

## Epifluorescencia en la nutrición de larvas de *Strombus gigas* y *Strombus pugilis* (Mesogastropoda: Strombidae)

Dalila Aldana-Aranda<sup>1</sup> y Victoria Patiño-Suárez

Laboratorio de Biología Marina, CINVESTAV-IPN, Unidad Mérida, Km. 6 Carretera Antigua a Progreso, Mérida, Yucatán, C.P. 97310, México.

<sup>1</sup>Correo electrónico: daldana@kin.cieamer.conacyt.mx. Fax: (99) 81-29-60 ext. 338

(Rec. 25-VII-1997. Rev. 23-II-1998. Acep. 5-V-1998)

**Abstract:** In order to increase the scientific knowledge about the ingestion and digestion processes of the microalga *Tetraselmis suecica* by veliger larvae, we did a comparative analysis of feeding kinetics of two Caribbean conch larvae: Queen conch, *Strombus gigas*, and Fighting conch, *Strombus pugilis*. These kinetics have been determined in a direct way by means of epifluorescence microscopy. With this technique the potential nutritive value of different microalgae, can be detected in terms of their ingestion and digestion rates. Given the autofluorescence of algal cells and transparency of both larvae tissues and shell, the algae within the stomach, their lysis and subsequent degradation are observed. The evolution of the ingestion and digestion processes can be follow in live larvae, where other events like the expulsion of intact algae cells initially ingested by the larvae can be observed. The nutritional effects of *T. suecica* on veliger larvae are explained in function of a chromatic scale of four nutritional stages, and by means of temporal and absolute ingestion and digestion indices.

**Key words:** Strombidae, conch larvae, nutrition, microalgae, epifluorescence.

Desde 1977, el caracol reina *Strombus gigas* ha representado la segunda pesquería más importante en la región del Caribe (Brownell 1977); sin embargo, el incremento en su demanda y su pesca desmedida lo han convertido en un recurso sobreexplotado (Siddall 1983). La pesquería del caracol de uña *Strombus pugilis* es menos importante que la de *S. gigas*; sin embargo, ésta representa una fuente laboral y alimenticia para varios de los habitantes de la zona. A pesar de ser una especie con un alto potencial pesquero (Baqueiro y Medina 1990; Aldana Aranda y Baqueiro 1995), poco se conoce sobre su biología y cultivo (Brownell 1977; Bradshaw-Hawkins 1982, Brito-Manzano 1997), los cuales han sido estudiados tomando como base el conocimiento adquirido con *S. gigas*.

Dos décadas de estudio no han sido suficientes para optimizar las condiciones de cultivo larvario en términos de crecimiento, desarrollo y sobrevivencia; sin embargo, el esfuerzo científico ha permitido conocer que, durante el período de vida larval, el desarrollo y crecimiento de las velígeras dependen principalmente del tipo y cantidad de alimento proporcionado (Brownell 1977, Siddall 1983; Boiron-Metairon 1992), mismos que aún no han sido determinados.

La valoración cualitativa y cuantitativa de las dietas empleadas en el cultivo de las velígeras puede ser evaluada de manera indirecta mediante el efecto de dichas dietas sobre el crecimiento y desarrollo de la larva. Sin embargo, esta valoración también puede ser estudiada de

manera directa mediante la microscopía de epifluorescencia, con la cual se establecen las dinámicas de alimentación de las larvas mediante la observación de los procesos de ingestión y digestión. La microscopía de epifluorescencia se fundamenta en la fluorescencia natural de la clorofila presente en las células algales resultante de su excitación con luz de alta energía. Esta característica, aunada a la transparencia de los tejidos de la larva y de la concha resultan de enorme utilidad para secuenciar la toma, lisis y subsecuente degradación del alimento presente en el estómago larval.

Con el propósito de incrementar el conocimiento científico sobre el cultivo de *Strombus* spp. se realiza un análisis comparativo de los comportamientos alimenticios entre edades y especies larvales de los caracoles *S. gigas* y *S. pugilis* de 1 y 30 días de edad. Dicho análisis fue realizado con base en las cinéticas de alimentación obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia, y la aplicación de índices temporales y absolutos de ingestión y digestión.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolección y cultivo larval:** La masa de huevos de *S. gigas* fue colectada a una profundidad de 10 m, en la localidad de Banco Chinchorro, Península de Yucatán México (18°47' - 18°23' N y 87°14' E), a 24 km de la costa Sureste de Quintana Roo, entre Xcalak y Ubero. La de *S. pugilis* se colectó a una profundidad de 5 m, en la localidad de Seyba Playa, Campeche, México (20° 45' N y 91° 45' W). Ambas colectas fueron realizadas de hembras que se encontraban ovopositando. En el laboratorio, las huevas fueron colocadas, de manera independiente, sobre una malla de 500  $\mu\text{m}$ , sumergidas en agua de mar filtrada a 10 y 5  $\mu\text{m}$  y esterilizada con luz U.V. Recambios diarios de agua fueron realizados hasta el momento de la eclosión. Para cada especie larval, las velíferas recién eclosionadas fueron distribuidas en recipientes de plástico de 4 l a una densidad de 100 (*S. gigas*) y 200 (*S. pugilis*) larvas  $\text{l}^{-1}$ . Durante el cultivo

los recambios de agua fueron cada 24 hr en los primeros días y posteriormente cada 48 hr. La temperatura de cultivo se mantuvo a 29°C. La microalga utilizada en el experimento de epifluorescencia fue *Tetraselmis suecica* a una concentración de 1 000 células  $\text{ml}^{-1}$ , la cual fue cultivada con el medio F/2 de Guillard y Ryther (1962).

**Microscopía de epifluorescencia:** Utilizando microscopía de epifluorescencia se determinaron las cinéticas de ingestión y digestión de las larvas de *S. gigas* y *S. pugilis* para dos edades larvales: 1 y 30 días después de la eclosión (1d y 30d). Antes de iniciar la experiencia de ingestión y digestión, las larvas se mantuvieron en ayuno de 24-36 hr y los experimentos dieron inicio al suministrar el alimento. En las larvas recién eclosionadas este ayuno no fue necesario, ya que la primera toma de alimento marcó el inicio del experimento. Los procesos de ingestión y digestión se observaron a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 hr. Para las larvas de *S. pugilis* se hizo una observación adicional a 0.5 hr. El fenómeno de digestión fue observado interrumpiendo la alimentación después de la 2ª hr de iniciado el experimento para las larvas de *S. gigas* y, a la hr para las de *S. pugilis*. Posteriormente, las larvas fueron nuevamente transferidas a recipientes de agua de mar filtrada y esterilizada sin alimento. Las observaciones de los procesos de ingestión y digestión fueron realizadas con larvas vivas, tomando diferentes muestras de cada lote de cultivo en cada tiempo experimental.

El microscopio utilizado estaba equipado con una lámpara de mercurio de alta presión HBO de 50W, un filtro excitador BP 450-490, un filtro divisor cromático FT510 y un filtro supresor LP 520.

Para determinar el grado de ingestión y digestión de *T. suecica* por las larvas velíferas se utilizó la escala cromática de nutrición establecida por Babinchak y Ukeles (1979), cuyas características cualitativas son señaladas en el Cuadro 1.

El comportamiento de alimentación entre las dos especies y edades larvales fue analizado mediante Índices temporales y absolutos de in-

CUADRO 1

*Escala cualitativa de los cuatro estados de nutrición para evaluar la ingestión y grado de digestión de las células algales por las larvas (Babinchak y Ulkeles 1979)*

Estados	Características
1	Célula enteras visibles en el estómago, fluorescencia roja.
2	Presencia de células intactas y células lisadas, fluorescencia roja menos intensa y algunas veces rosa.
3	Ausencia de células intactas, fluorescencia difusa, rojo pálido, rosa o naranja.
4	Ninguna célula algal entera. No hay signos de fluorescencia, indicando que las larvas nunca ingirieron alimento o que la digestión ha culminado.

gestión y digestión (Cuadro 2). Para calcular el IAD debe considerarse el número de larvas en estado 1 a la última hora en donde éste fue visto (n1d). Generalmente cuando una alga es bien digerida el valor de n1d es bajo y con tendencia a ser visto hacia las últimas horas del experimento (Aldana-Aranda 1993).

## RESULTADOS

**Estados de nutrición:** La evolución de los estados de nutrición para la microalga *T. suecica* por las larvas de *S. gigas* y *S. pugilis* de 1d y 30d se muestra en la figura 1. Los valores de cada estado son expresados en porcentaje. En las larvas de *S. gigas* de 1d el estado 1 de nutrición fue observado de la 1<sup>a</sup> a 5<sup>a</sup> hr con valores entre 40 a 90%. Este estado disminuyó a valores inferiores al 5% hacia la 6<sup>a</sup> y 7<sup>a</sup> hr. El esta-

do 2, marcó el inicio de la digestión a la 3<sup>a</sup> hr. Un estado 3 de digestión más avanzada comenzó a ser visible a la 5<sup>a</sup> hr, siendo mayor el porcentaje de larvas en este estado entre la 6<sup>a</sup> y 8<sup>a</sup> hr. Ocho horas después de haber sido administrado el alimento, estas larvas no culminaron la digestión de *T. suecica*.

En las larvas de *S. pugilis* de 1d, el estado 1 de nutrición fue observado con valores superiores al 90% a lo largo de las ocho horas contempladas del experimento. Por tal motivo, el seguimiento del alimento ingerido fue prolongado con observaciones a cada hr hasta completar un ciclo de 24 hr. Este criterio también fue considerado para las larvas de 30d de esta especie. Durante las 24 hr los estados 2 y 3 no fueron observados, lo que indica que durante este tiempo no hubo digestión de *T. suecica* por estas larvas de 1d. A la 9<sup>a</sup> y 15<sup>a</sup> hr se observaron larvas vomitando células enteras de *T. suecica*.

Las larvas de *S. gigas* de 30d presentaron un estado 1 de nutrición del 100% en las tres primeras horas. Los estados 2 y 3 de digestión fueron observados a partir de la 4<sup>a</sup> hr. Después de 24 hr de administrado el alimento, la digestión de *T. suecica* no se culminó, observándose un estado 3 del 40%.

En las larvas de *S. pugilis* de 30d el estado 1 fue observado hasta la 10<sup>a</sup> hr. Los valores de este estado fueron entre 87 y 93% durante las primeras cuatro horas, disminuyendo de manera secuencial a 67, 40 y 7% a la 8<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup> y 10<sup>a</sup> hr, respectivamente. El estado 2 marcó el inicio de la digestión y fue observado a la 5<sup>a</sup> hr con un

CUADRO 2

*Índices temporales y absolutos de ingestión y digestión para comparar el comportamiento alimenticio de las larvas velígeras*

Índice	Ingestión	Digestión
Temporal	$I.T.I. = n1/n0$ (Aldana-Aranda 1993)	$I.T.D. = n2+n3/n0$ (Aldana-Aranda et al. 1991)
Absoluto	$I.A.I. = n0 - n4min \times 100/n0$ (Aldana-Aranda 1993)	$I.A.D. = n0 (n4min + n1d) \times 100/n0$ (Aldana-Aranda 1993)

Nomenclatura: n0, total de larvas observadas; n1, larvas en estado 1; n2, larvas en estado 2; n3, larvas en estado 3; n4min, valor mínimo de larvas observadas en estado 4; y n1d, larvas en estado 1 a la última hora en la que este estado fue observado.

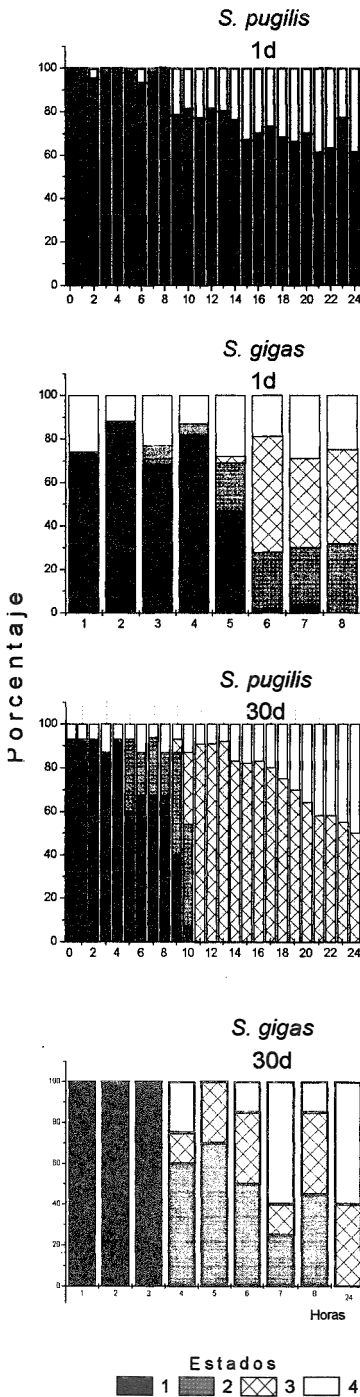


Fig. 1 Evolución de los cuatro estados de nutrición, expresados en porcentaje, de larvas de *S. pugilis* y *S. gigas* de 1 y 30 días de edad alimentadas con *T. suecica*.

valor de 33%. Las larvas con un proceso de digestión más avanzado (estado 3) fue observado a la 11<sup>a</sup> hr en el 90% de la población larval. A partir de este momento, sólo fueron observados los estados 3 y 4, con una relación inversamente proporcional entre el tiempo de observación y estado 3. A la 24<sup>a</sup> hora de haber sido administrada *T. suecica* el 50% de la población larval se encontraba en estado 3.

**Índices temporales:** El ITI de *T. suecica* para las larvas de *S. gigas* y *S. pugilis* de 1d y 30d se ilustra en la figura 2. En las larvas de *S. pugilis* de 1d los valores de este índice fluctuaron entre 0.6 y 1.0 durante las 24 horas del experimento. En las larvas de 30d los valores más altos del ITI fueron de 0.87 a 0.93, mismos que fueron observados entre 0.5 y 4<sup>a</sup> hr. Este índice disminuyó de manera secuencial al paso del tiempo hasta la 11<sup>a</sup> hr, cuando se observó un valor de cero. En las larvas de *S. gigas* de 1d el valor máximo para este índice fue 0.86 a la 2<sup>a</sup> hr. A la 4<sup>a</sup> hr, el ITI fue de 0.80, seguido de una disminución drástica hacia la 6<sup>a</sup> hr, y con un valor de cero a la 8<sup>a</sup> hr.

El ITD de *T. suecica* por las larvas de *S. gigas* y *S. pugilis* de 1d y 30d se muestra en la figura 3. En las larvas de *S. pugilis* la evolución de este índice sólo se muestra para las de 30d, ya que las recién eclosionadas no realizaron la digestión de *T. suecica* durante el tiempo experimental de observación (24 hr). A la 5<sup>a</sup> hr, el ITD fue de 0.33. El máximo valor observado fue 0.92 a la 13<sup>a</sup> hr. A partir de esta hora los valores de este índice disminuyeron secuencialmente hasta 0.5 a la 24<sup>a</sup> hr. Con las larvas de *S. gigas* de 1d el ITD a la 3<sup>a</sup> hr fue de 0.09. A la 6<sup>a</sup> hr este índice se observó en su máximo valor: 0.79. A 24 hr después de administrado el alimento las larvas presentaban un ITD de 0.75.

**Índices absolutos:** Los valores del IAI e IAD con *T. suecica* para las larvas de *S. pugilis* y *S. gigas* de 1d y 30d son presentados en el Cuadro 3. El IAI para esta alga fue elevado en ambas edades y especies larvales, correspondiendo los valores más altos a las larvas de *S. pugilis*. En las larvas de *S. gigas* de 30d el va-

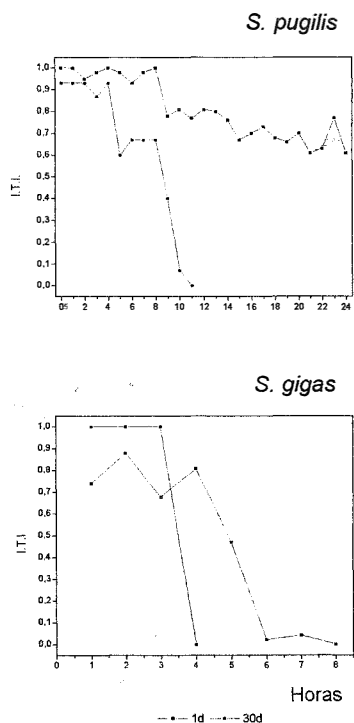


Fig. 2. Valores del ITI de larvas de *S. pugilis* y *S. gigas* de 1 y 30 días de edad alimentadas con *T. suecica*.

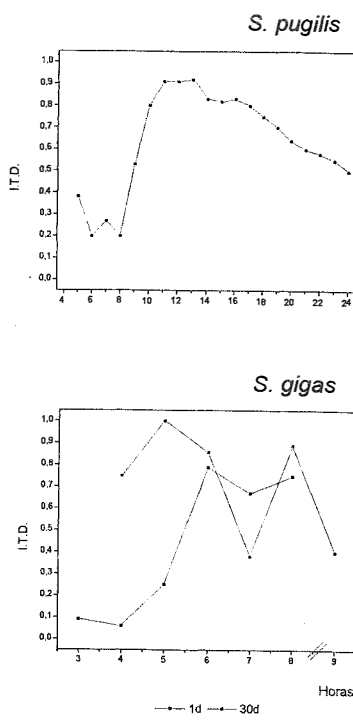


Fig. 3. Valores del ITD de larvas de *S. pugilis* y *S. gigas* de 1 y 30 días de edad alimentadas con *T. suecica*.

CUADRO 3

Índices absolutos de ingestión y digestión de *T. suecica* por las larvas de *S. gigas* y *S. pugilis* de 1 y 30 días después de la eclosión

Especie larval	I.A.I. (%)		I.A.D. (%)	
	1d	30d	1d	30d
<i>S. pugilis</i>	98	93	0	87
<i>S. gigas</i>	89	89	85	-

lor de 1d fue alto, el total de la población se encontró en el estado 1 de nutrición, por lo que no fue posible calcular el IAD en estas larvas. El IAD fue elevado en ambas edades y especies larvales, con la excepción de las larvas de *S. pugilis* de 1d, en donde éste fue cero.

DISCUSIÓN

La microscopía de epifluorescencia resulta un método de gran utilidad en la observación

de los mecanismos de alimentación de las larvas velígeras. Con este estudio se pudieron establecer las cinéticas de ingestión y digestión de larvas de *S. gigas* y *S. pugilis* a dos diferentes estadios de desarrollo larval: 1 y 30 días después de la eclosión. Mediante esta técnica, la observación del alimeto en el interior de la larva se facilita por la transparencia de los tejidos larvales. Esta ventaja permitió realizar una estimación aproximada, de la cantidad de alimento presente en la larva durante las primeras horas en que éstas estuvieron en contacto con el alimento. Los estimados del llenado estomacal para ambas edades y especies larvales son presentados en la Cuadro 4. Así, se observa que, existen diferencias entre edades y especies larvales para la ingestión de *T. suecica*. El 50% de la población larval de *S. pugilis* de 1d presentó una repleción estomacal (RE) de ~25%, mientras que el resto mostró una RE de ~50%. En las larvas de 30d este mismo comportamiento fue observado a 0.5 hr, mientras que a 1 hr la

CUADRO 4

Estimación cualitativa de la repleción gástrica con *T. suecica* de las larvas de *S. pugilis* y *S. gigas* de 1 y 30 días después de la eclosión

Proporción del llenado estomacal (% aprox.)	Población (%)							
	<i>S. pugilis</i> Edad larval				<i>S. gigas</i> Edad larval			
	1d		30d		1d		30d	
	0.5 hr	1 hr	0.5 hr	1 hr	1 hr	2 hr	1 hr	2 hr
25	50	50	50	-	30	20	-	-
50	50	50	50	50	20	20	-	-
75	-	-	-	50	20	20	100	-
100	-	-	-	-	30	40	-	100

RE fluctuó entre ~50 y 75% con igual proporción poblacional. El 50% de la población larval de *S. gigas* de 1d, a la 1<sup>a</sup> hr presentó una RE entre ~25 y 50%, y entre ~75 y 100% para el resto de la población. A la 2<sup>a</sup> hr, el 60% de la población tuvo una RE de ~75-100%. En las larvas de 30d de esta misma especie se observó un 100% de la población con una RE de ~75% a la 1<sup>a</sup> hr, y una RE de ~100% a la 2<sup>a</sup> hr.

Estas observaciones muestran que existe una relación proporcional entre edad y cantidad de alimento ingerido. Asimismo se observa que independientemente de la edad, las larvas de *S. gigas* presentan una RE mayor que las velígeras de *S. pugilis*, siendo esta observación más evidente para las larvas recién eclosionadas. Al considerar el tamaño de las larvas cuando eclosionan se tiene que las velígeras de *S. pugilis* miden en promedio 212  $\mu\text{m}$  (Brito-Manzano 1997), mientras que las de *S. gigas* 300-350  $\mu\text{m}$  (García-Santaella 1992). Al respecto se sabe que en las larvas de moluscos, la selección de las partículas en suspensión depende del tamaño y concentración de las partículas, talla larval, y temperatura (Bayne 1983). Es evidente que al eclosionar existe una diferencia en la talla larval de ambas especies, la cual influye en la toma del alimento. Sin embargo, *T. suecica* es una microalga que mostró un elevado IAI por estas especies y para las dos edades larvales estudiadas. Con respecto a la digestión, *T.*

*suecica* fue bien digerida indistintamente de la edad y especie larval, con la excepción de las larvas de *S. pugilis* de 1d, las cuales no digirieron este alimento en un lapso de 24 hr. Al comparar el proceso de digestión entre las especies larvales, nuevamente se observa que éste fue más rápido en las larvas de *S. gigas* que en las de *S. pugilis* (Fig. 1).

Otra de las ventajas de esta técnica es que los procesos de ingestión y digestión pueden ser observados ya sea con larvas fijadas con formol salino al 2% (Lucas y Rangel 1981), o con larvas vivas como en este estudio, lo cual ha permitido también observar la expulsión de células algales intactas, que inicialmente habían sido ingeridas por la larva.

De acuerdo a su ingestibilidad y digestibilidad, se corrobora de manera directa que el empleo de *T. suecica* es una buena fuente de alimento en los cultivos larvales de *Strombus* sp.; sin embargo habría que considerar las concentraciones de alimento proporcionadas entre ambas especies en su estadio larval, sobre todo en las primeras etapas de desarrollo, ya que existe una diferencia entre la capacidad de ingestión del alimento entre las larvas de *S. gigas* y las de *S. pugilis*.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo financiero de los proyectos CI1\*0432ME(JR) de la Comunidad Económica Europea, P65000ME del Consejo Científico Técnico de la embajada de Francia y, P218CCOC882530 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México. Se agradece el apoyo de la Secretaría de Pesca, Delegaciones de Quintana Roo, Yucatán y Campeche, a los pescadores de las Cooperativas de Banco Chinchorro y Seyba Playa y, a Manuel Sánchez, Luisa Zaldivar y Nancy Brito por su apoyo técnico.

## RESUMEN

Con base en las cinéticas de alimentación se realizó un análisis comparativo de los mecanismos de ingestión y digestión de la microalga *Tetraselmis suecica* por las larvas velígeras de dos gasterópodos característicos del Caribe: el caracol Reina, *Strombus gigas* y el caracol de Uña, *Strombus pugilis*. La determinación de dichas cinéticas fue realizada de manera directa mediante microscopía de epifluorescencia. Esta metodología permite conocer el valor nutritivo potencial de diferentes microalgas, de acuerdo a sus tasas de ingestión y digestión. Este método se basa en la autofluorescencia de las células algales, en la transparencia de los tejidos de la larva y de la concha, en la presencia de alimento en el estómago de la larva, en su lisis y su subsecuente degradación. La evolución de los procesos de ingestión y digestión puede ser secuenciada con larvas vivas, lo que permite observar otros eventos, tales como la expulsión de células algales intactas inicialmente ingeridas por la larva. Los resultados de los efectos nutricionales de *T. suecica* en las larvas velígeras son interpretados bajo una escala cromática de cuatro estados nutricionales, y mediante índices absolutos y temporales de ingestión y digestión.

## REFERENCIAS

- Aldana-Aranda, D., A. Lucas, T. Brulé, M. Andrade, E. García-Santaella, N. Maginot & M. Le Penñec 1991. Observations on ingestion and digestion of unicellular algae by *Strombus gigas* larvae (Mollusca, Gastropoda) using epifluorescence microscopy. *Aquaculture* 92: 359-366.
- Aldana-Aranda, D. 1993. L'alimentation des larves de mollusques: approche méthodologique. These de Doctorat d'Université. Université de Marseille III. 68 p.
- Aldana-Aranda, D. & E. Baqueiro. 1995. Los moluscos en México: estudio y aprovechamiento. *Academia* 27: 33-43.
- Babinchak, J. & R. Ukeles. 1979. Epifluorescence microscopy, a technique for the study of feeding in *Crassostrea virginica* veliger larvae. *Mar. Biol.* 51: 69-76.
- Baqueiro, E. & M. Medina. 1990. Diagnóstico de la pesquería de caracol en Campotón y Seyba Playa, Campeche. Instituto Nacional de la Pesca. Secretaría de Pesca, México n°. 3:17 p.
- Bayne, B.L. 1983. Physiological ecology of marine molluscan larvae. *The Mollusca* 3: 299-343.
- Boidron-Metairon, I. 1992. A new approach to comparative studies of *Strombus gigas* larvae at the developmental and nutritional levels. *Proc. Gulf Caribb. Fish. Inst.* 41: 459-467.
- Bradshaw-Hawkins, V. L. 1982. Contribution to the natural history of the West Indian fighting conch, *Strombus pugilis* (Linnaeus) in Barbados, with emphasis in reproduction. M. Sc. Thesis University McGill, Montreal, Canadá. 131 p.
- Brito-Manzano, N. P. 1997. Alimentación de larvas: efecto del fotoperíodo sobre la organogénesis, crecimiento y sobrevivencia larval de *Strombus pugilis* (Linné, 1758). Tesis M. Sc. CINVESTAV-IPN, Mérida, Yucatán, México. 90 + XXII p.
- Brownell, W. N. 1977. Reproduction, laboratory culture, and growth of *Strombus gigas*, *S. costatus* and *S. pugilis* in los Roques, Venezuela. *Bull. Mar. Sci.* 27: 668-680.
- García-Santaella, E. 1992. Efecto de la dieta y la ración sobre el crecimiento y desarrollo de las larvas de *Strombus gigas* (Linné, 1756) hasta su asentamiento. Tesis M. Sc. CINVESTAV-IPN, Mérida, Yucatán, México. 108 p.
- Gillard, R.L.L. & J.H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.
- Lucas, A. & C. Rangel. 1981. Vitesses d'ingestion et de digestion du phytoplancton observées au microscope à epifluorescence chez les larves de *Mytilus edulis* (L.) (Bivalvia, Mollusca). *Haliotis* 11: 171-180.
- Siddall, S.E. 1983. Biological and economic outlook for hatchery production of juvenile queen conch. *Proc. Gulf Caribb. Fish. Inst.* 35: 46-52.