). The Concept of Organisms as Ecosystem Engineers Ten Years On: Progress, Limitations, and Challenges. *BioScience*. Vol. 56 No. 3, pp. 203-209.

Zhao P., Huang J., Wang X., Song X., Yang C., Zhang X. & Wang G. (2012). The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture* 354–355: 97–106.

Zischke J. & Arthur J. (1987). Effects of elevated ammonia levels on the fingernail clam, *Musculium transversum*, in outdoor experimental streams. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 16, Issue 2, pp 225–231

7. Anexo

7.1. Cálculos de ración

La información disponible sobre la alimentación de adultos in vitro en moluscos proviene de la acuicultura, donde se suministra una cantidad de ración de aproximadamente el 3% de la masa seca (FAO 2006). El procedimiento utilizado para estimar la ración a suministrar fue el siguiente; tomando la submuestra inicial de 17 individuos de longitud ≥ 50 mm se graficó $MSP_i = f(\text{Longitud})$.

Interpolando la longitud promedio = 57,82 mm de las 100 almejas que quedaron se obtuvo la MSP promedio = 0,704 g de las almejas utilizadas en la experiencia.

Masa de ración = $0,03 (0,704) = 0,021$ g

El uso de Spirulina y harina de krill como ración se debe a su disponibilidad en el mercado y al conocimiento de la cantidad de proteína que contienen, lo que permite calcular la cantidad de azúcar que debe agregarse para obtener una relación 15C:1N (Ebeling 2006). El contenido de proteína de la Spirulina es del 65% y el de la harina de krill es del 60%. A la vez el contenido promedio de nitrógeno en la proteína es del 14%.

Masa de Spirulina/día = 0,021 g/día

Masa de proteína = $0,021 \cdot 65/100 = 0,0137$ g/día

Masa de nitrógeno = $0,0137 \cdot 14/100 = 0,002$ g/día

El contenido de carbono de la sacarosa es del 42,1%, para obtener una relación 15C:1N :

Masa de carbono = $15 \cdot 0,002 = 0,03$ g/día

Masa de sacarosa = $0,03/0,421 = 0,071$ g/día

Realizando los cálculos para la harina de krill se obtiene que se debe agregar la misma cantidad de azúcar que en los tratamientos con Spirulina.

7.2. Evaluación de los índices de condición

Los índices de condición (IC) permiten evaluar el estado fisiológico de un conjunto de animales en respuesta a determinadas condiciones ambientales, a través del estudio de relaciones entre parámetros bioquímicos, fisiológicos o morfométricos (Mann 1978). En acuicultura se utilizan con fines económicos, para estimar la calidad del producto y para la determinación del estado ecofisiológico de los animales de cría. Los IC calculados en este trabajo son utilizados para estimar la calidad o rendimiento del cultivo utilizando instrumentos (balanza, calibre y estufa), métodos y cálculos accesibles (Galvao 2015). En contrapartida en el caso de los bivalvos el animal debe estar muerto para obtenerlos, son índices estáticos (Lucas 1985, Brown 1987). El factor de condición de Fulton (K) es ampliamente utilizado en peces para estudios ecofisiológicos. K relaciona la masa húmeda total del animal con su longitud (largo del eje antero-posterior) al cubo, por lo tanto no hay que matar al animal lo cual permite un seguimiento en el tiempo. La hipótesis que permite utilizar K en determinada especie, es que el crecimiento del animal sea isométrico (Stevenson 2006). Quiere decir que en la ecuación de ajuste exponencial $M = aL^b$, donde M es la masa en gramos y L es la longitud en mm, el exponente $b=3$. En *Mesodesma mactroides*, $b= 3,03$ (Defeo 1992), por lo cual su crecimiento puede considerarse isométrico (Gaspar 2001).

El día 25/05/2016 se extraen en playa Puimayen, 145 ejemplares de *Mesodesma mactroides*, 118 de ellos (los de talla mayor a 50,00 mm) son destinados a ensayos de alimentación y evaluación de los ICs en laboratorio. En laboratorio las almejas fueron sacadas de la arena, enjuagadas en agua salina artificial (salinidad = $21,9 \pm 0,1$) y colocadas 5' sobre papel secante. Se midió la longitud máxima del eje antero posterior con

vernier y se masan (MHTi) en balanza digital de precisión. Para las experiencias alimentación y evaluación de los índices de condición, se procesa una sub muestra inicial de 17 individuos de longitud mayor a 50,00 mm, separando con bisturí la pulpa de las valvas, obteniendo la masa húmeda de la pulpa (MHPi = vísceras + músculo + manto) y masa húmeda de las valvas (MHVi), luego de escurridas en papel secante 5'. La obtención de la masa seca de la pulpa (MSPi) y de las valvas (MSVi) se realizó secando las muestras en estufa a 45 ± 5 °C hasta obtener una masa constante.

Los IC se calculan según las siguientes expresiones matemáticas (Galvao 2015):

$$IC1= MHP(g)/MHV(g)$$

$$IC2= MHP(g)/MHT(g)$$

$$IC3=MHP(g)/Longitud (cm)$$

$$IC4=MSP(g)/MHV(g)$$

$$IC5=MSP(g)/Longitud (cm)$$

$$IC6=MSP(g)/MST(g)$$

$$IC7=MSP(g)/(MHT(g)-MHV(g))$$

$$K=MHT(g)/Longitud^3(mm^3).10000$$

Las almejas muertas son procesadas, obteniendo MHTf, MHPf, MHVf, MSPf, MSVf, MSTf y los ICf por los procedimientos descritos.

Los IC se separan para su comparación en dos grupos: los IC que utilizan la masa húmeda en el denominador (IC1, IC2, IC3 y K) y los IC que utilizan la masa seca en el denominador (IC4, IC5, IC6 e IC7). Para seleccionar entre estos dos grupos cuál refleja en los resultados el efecto de los tratamientos de alimentación de manera más ajustada, se utilizan dos criterios:

1°- durante el desarrollo de los experimentos se observa el deterioro de las condiciones fisiológicas de los animales, el manto se retrae, las valvas se separan y se aprecia una

disminución de la actividad en el movimiento del pie y los sifones. Esperamos entonces que los ICs finales sean significativamente menores que los ICs iniciales.

2°- el otro criterio propone utilizar los datos de mortalidad obtenidos para realizar una regresión de Cox. Para ello se supondrá que la submuestra inicial (SM) sobrevive los 30 días de experimentación sin cambiar sus ICs. Los que ajusten al modelo de Cox serán seleccionados, ya que se espera una relación significativa de los ICs y la probabilidad de supervivencia.

Los índices de condición se agrupan para su análisis e interpretación en 2 grupos: los IC que relacionan la masa húmeda de la pulpa con otro parámetro y los IC que utilizan la masa seca de la pulpa.

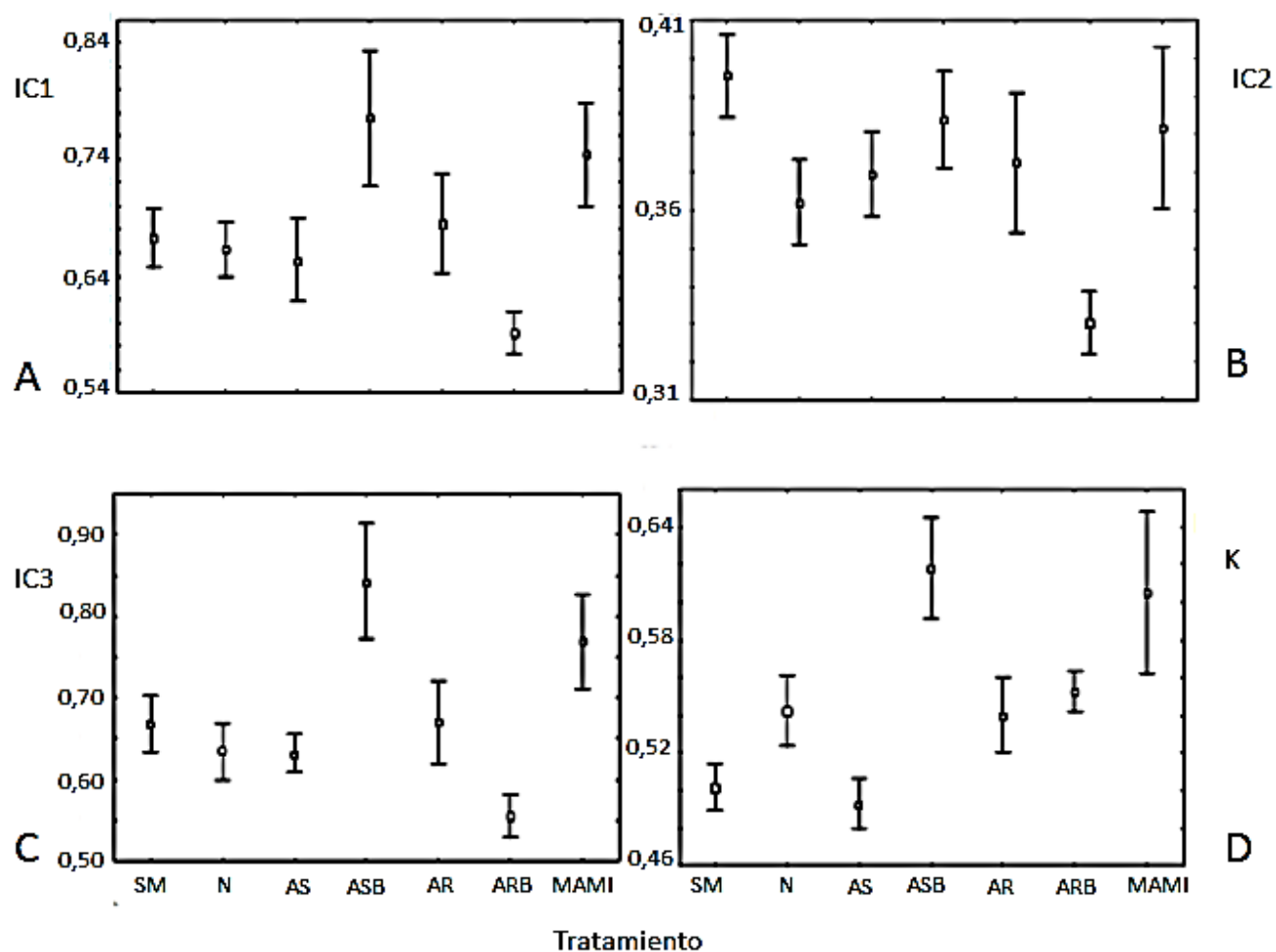


Figura 16. Gráficos para los ICs que utilizan la masa húmeda de la pulpa en los cálculos. A: Media $\pm$ sd del IC1 para los tratamientos de alimentación y la submuestra inicial (SM, N=17). B: IC2. C: IC3. D: K.

Un análisis de varianza (ANOVA) muestra un efecto significativo de los tratamientos sobre los ICs calculados utilizando la masa húmeda de la pulpa, IC1: $F(6,70)=2,549$, $p=0.0273$, IC2: $F(6,70)=2,373$, $p=0.0382$, IC3: $F(6,70)=4.095$, $p=0.00141$, K: $F(6,70)=4,74$, $p=0.000418$.

Los test múltiples de comparación de medias (Tukey Contrasts) para los ICs que utilizan la masa húmeda muestran la agrupación en familias por sus similitudes.

Tabla 14. Tratamientos de alimentación agrupados según su similitud en los ICs. SM es la submuestra inicial.

Tratamiento	IC1	IC2	IC3	K
SM	ab	b	ac	a
N	ab	ab	ab	ab
AS	ab	ab	ab	a
MA-MI	ab	ab	bc	b
AR	ab	ab	ac	ab
ASB	b	ab	c	b
ARB	a	a	a	ab

El análisis de las medias de los tiempos de supervivencia para los ICs que utilizan la masa húmeda en los cálculos muestra una gran variabilidad entre ellos. IC1 muestra un aumento significativo de la relación MHP/MHV para las almejas tratadas con biofloc producido con spirulina y una disminución significativa para el tratamiento de biofloc producido a partir de harina de krill. No existen diferencias significativas entre las medias de IC1 del resto de los tratamientos (N, AS, MA-MI y AR) y la submuestra inicial. El IC2 disminuye significativamente con respecto al IC inicial en todos los tratamientos. Para IC3 existe un aumento significativo con respecto a la submuestra inicial en los tratamientos de biofloc-spirulina (ASB y MA-MI), no hay variación significativa para AR y el resto (N, AS y ARB) muestran una disminución significativa. El factor de condición de Fulton muestra un aumento significativo para todos los tratamientos menos para AS, donde no hay diferencias significativas con la submuestra inicial. Ninguno de estos índices de condición ajusta para el modelo de Cox de riesgos proporcionales.

La Figura 17 representa los índices de condición 4, 5, 6 y 7 que utilizan la masa seca para realizar los cálculos:

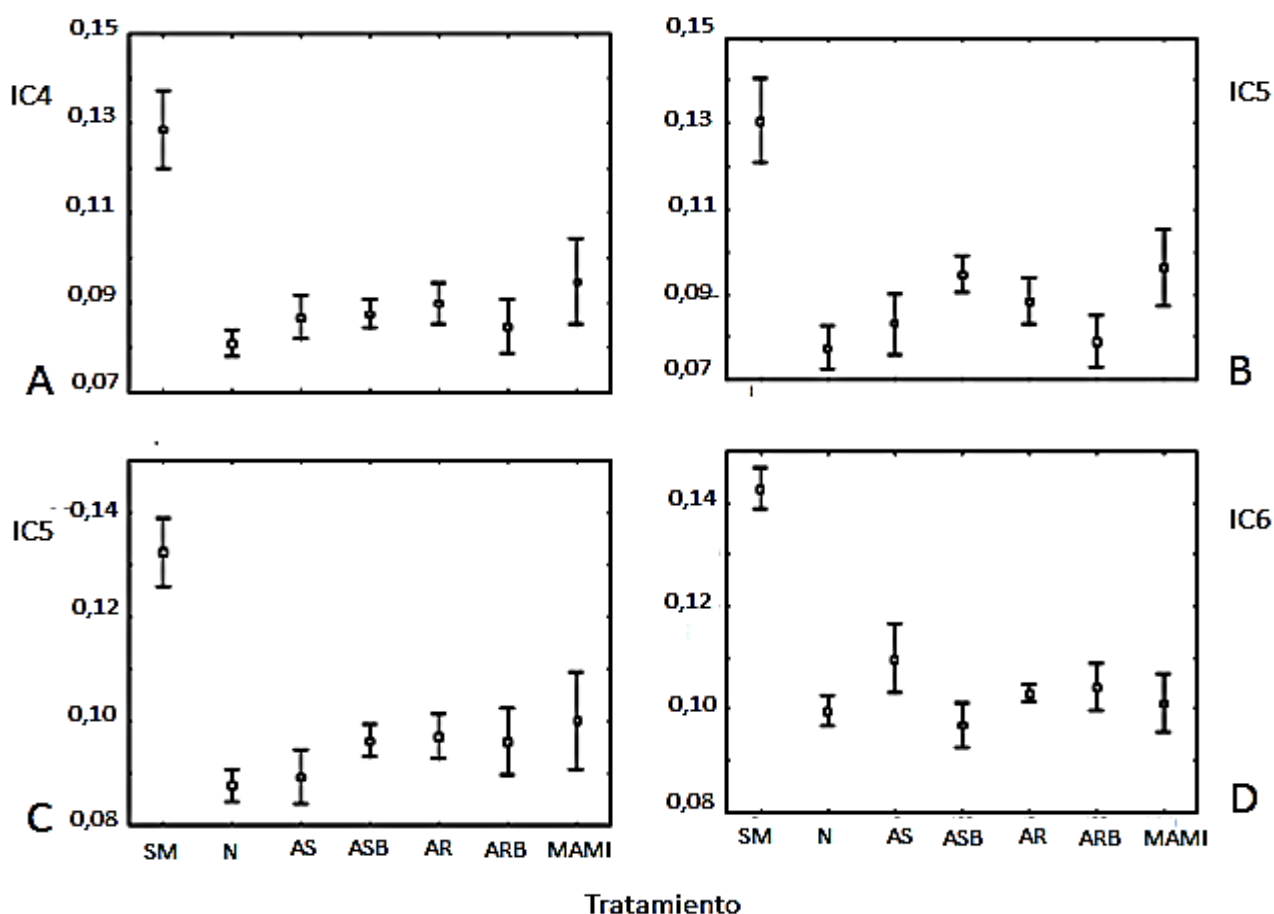


Figura 17. Gráficos para los ICs que utilizan la masa seca de la pulpa en los cálculos. A: media $\pm$ sd de IC4 para la submuestra inicial (SM) y los tratamientos de alimentación (N, AS, ASB, AR, ARB y MA-MI). B: IC5. C: IC6. D: IC7.

El análisis ANOVA muestra un efecto significativo de los tratamientos sobre todos los ICs que utilizan la masa seca de la pulpa en su cálculo: IC4, $F(6,66)=7,402$, $p=4,4E-06$. IC5, $F(6,66)=6,81$, $p=1,19E-05$. IC6, $F(6,66)=8,44$, $p=8,39E-07$. IC7, $F(6,66)=18,06$; $p=2,84E-12$

La media de ICs que utilizan la masa seca de la pulpa en los cálculos disminuyen significativamente con respecto a la submuestra inicial y no hay diferencias significativas entre tratamientos. IC4, IC5 e IC6 tienen un ajuste residual al modelo de Cox, mientras IC7 tiene un efecto significativo sobre la supervivencia.

Tabla 15. Resultados del modelo de Cox para los IC de masa seca

IC	RR	95%IC	p	RAZON VEROSIMILITUD	DE WALD	SCORE
4	4,73E-9	2.0E-23-1.11	0,051	6,50E-3	0.05095	9.958E-5
5	8.96E-10	1.21E-19-6.63	0.0724	3,92E-2	0.07238	0.0004159
6	2,65E-9	1.22E-24-5.74	0.0659	1.17E-5	0.066	7.35E-5
7	2,36E-6	1.18E-15-0.0047	0.00728	4,70E-6	0.007282	4.371E-8

Los índices de condición que utilizan la masa húmeda en su determinación (IC1, IC2, IC3 y K) muestran una gran variabilidad y no se corresponden con la observación del deterioro de la condición fisiológica de las almejas en todos los tratamientos. Se espera una disminución de la condición fisiológica por las condiciones de laboratorio, debido a que no hay recambio de agua. Utilizando los datos de supervivencia, ninguno de estos índices ajusta al modelo de Cox de riesgos proporcionales. Aunque estos índices son de cálculo sencillo, no describen las observaciones ni ajustan a los resultados obtenidos en los experimentos de alimentación.

Los índices de condición que utilizan la masa seca en sus cálculos muestran un descenso que se condice con las observaciones experimentales. El IC7 ajusta al modelo de Cox, pero el índice de correlación de Pearson muestra que podríamos haber elegido cualquiera de ellos como descriptor de la condición fisiológica para estos experimentos.

Se concluye que los IC4, IC5, IC6 y IC7 que utilizan la masa seca para su determinación se ajustan a las observaciones y resultados experimentales.