MECANISMO QUIMICO DE REGULACION DE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE *Tigriopus angulatus* BOZIC (Copepoda: Harpacticidae)

TESIS

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
UNIVERSIDAD DE VALPARAISO

DIEGO ARAYA CASTRO

2000

63m

Mare. 51969

M
AR663m
2000

MECANISMO QUÍMICO DE REGULACIÓN DE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE *Tigriopus angulatus* BOZIC (Copepoda: Harpacticidae)

INSTITUTO DE OCEANOLOGÍA
BIBLIOTECA
Universidad de Valparaíso
T0068

TESIS

Para optar al grado de Licenciado en Biología Marina y al Título Profesional de Biólogo Marino

UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA

DIEGO ARAYA CASTRO

2000

Esta Tesis es parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en

Biología Marina y el Título Profesional de Biólogo Marino

DIEGO ARAYA CASTRO

Aprobada por la comisión de Tesis en Octubre del 2000

Prof. Marcela Goddard
Director de Tesis

Prof. Adolfo Alvial Muñoz

Prof. Ricardo Bravo Méndez

TABLA DE CONTENIDO

Página

AGRADECIMIENTOS.....v

LISTA DE TABLAS.....vii

LISTA DE FIGURAS.....viii

RESUMEN.....x

INTRODUCCION.....1

PROBLEMA.....7

HIPOTESIS.....9

OBJETIVOS.....9

MATERIALES Y METODOS.....10

Obtención del material.....10

Preparación del medio condicionado.....10

Pozas de marea.....12

Efecto del medio sobre la fertilidad de las hembras.....12

Efecto del medio sobre la viabilidad de los huevos.....13

Efecto del medio sobre la abundancia poblacional.....14

Análisis químico del medio de cultivo.....14

Análisis de los resultados.....16

RESULTADOS.....18

Efecto del medio sobre la fertilidad de las hembras.....18

Efecto del medio sobre la viabilidad de los huevos.....21

Efecto del medio sobre la abundancia poblacional....22

Estudio químico del medio de cultivo....23

Estudio poblacional....28

DISCUSION....36

CONCLUSIONES....47

REFERENCIAS....49

ANEXOS....53

AGRADECIMIENTOS

Quisiera aprovechar estas líneas para agradecer en forma muy especial a quienes hicieron posible la realización de esta Tesis.

En primer término a Marcela Goddard, quien desinteresadamente acepto participar de este proyecto apoyándolo en forma incondicional y guiándolo a través de cada una de sus etapas en forma muy profesional y comprensiva, no tan sólo como una excelente profesora sino también como una gran amiga.

A Fundación Chile y al proyecto FONDEF de peces planos, a través de Adolfo Alvial por creer en mi, por la paciencia, el acceso a bibliografía y el apoyo financiero.

A Marcela Escobar y el Departamento de Control de calidad de la Escuela de Química y Farmacia de nuestra Universidad por la asesoría química y el acceso a equipamiento y reactivos.

A Mario Morales y el Departamento de Toxicología Humana y Ambiental de la Universidad de Playa Ancha por la realización de la Cromatografía Líquida y su buena disposición a ayudarme en el éxito de mi trabajo.

A Roberto Prado, Angélica y Antonieta quienes hicieron posible no sólo el análisis de amonio sino la realización de todo el experimento poblacional en sus dependencias, brindándome, valiosa asesoría, ayuda y humor.

A Gloria Collantes, quien al inicio de este trabajo me permitió generosamente realizar cultivos de microalgas brindándome asesoría y equipamiento.

En forma personal también quiero agradecer a todos mi seres queridos que me han acompañado en esta etapa de mi vida.

A mi Tía Blanquita que como una verdadera madre me ha acogido durante el desarrollo de esta tesis brindándome techo, amor, paciencia y mucha alegría, junto a mis primos-hermanos Daniel, Cristóbal, Mario y la Maca.

A mis padres que siempre me han tratado como adulto dándome toda la libertad para que viva mis propios procesos a mi manera, pero siempre de la mano de sus inequívocos consejos. A mi hermana Ursula, pilar y modelo del camino correcto; tener éxito haciendo lo que te gusta.

A Daniel y Dayana por acogerme en mis estadías en Viña como si fuera de la familia, a Rodrigo por su incondicional asesoría computacional y a Mariana por llenarme la vida de alegrías.

LISTA DE TABLAS

Tabla Página

1. Coeficientes de correlación de rangos de Spearman y de Kendall entre temperatura del medio y parámetros químicos.....26

2. Coeficientes de correlación de rangos de Spearman y de Kendall entre parámetros químicos en cultivo con recambio del medio.....27

3. Coeficientes de correlación de rangos de Spearman y de Kendall entre parámetros químicos en cultivo sin recambio del medio.....27

4. Coeficientes de correlación de rangos de Spearman y de Kendall entre abundancia por clases etarias y parámetros químicos de cultivo con recambio del medio.....31

5. Coeficientes de correlación de rangos de Spearman y de Kendall entre abundancia por clases etarias y parámetros químicos de cultivo sin recambio del medio.....31

LISTA DE FIGURAS

Figura Página

1. Microfotografía de *Tigriopus angulatus*.....5

2. Microfotografía de *Tigriopus angulatus*.....6

3. Fotografía aérea del área de toma de muestras.....11

4. Ecuación de reacción del amoniaco para formar azul de indofenol.....15

5. Oviposición de hembras provenientes de medio fresco cultivadas en medio fresco y condicionado.....18

6. Producción de sacos ovígeros de hembras provenientes de medio fresco y mantenidas en control y medio condicionado.....19

7. Intervalo entre puestas de hembras grávidas provenientes de medio fresco y mantenidas en medio fresco y condicionado.....20

8. Duración del desarrollo embrionario de hembras grávidas provenientes de medio fresco y mantenidas en medio fresco y condicionado.....21

9. Tiempos de eclosión de ovisacos provenientes de distintas pozas y dispuestos en medio fresco.....21

10. Éxitos de eclosión de ovisacos provenientes de pozas renovadas y dispuestos en medios fresco y agua de poza no renovada.....22

11. Variaciones de temperatura del medio durante el experimento poblacional.....22

12. Cromatografía líquida de alta resolución realizada al medio de cultivo.....23

13. Oxígeno disuelto en el medio de cultivo para ambos tratamientos durante el experimento poblacional....24
14. Valores de pH en ambos tratamientos....25
15. Valores de concentración de amonio disuelto en el medio de cultivo....25
16. Variaciones en la abundancia de nauplios para ambos tratamientos....28
17. Variaciones en la abundancia de copepoditos para ambos tratamientos....29
18. Variaciones de la abundancia de adultos en ambos tratamientos....29
19. Variaciones poblacionales para ambos tratamientos....30
20. Variaciones de amonio comparadas con la abundancia de las diferentes clases etarias en cultivo con recambio del medio....33
21. Variaciones de amonio comparadas con la abundancia de las diferentes clases etarias en cultivo sin recambio del medio....34
22. Variaciones de oxígeno comparadas con abundancia de adultos en cultivo sin recambio del medio....35
23. Variaciones de pH comparadas con abundancia de adultos en cultivo sin recambio del medio. 35
24. Líneas de tendencia polinomial de tercer orden de oxígeno y adultos en cultivos sin recambio del medio....42
25. Líneas de tendencia polinomial de tercer orden de pH y adultos en cultivos sin recambio del medio....43

RESUMEN

Los copépodos desempeñan una importante función en la trama trófica marina. Son los consumidores primarios más abundantes del océano y sirven de alimento a gran cantidad de invertebrados y peces, tanto planctónicos como bentónicos. Su uso como dieta viva en el cultivo de larvas de peces marinos presenta grandes potencialidades, pero aún se encuentra en una etapa experimental, debido a la imposibilidad de mantener cultivos intensivos a gran escala.

En este trabajo se plantea como hipótesis la existencia de un mecanismo químico en la dinámica poblacional de *Tigriopus angulatus* Bozic que regularía la tasa reproductiva en función de las condiciones ambientales; inhibiendo la reproducción en altas densidades. Este mecanismo constituiría una forma de autorregulación de la población a fin de adaptarse a condiciones adversas del ambiente.

Se realizaron una serie de experimentos a fin de demostrar la existencia de una relación entre la acumulación de productos metabólicos en el medio y la baja en la abundancia de *Tigriopus angulatus*; fundamentalmente cuantificando la fertilidad de las hembras, la viabilidad de los huevos y la sobrevivencia de la población mantenida en cultivos con y sin recambio de agua. Conjuntamente se realizaron análisis del medio de cultivo midiendo pH, concentración de oxígeno, concentración de amonio y evaluando la presencia de compuestos feromónicos.

Se observó disminución en la fertilidad y productividad de hembras grávidas al ser cultivadas en medios químicamente condicionados. La baja en la productividad, se debió al incremento del intervalo entre puestas, y no a cambios en la duración del desarrollo embrionario. La viabilidad de los huevos se vió afectada negativamente al disponerlos en agua de pozas de marea sin renovación, pero en los huevos provenientes de estas pozas disminuyó el tiempo de desarrollo embrionario al disponerlos en medio fresco. Se discute la relación entre la viabilidad de los huevos y la duración del desarrollo embrionario con los cambios de salinidad en el medio.

Por otro lado, no es posible establecer una correlación entre algunas variables químicas como oxígeno y pH con mortalidad o disminución de la tasa reproductiva; así como tampoco se identificaron compuestos feromónicos en los medios de cultivo. Sin embargo es posible establecer una relación significativa entre la abundancia de *Tigriopus angulatus* y la concentración de amonio en el medio.

INTRODUCCION

Los copépodos desempeñan una importante función en la trama trófica marina (Kahan, 1982). Son los consumidores primarios más abundantes del océano (Raymont, 1963; fide Boltovskoy, 1981) y sirven de sustento a innumerables especies. Los calánidos constituyen el alimento primordial del zooplancton y de gran cantidad de peces planctófagos como el arenque, anchoveta, sardina, entre otros (Boltovskoy, 1981); por su parte, los harpactícidos son el componente principal en la dieta de estados juveniles de peces e invertebrados bentónicos (Gee, 1987).

Los copépodos constituyen un excelente recurso alimentario para muchas larvas y juveniles de invertebrados y peces, y por ello presentan un gran potencial en la acuicultura (Hiep, 1986). La calidad nutricional de los copépodos es considerada muy superior a las dietas vivas comúnmente utilizadas en acuicultura, tales como rotíferos y braquiópodos como *Artemia salina* (Sorgeloos, 1996). En general, los copépodos presentan un alto contenido proteico, de alrededor de 48% y una adecuada composición de aminoácidos, a excepción de metionina e histidina (Anexo 1). La proporción de ácidos grasos como DHA (ácido decosahexaenoico) y EPA (ácido eicosapentaenoico), y el alto contenido de los llamados HUFAs (ácidos grasos de más de 20 carbonos y más de 3 dobles enlaces) determinan una mayor sobrevivencia en larvas de peces marinos alimentados con copépodos en comparación con aquellas alimentadas con dietas vivas tradicionales (Kraul, 1991).

Además de sus cualidades nutricionales, el amplio rango de talla entre los estados larvales y adulto permite disponer de una amplia gama de tamaños de presa (80 a 900 µm) para ser administrados en diferentes etapas de desarrollo de la especie de cultivo; lo que es especialmente ventajoso en especies con bocas pequeñas (Sorgeloos, 1996; Sun & Fleeger, 1995; Kahan, 1992).

Por otro lado, la conducta natatoria en zigzag de los copépodos seguida por una fase estacionaria, ha sido considerada como muy atractiva para las larvas de cultivo, estimulando su alimentación (Sorgeloos, 1996).

No obstante lo anterior, la utilización de los copépodos en acuicultura es escasa. La obtención de copépodos desde fuentes naturales es cara y poco confiable debido a las fluctuaciones naturales, tanto de la abundancia como de la composición específica, del plancton. Además, al usar plancton natural siempre está presente la posibilidad de introducir organismos dañinos como depredadores o parásitos a los cultivos (Kahan, 1982). Aunque se han mantenido altas densidades de copépodos en condiciones de laboratorio (Rothbard, 1976; Hirata *et al.*, 1979; Kahan, 1979; Uhling, 1984, entre otros; fide Kahan, 1992), el desarrollo industrial y comercial del cultivo de copépodos no se ha hecho aún posible debido a la dificultad de mantener cultivos intensivos a gran escala (Støttrup, 1997).

Se ha demostrado que en condiciones naturales la temperatura y la disponibilidad de alimento son las variables más relevantes en el crecimiento y reproducción de los copépodos planctónicos (Huntley, 1991). Sin embargo, experimentos en cultivos de copépodos han mostrado que a pesar de la presencia de alimentos, el índice de crecimiento disminuye o cesa luego de alcanzarse cierta densidad poblacional (De Viana, 1987).

Puede notarse que, junto a la temperatura y la alimentación aparece una tercera variable de gran relevancia; la densidad de la población. La regulación de la abundancia a través de mecanismos denso dependientes ha sido establecida en una amplia variedad de organismos incluyendo copépodos (Hicks & Coull, 1983). Al parecer, esta variable afecta directa o indirectamente la conducta reproductiva de estos organismos, ya sea disminuyendo su eficiencia alimentaria, debido a interferencias físicas entre individuos, a canibalismo, o por la acumulación de ciertas sustancias químicas en el medio que afectan el metabolismo normal de los copépodos (Walker, 1979). Esto podría explicarse como un mecanismo de la especie para autorregular su población y evitar así la sobreexplotación del medio.

Walker (1979) sugiere que la regulación de la densidad en copépodos es probablemente efectuada por la secreción de feromonas. Él demostró que la fertilidad de las hembras y la viabilidad de los huevos de *Amphiascoides* sp. se ven afectados cuando éste es cultivado en medio condicionado; es decir, en medios donde se mantuvo previamente altas densidades de copépodos, en comparación a tratamientos cultivados en medio fresco. La disminución de la densidad se debió al incremento en el intervalo entre puestas y en la duración del desarrollo embrionario.

Los productos de desechos metabólicos podrían ser también responsables de este mecanismo regulatorio. Según Clarke (1958), la intensidad de algunos procesos metabólicos o del desarrollo pueden ser inhibidos por las concentraciones elevadas de anhídrido carbónico. La presencia de un exceso de amonio induce cambios fisiológicos y genera efectos adversos en el crecimiento y la reproducción (Daoust & Ferguson, 1984; fide Petit, 1990; De Viana, 1987).

Este fenómeno denso dependiente es mucho más evidente cuando consideramos un ambiente aislado y con una capacidad de carga limitada. Las pozas de grandes pleamares son sistemas ecológicos sometidos a perturbaciones esporádicas, ya que su renovación sólo es posible en las grandes pleamares (Alveal, 1970). Durante estos períodos de aislamiento, las condiciones ambientales estimulan el crecimiento poblacional de algas e invertebrados como copépodos, fundamentalmente harpactícidos (Goddard, 1993). Sin embargo, la capacidad de carga de este sistema es muy limitada, por lo que la existencia de mecanismos denso dependientes puede ser muy probable.

Tigriopus angulatus (Fig. 1 y 2) es un harpactícido hemiplactónico con nauplios bentónicos que habita pozas de grandes pleamares distribuidas a lo largo de la costa de Chile continental. Se han reportado registros de la especie desde Iquique hasta Chaitén (Goddard, 1999, com. pers.). Esta especie se encuentra asociada principalmente a *Enteromorpha* sp. y tolera un amplio rango térmico y salino; reportándose su sobrevivencia en pozas a 30° C y salinidades de 82 ppm. (Goddard y Zuñiga, 1995). Lang (1948) en relación a la ecología de *Tigriopus* indica que han sido encontrados vivos en rangos de salinidad desde agua dulce a 195 ppm; temperaturas entre 3,8 y 35,7° C; concentraciones de oxígeno desde 0 a 18,1 mg/l y pH de 5 a 12.

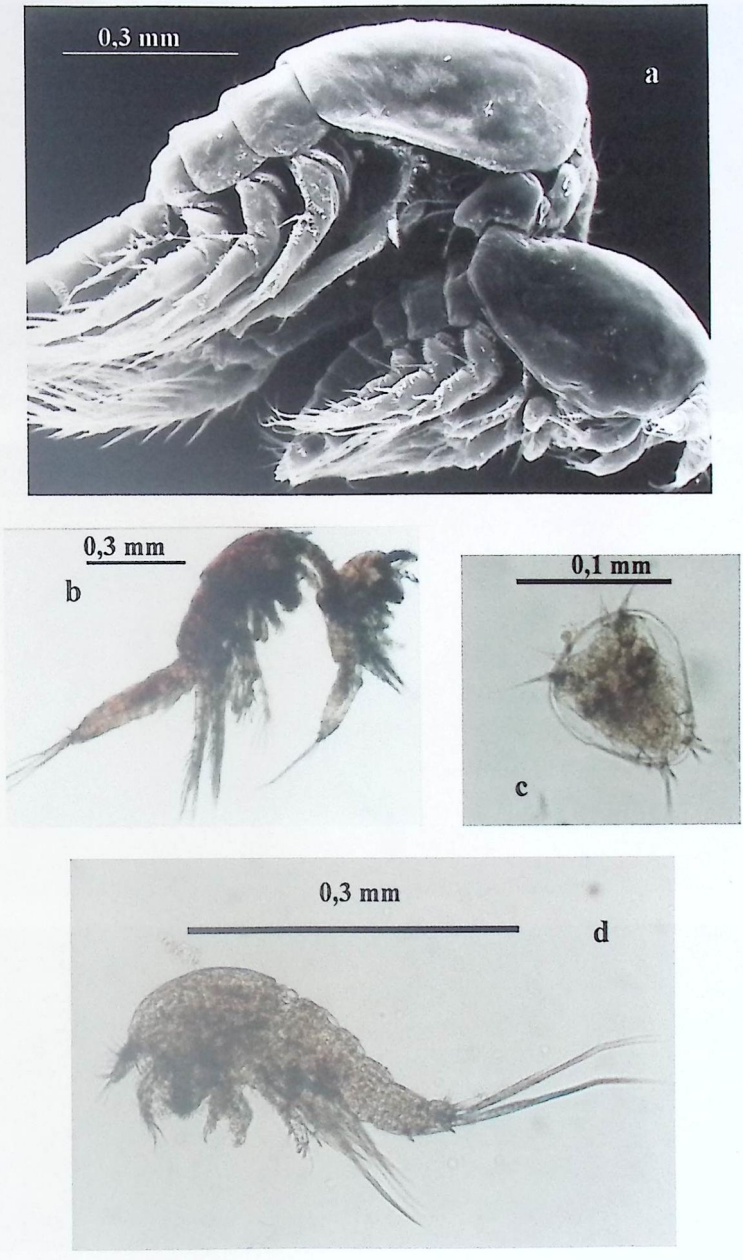


Fig. 1. ***Tigriopus angulatus*** .a: Microfotografía electrónica de un acoplamiento; b: Microfotografía de un acoplamiento; c: Microfotografía de un nauplio IV-V; d: Microfotografía de un copepodito III.

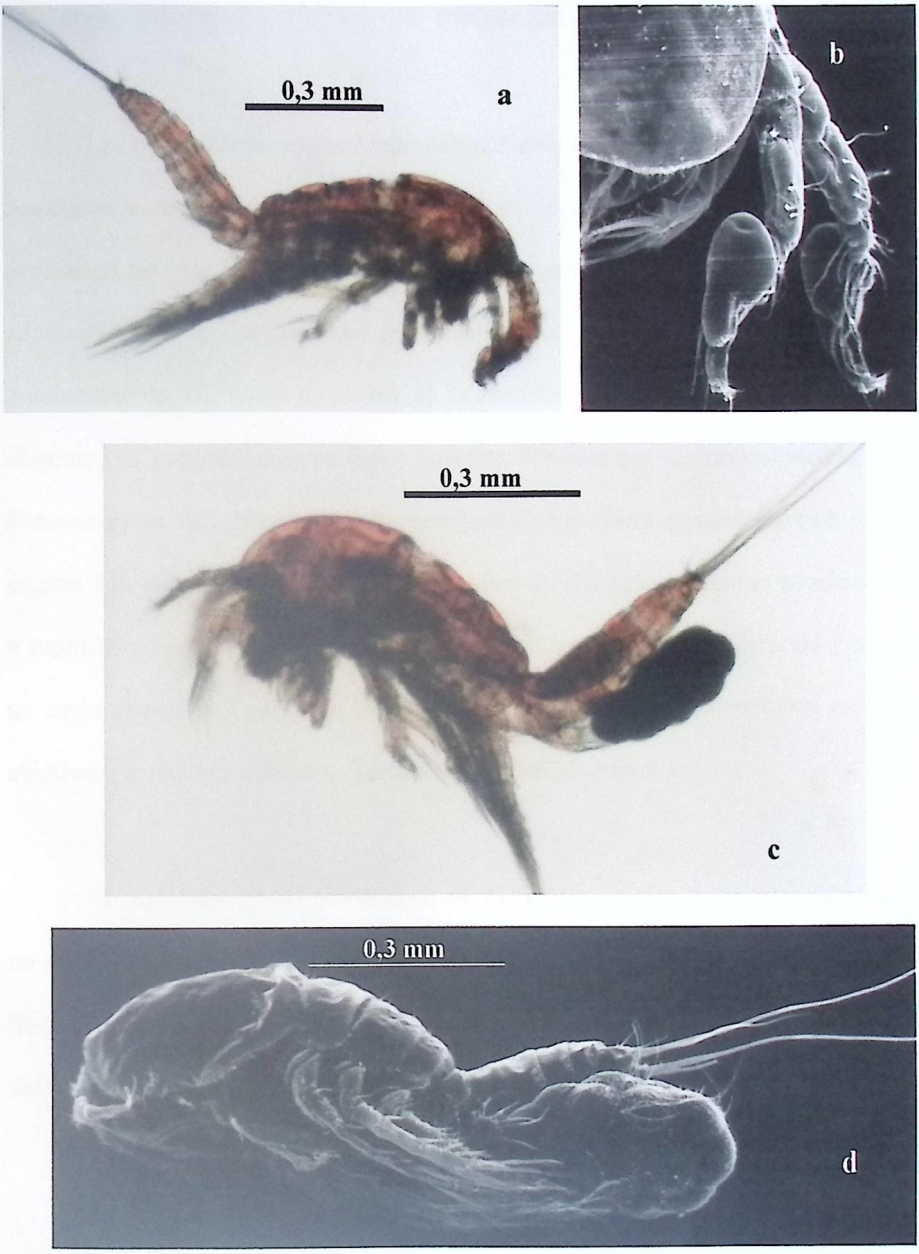


Fig. 2.*Tigriopus angulatus.* a: Microfotografía de un macho; b: microfotografía electrónica de la anténula del macho; c: Microfotografía de una hembra grávida; d: Microfotografía electrónica de una hembra grávida

PROBLEMA

Las pozas intermareales donde habita *Tigriopus angulatus*, son sistemas ecológicos sometidos a perturbaciones físicas esporádicas, ya que la renovación del medio sólo es posible en las grandes pleamares. Durante estos períodos, el sistema se mantiene aislado, comportándose de forma similar a un estanque de cultivos. La diversidad es baja y la dominancia de *Tigriopus angulatus* en la comunidad es muy alta. La disponibilidad de alimento, en general, no es un factor limitante debido a que su principal recurso nutritivo, *Enteromorpha* sp., posee una alta productividad y tolera grandes cambios térmicos y salinos. Las variaciones del número poblacional de *Tigriopus angulatus* se relacionan sólo a reproducción y mortalidad ya que al ser un sistema aislado la inmigración y emigración no están presentes. Incluso, la mortalidad sólo se relaciona a factores intra específicos o abióticos ya que este sistema no presenta depredadores para la especie.

Si bien estas pozas permanecen cierto tiempo aisladas de perturbaciones externas, no pueden ser consideradas como un sistema estable. Cambios en factores abióticos, tanto físicos como químicos, determinan la necesidad de que los organismos que habitan el sistema desarrollen estrategias adaptativas para sobrevivir.

Debido al aumento de la radiación solar, fundamentalmente en los meses cálidos, la temperatura y salinidad del medio comienzan a ascender. Del mismo modo, aumenta la disponibilidad de alimento, ya que se favorece el crecimiento de *Enteromorpha* sp. También la tasa de crecimiento individual y poblacional de la especie se ve incrementada

significativamente por la temperatura. De esta forma, se llega a un punto en donde el sistema se encuentra en condiciones intensivas de funcionamiento hasta la llegada de una marejada, la cual aporta agua al medio, algunas veces con gran violencia. Esto provoca, en primer lugar, el descenso de la salinidad y la temperatura; y debido a la acción mecánica, la disminución de la población de algas y copépodos. Una vez estabilizado el sistema, comienza nuevamente el proceso de crecimiento poblacional hasta la llegada de una nueva marejada. Sin embargo, en los meses de verano donde la intensidad lumínica y la temperatura ambiental son máximas y la presencia de vientos o frentes atmosféricos que generen marejadas disminuye considerablemente, el sistema puede ver sobrepasada su capacidad de carga. Debido a que el colapso del sistema sólo ocurre en condiciones muy extremas de desecación, es que debe haber un mecanismo que regule la tasa reproductiva de la población en función de la densidad poblacional. Por lo expuesto se plantea la siguiente hipótesis.

HIPOTESIS

H_0: La emisión de cierta sustancia química por parte de *Tigriopus angulatus* al medio determina que, en altas densidades de cultivo, baje la tasa reproductiva de la especie.

OBJETIVOS

Objetivo general

Demostrar la existencia de un mecanismo químico que regula la tasa reproductiva de *Tigriopus angulatus* en condiciones de alta densidad poblacional.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto quimioinhibotorio de la densidad poblacional sobre el intervalo entre puestas en *Tigriopus angulatus*.
2. Determinar el efecto quimioinhibitorio de la densidad poblacional sobre la viabilidad de los huevos en *Tigriopus angulatus*.
3. Relacionar la presencia y concentración de ciertas sustancias metabólicas con este fenómeno a través de análisis químico.
4. Determinar el efecto del hacinamiento en la sobrevivencia de los individuos de una población de *Tigriopus angulatus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del material

Se obtuvo especimenes de *Tigriopus angulatus* desde pozas de grandes pleamares ubicada en la localidad de Montemar (32° 57' S, 77°33' O) (Fig. 3) mediante una red de plancton de 50 µm. Los especimenes fueron determinados según la clave dada por Lang (1965) y Bradford (1967) (Anexo 2). Estos ejemplares fueron llevados al Laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad de Valparaíso donde se realizaron los cultivos en ambiente libre de amonio.

Preparación del medio condicionado

Se utilizó agua de mar filtrada a 1µm mediante papel filtro S&S 602 h de 110 mm de diámetro en una bomba autocebante. Esta agua se denominó medio fresco y se utilizó como control en los experimentos. Para producir un medio químicamente condicionado, se mantuvo por lo menos una semana un cierto volumen de cultivo a densidades mayores que 50 ind./ml, en medio fresco, sin renovación de agua, con aireación y alimentado con talos de *Enteromorpha* sp. Posteriormente se procedió a filtrar el agua mediante una red de 45 µm y luego con un filtro millipore de 0,2 µm.

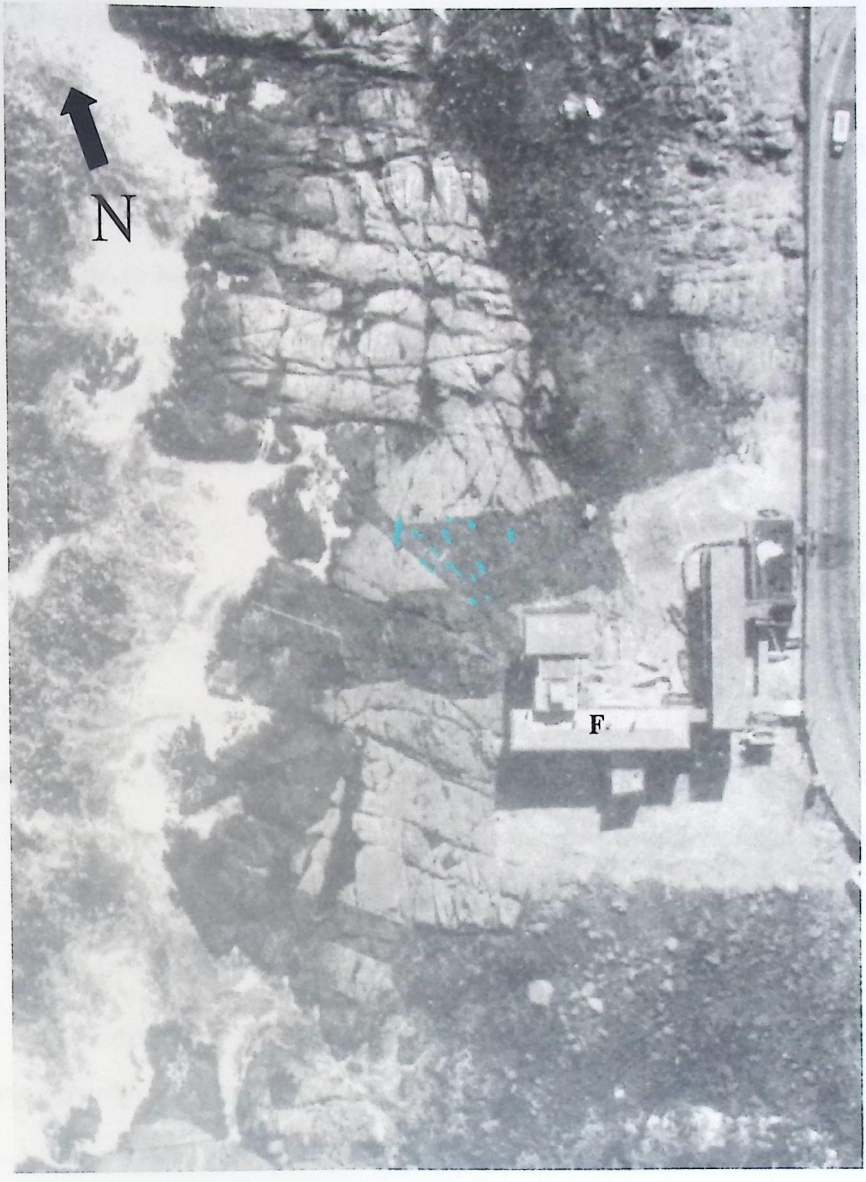


Fig. 3. Fotografía aérea del área de toma de muestras. Se destacan las pozas de grandes pleamares utilizadas. F: Facultad de Ciencias del Mar, Universidad de Valparaíso.

Pozas de marea

Según la clasificación que Alveal (1970) realiza para las pozas de marea de la localidad de Montemar, define la poza de grandes pleamares como aquellas en que su renovación sólo es posible en las grandes pleamares. Debido a que este ambiente presenta períodos aislado del flujo de mareas, donde experimenta desecación, irradiación solar y acción biológica, sus características físico-químicas pueden variar. Es por ello que definiremos dos condiciones diferentes para una poza de grandes pleamares:

- Pozas renovadas: Son aquellas que recientemente han recibido aporte del flujo de marea por lo que la composición físico-química del medio es similar a la del cuerpo de agua intermareal asociado.
- Pozas no renovadas: Son aquellas que debido a su aislamiento con el flujo de marea presentan cambios en la composición físico-química. Esto es apreciable a simple vista por el bajo nivel del agua y la presencia de acumulaciones de sal en los bordes, temperaturas sensiblemente cálidas e incluso aromas sulfurados.

Efecto del medio sobre la fertilidad de las hembras

Se separaron hembras grávidas desde pozas renovadas y se dispusieron individualmente en 30 cámaras de plástico translúcido en medio condicionado. Los especimenes fueron mantenidos a 20° C e iluminación permanente de 50-60 $\mu mol\ m^2\ s^{-1}$,

suministrándoles talos frescos de *Enteromorpha* sp. como alimento. Como control se dispuso otras 30 réplicas con medio fresco en iguales condiciones experimentales. Se realizaron observaciones diarias bajo lupa, durante 10 días, a fin de determinar si habían liberado o producido sacos ovígeros, y así estimar fertilidad, producción de ovisacos, intervalo entre puestas y duración del desarrollo embrionario.

Efecto del medio sobre la viabilidad de los huevos.

Se dispusieron 30 hembras grávidas, provenientes de pozas renovadas, en una placa de Petri con agua de mar y fueron narcotizadas con hojas de tabaco. Luego se procedió a retirar el saco ovígero de las hembras con una aguja de disección bajo lupa. Con una pipeta se dispusieron los sacos individualmente en cámaras de cultivo con agua de pozas no renovadas, a 20° C e iluminación permanente. Del mismo modo, se dispusieron controles con medio fresco. Se realizaron observaciones diarias a fin de determinar el tiempo de eclosión de los huevos en ambos tratamientos

Al igual que el experimento anterior, se cultivaron 30 sacos ovígeros extraídos de hembras grávidas provenientes de pozas no renovadas en medio fresco a 20° C e iluminación permanente. A modo de control se utilizó sacos ovígeros extraídos de hembras grávidas provenientes de pozas renovadas y se hicieron eclosionar en medio fresco. Se midieron los tiempos y éxitos de eclosión para ambos tratamientos.

Efecto del medio sobre la abundancia poblacional

Este experimento consistió en cultivar en 24 cámaras de 250 ml poblaciones de copépodos a densidades mayores a 1 ind./ml. El cultivo se inició con medio fresco, oxigenado, sin recambio del medio, a temperatura ambiente e iluminación natural. Como alimento se emplearon talos frescos de *Enteromorpha* sp. A modo de control se mantuvieron igual número de cultivos en iguales condiciones, pero con recambio de 2/3 del medio por medio fresco cada 7 días.

Semanalmente también se realizó la toma de muestras, seleccionando 3 réplicas del cultivo sin recambio y otras tres del cultivo con recambio. Los animales fueron colectados empleando una red de 45 μm y fijados en formalina al 10%, para luego ser contados bajo lupa de campo oscuro en el laboratorio de Hidrobiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Por su parte, con el medio de cultivo se realizaron los análisis químicos detallados a continuación.

Análisis químico del medio de cultivo

Con las muestras de agua provenientes del cultivo poblacional se hicieron diversos tipos de análisis: Cromatografía líquida de alta resolución, para detectar presencia de feromonas, determinación de oxígeno, pH y análisis de amonio para determinar el efecto de los desechos metabólicos en la abundancia poblacional.

En primer término se midió el contenido de oxígeno con un oxígenómetro YSI modelo 57, antes de retirar los organismos; posterior a esto, se determinó el pH con un "peachímetro" Orion modelo 210 A. El volumen total del medio fue separado en dos partes. Una mitad del medio fue filtrada con un filtro de 0,2 µm, luego congelada y llevada al Laboratorio de Toxicología Humana y Ambiental de la Universidad de Playa Ancha para realizar la cromatografía líquida. Se Utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución Shimadsu LC-10AD con un detector de arreglo de diodos (SPD- M10 Avp). Las muestras se eluyeron en un gradiente de concentración de solventes desde 100% metanol hasta 100% agua integrando longitudes de onda desde 220 hasta 600nm durante 30 min.

La otra mitad de cada muestra fue fijada con fenol y llevada en frascos color ámbar al Laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad de Valparaíso para la determinación de amonio. El método de análisis químico utilizado describe Prado (1995) y consiste esencialmente en la cuantificación clororimétrica del azul de indofenol a partir de hipoclorito en presencia de amoniaco (Fig. 4).

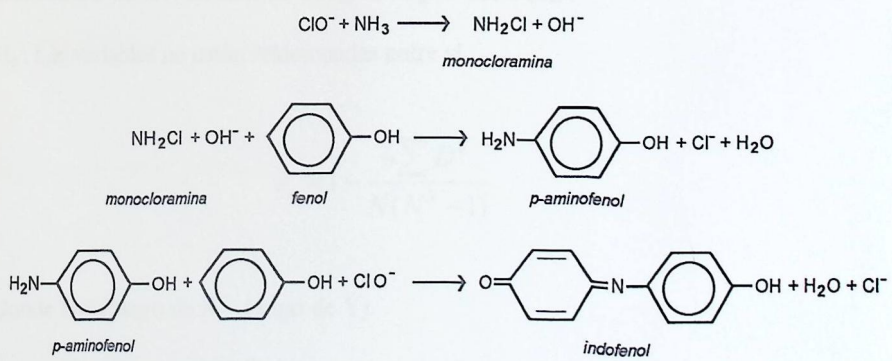


Fig. 4. Ecuación de reacción del amoniaco para formar azul de indofenol.

Análisis de los resultados

Los cálculos estadísticos se realizaron con el software STATISTICA 5.1

Prueba *U* de Mann Whitney

Se sometió a prueba la hipótesis:

H_0: Ambos tratamientos presentan la misma distribución

$$U_c = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1+1)}{2} - W_c \qquad U_f = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2+1)}{2} - W_f$$

donde W_c y W_f son las sumas de los rangos para ambos tratamientos.

Para determinar la relación entre las variaciones de la abundancia poblacional y las variables químicas se determinaron los coeficientes de correlación de rango de Spearman y de Kendall.

Coeficiente de correlación de rango de Spearman (σ_s):

H_0 : Las variables no están relacionadas entre sí

$$r_s = 1 - \frac{6\sum D^2}{N(N^2-1)}$$

Donde D = (rango de X – rango de Y)

N = Número de individuos

Región de rechazo:

Rechazar H_0 si:

$$\sum_{i=1}^{n} R_i S_i \geq x \quad o \quad \leq x$$

Coeficiente de correlación de Rango de Kendall (τ):

H_0 : Las variables no están relacionadas entre sí.

$$\tau = \frac{S}{\frac{1}{2} \times N(N-1)}$$

Donde N = número de objetos ordenados según x e y

S = suma de los pares concordantes o discordantes

Región de rechazo:

Para N≥8, la distribución muestral de τ es prácticamente imposible de distinguir de la distribución normal, por lo tanto para valores mayores que 7, se puede usar la tabla de la curva normal.

Si $p \leq \alpha$, H_0 puede rechazarse.

RESULTADOS

Efecto del medio sobre la fertilidad de las hembras

La Fig. 5 muestra las diferencias en la fertilidad de hembras grávidas dispuestas en medio condicionado y en medio fresco o control . El 87% de las hembras cultivadas en medio fresco produjo uno o más ovisacos luego de liberar el que portaba al inicio del experimento. En el caso del medio condicionado sólo un 25% de las hembras se mantuvieron reproductivas produciendo al menos un nuevo saco. En ambos tratamientos la mortalidad fue del 5%.

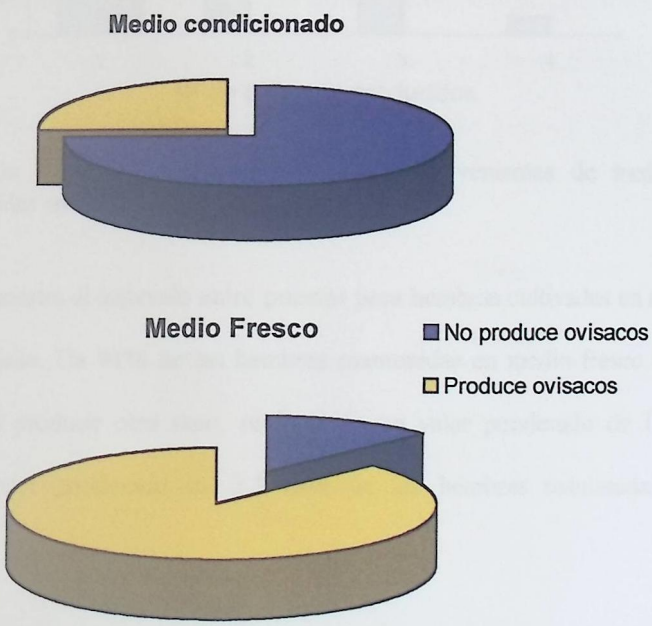


Fig. 5. Oviposición de hembras provenientes de medio fresco cultivadas en medio fresco y condicionado.

Considerando sólo las hembras que continuaron emitiendo ovisacos, la totalidad de éstas dispuestas en medio condicionado produjo un saco dentro de los 12 días que duró el experimento (Fig. 6). A diferencia de las hembras que se mantuvieron fértiles en medio fresco donde hubo diferentes productividades: un 43% de ellas produjo un ovisaco, un 28% dos ovisacos, un 20% tres ovisacos y un 9% cuatro; obteniéndose una productividad de 0,23 sacos/(hembra x día). Para el caso del medio condicionado la productividad fue 0,02 sacos/(hembra x día).

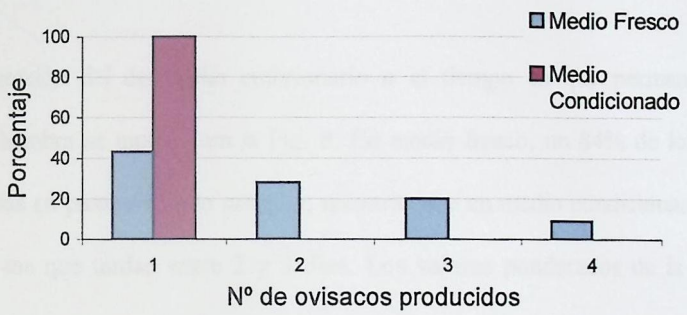


Fig. 6. Producción de sacos ovígeros de hembras provenientes de medio fresco y mantenidas en control y medio condicionado.

La Fig. 7 muestra el intervalo entre puestas para hembras cultivadas en medio fresco y medio condicionado. Un 91% de las hembras mantenidas en medio fresco tardan entre uno y dos días en producir otro saco, registrando un valor ponderado de 1,46 días; en contraste a un valor ponderado de 3,8 días de las hembras mantenidas en medio condicionado.

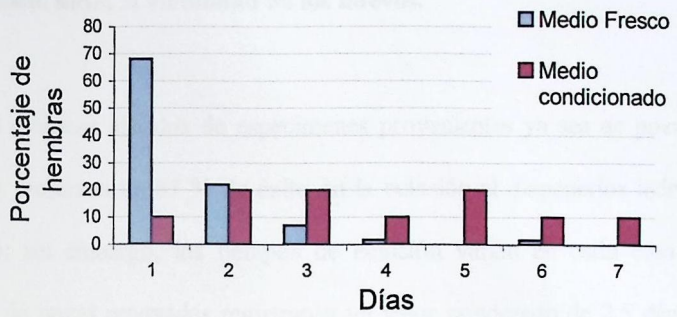


Fig. 7. Intervalo entre puestas de hembras grávidas provenientes de medio fresco y mantenidas en medio fresco y condicionado.

La duración del desarrollo embrionario o el tiempo en que permanece unido el ovisaco a la hembra se muestra en la Fig. 8. En medio fresco, un 84% de los casos tarda entre 2 y 3 días en pasar a estado naupliar, mientras que en medio condicionado es un 87% de los casos los que tardan entre 2 y 3 días. Los valores ponderados de la duración del desarrollo embrionario son similares, con 2,7 días en medio fresco y 2,4 días en medio condicionado.

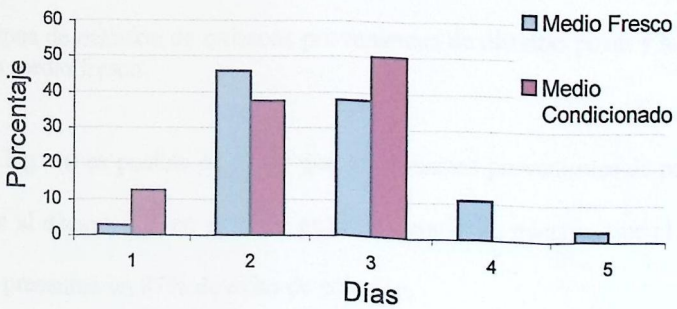


Fig. 8. Duración del desarrollo embrionario de hembras grávidas provenientes de medio fresco y mantenidas en medio fresco y condicionado.

Efecto del medio sobre la viabilidad de los huevos.

Los ovisacos aislados de especimenes provenientes ya sea de pozas renovadas o no renovadas presentan un 87 % de éxito en la eclosión al disponerlos individualmente en medio fresco; sin embargo, los tiempos de eclosión varían en cada caso (Fig. 9). Los provenientes de pozas renovadas registraron un valor ponderado de 2,5 días, mientras que los provenientes de pozas no renovadas presentaron un tiempo de eclosión de 2,1 días.

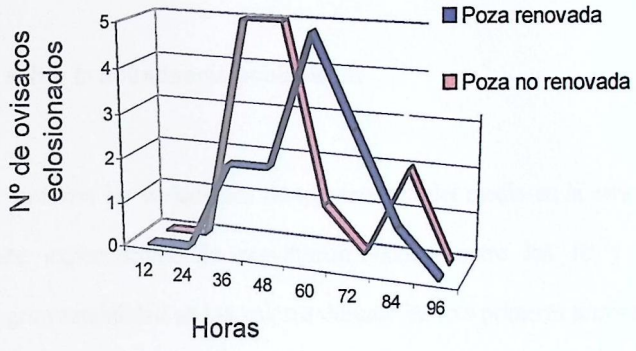


Fig. 9. Tiempos de eclosión de ovisacos provenientes de distintas pozas y luego dispuestos en medio fresco.

En la Fig. 10 es posible observar que los ovisacos provenientes de pozas renovadas no eclosionan al disponerlos en agua de poza no renovada, mientras que al disponerlos en medio fresco presentan un 87% de éxito de eclosión.

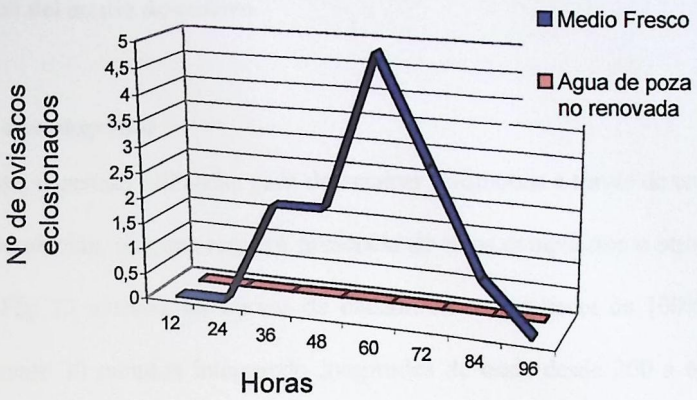


Fig. 10. Éxitos de eclosión de ovisacos provenientes de pozas renovadas y luego dispuestos en medios fresco y agua de poza no renovada.

Efecto del medio sobre la abundancia poblacional

La Fig. 11 muestra las variaciones de temperatura del medio en la serie de cultivos iniciados para este experimento. Se registraron valores entre los 16 y los 20° C, observándose una gran estabilidad en los valores durante las tres primeras semanas.

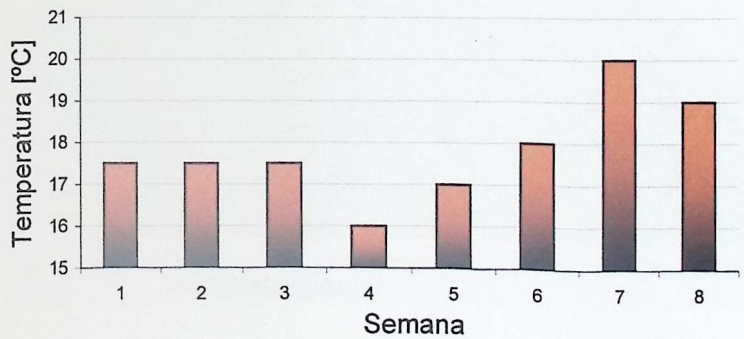


Fig. 11. Variaciones de temperatura del medio durante el experimento poblacional

Estudio químico del medio de cultivo

Análisis cromatográfico

De las seis muestran utilizadas para determinar feromonas a través de cromatografía liquida de alta resolución, ninguna registró presencia de estos compuestos u otro compuesto aromático. La Fig. 12 muestra las curvas de elusión en un gradiente de 100% metanol a 100% agua durante 30 minutos integrando longitudes de onda desde 200 a 600 nm. Allí sólo es posible observar el peak inicial del solvente, luego del cual no se observan otras lecturas.

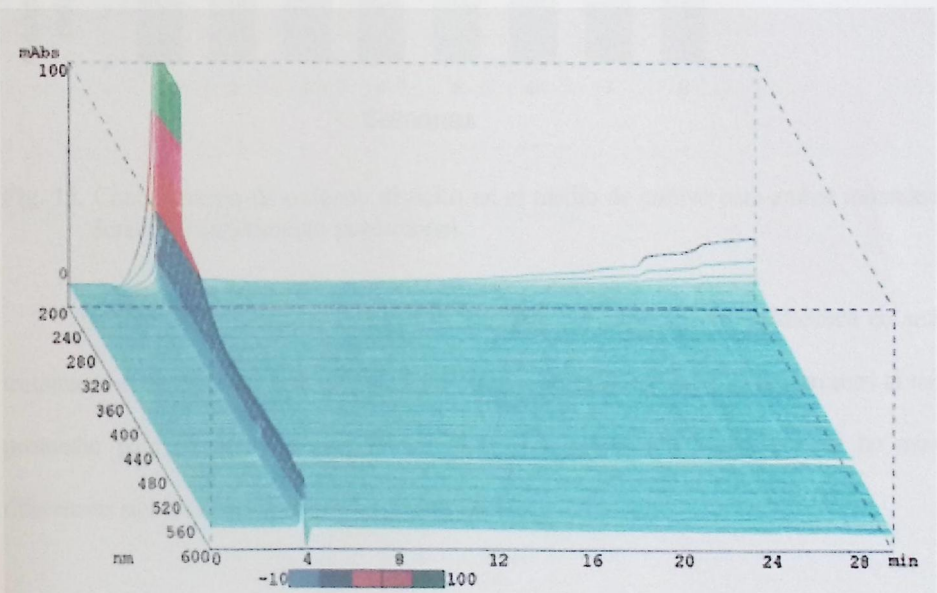


Fig. 12. Cromatografía líquida de alta resolución realizada al medio de cultivo.

Análisis de los productos metabólicos

La Fig. 13 muestra las variaciones de oxígeno disuelto en el medio de cultivo para ambos tratamientos. Los valores fluctuaron entre un máximo ponderado de 8 ml/l (semana 4) y un mínimo de 3,8 ml/l (semana 6), ambos observados en los cultivos sin recambio. La prueba *U* de Mann-Whitney determinó que no existen diferencias significativas en la distribución de los datos de ambos tratamientos.

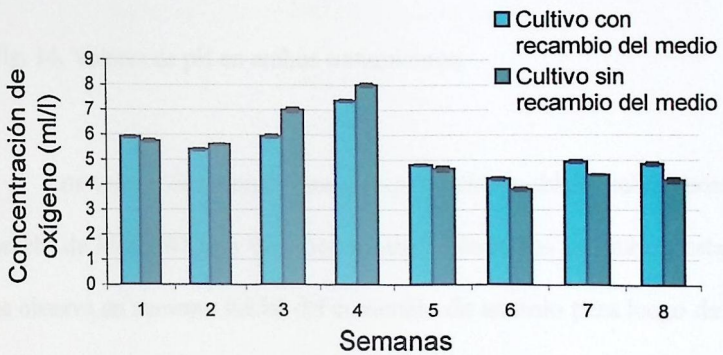


Fig. 13. Concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo para ambos tratamientos durante el experimento poblacional.

La Fig. 14 muestra los valores de pH para el experimento poblacional en ambos tratamientos. Se observa que el medio de cultivo se mantuvo en valores cercanos al rango promedio para el agua de mar (7,5 - 8,4). La prueba de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos.

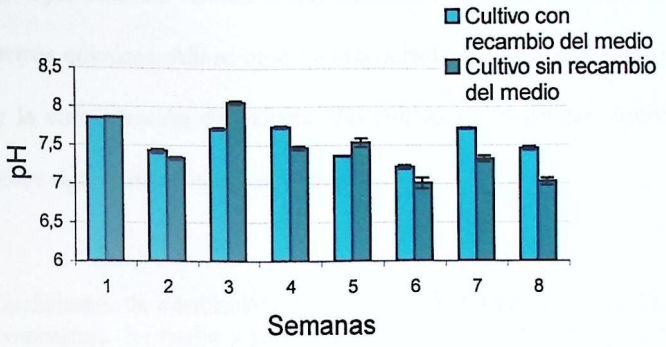


Fig. 14. Valores de pH en ambos tratamientos.

Los valores de amonio para el experimento poblacional se muestran en la Fig. 15. La prueba de Mann-Whitney tampoco mostró diferencias en ambos tratamientos. En el gráfico se observa un aumento inicial del contenido de amonio para luego de la semana 2 comenzar a descender. También se observa otra inflexión positiva en la semana 5 en los cultivos sin recambio y en la semana 6 en los cultivos con recambio.

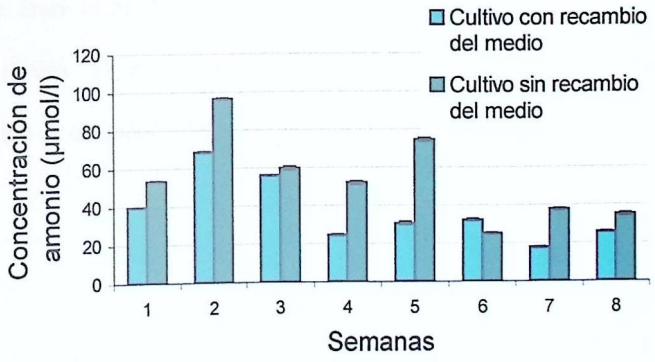


Fig. 15. Valores de concentración de amonio disuelto en el medio de cultivo.

La Tabla 1 presenta los valores obtenidos al correlacionar la temperatura de cultivo con los parámetros químicos. Allí se observa una correlación inversa y significativa entre la temperatura y la concentración de oxígeno del cultivo sin recambio. Ambos estadísticos mostraron valores significativos entre esas variables.

TABLA 1. Coeficientes de correlación de rangos de Spearman (ρ) y de Kendall (τ) entre temperatura del medio y parámetros químicos (en negrita valores significativos según software Statistica 5.1; $\alpha = 0,05$).

		[Oxígeno]		pH		[Amonio]	
		ρ	τ	ρ	τ	ρ	τ
Temp	Cultivo con recambio	-0,46	-0,34	-0,12	-0,04	-0,21	-0,18
°C	Cultivo sin recambio	-0,73	**-0.50**	-0,61	-0,34	-0,58	-0,34

La Tabla 2 muestra los valores obtenidos al correlacionar los parámetros químicos entre sí en cultivos con recambio del medio. Es posible observar una correlación directa y significativa entre el pH y la concentración de oxígeno. Por su parte, en los cultivos sin recambio (Tabla 3) se encontraron correlaciones significativas entre el pH y la concentración de oxígeno; y entre pH y la concentración de amonio.

TABLA 2. Coeficientes de correlación de rangos de Spearman (ρ) y Kendall (τ) entre parámetros químicos en cultivo con recambio del medio (en negrita valores significativos según software Statistica 5.1; $\alpha = 0,05$).

	[Oxígeno]		pH		[Amonio]	
	ρ	τ	ρ	τ	ρ	τ
[Oxígeno]			**0.79**	**0.64**	-0.12	0.00
PH					-0.24	-0.21
[Amonio]						

TABLA 3. Coeficientes de correlación de rangos de Spearman (ρ) y Kendall (τ) entre parámetros químicos en cultivos sin recambio del medio (en negrita valores significativos según software Statistica 5.1; $\alpha = 0,05$).

	[Oxígeno]		pH		[Amonio]	
	ρ	τ	ρ	τ	ρ	τ
[Oxígeno]			**0.81**	**0.71**	0.57	0.43
PH					**0.69**	**0.57**
[Amonio]						

Estudio poblacional

La Fig. 16 presenta las variaciones de abundancia de los nauplios de *Tigriopus angulatus* cultivados con y sin recambio del medio. La prueba *U* de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas. En los cultivos con recambio se observa que durante las dos primeras semanas la producción de nauplios es baja. A partir de la semana 3 los valores de abundancia aumentan para luego volver a descender en las dos últimas semanas del experimento. En los cultivos sin recambio ocurre algo similar sólo que los valores de mayor productividad se limitan a la semana 4 y 5.

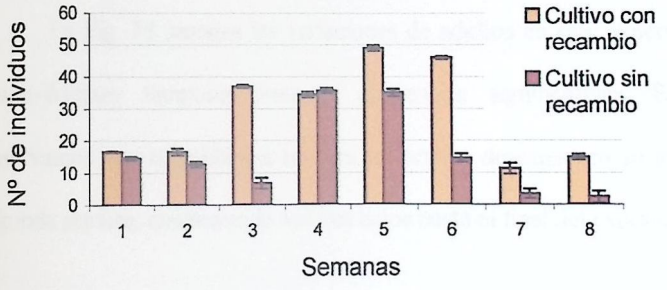


Fig. 16. Variaciones en la abundancia de nauplios para ambos tratamientos.

La Fig. 17 muestra las variaciones de abundancia de los copepoditos en el experimento poblacional. La prueba *U* de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas. En ambos tratamientos se observa una población inicial numerosa que comienza a descender progresivamente hasta experimentar un aumento en la abundancia en la semana 6 en los cultivos con recambio y en la semana 5 en los sin recambio del medio.

Posterior a este peak, ambos tratamientos registran valores bajos hasta el final del experimento.

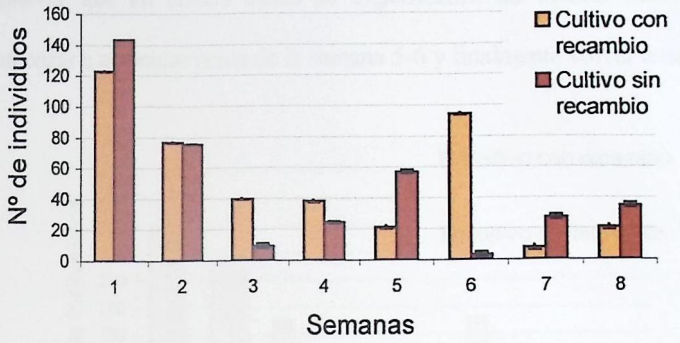


Fig. 17. Variaciones en la abundancia de copepoditos en ambos tratamientos.

La Fig. 18 muestra las variaciones de adultos en este experimento. La prueba *U* de Mann-Whitney tampoco presentó diferencias significativas. En ambos tratamientos observamos que la población registra un brusco descenso en su abundancia a partir de la segunda semana, manteniendo valores bajos hasta el final del experimento.

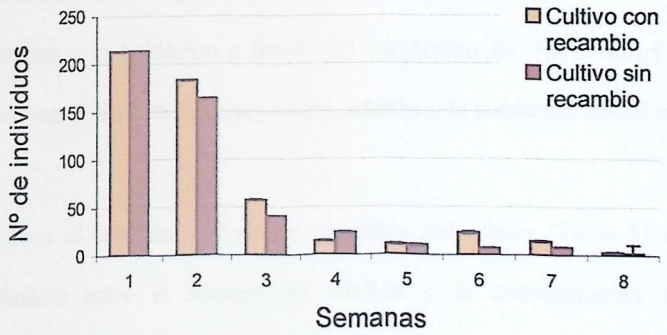


Fig. 18. Variaciones de la abundancia de adultos en ambos tratamientos.

La Fig. 19 compara las variaciones poblacionales totales para ambos tratamientos. La prueba *U* de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas. Allí es posible observar que en ambos casos se experimenta un brusco descenso inicial para luego comenzar a aumentar cerca de la semana 5-6 y finalmente volver a descender.

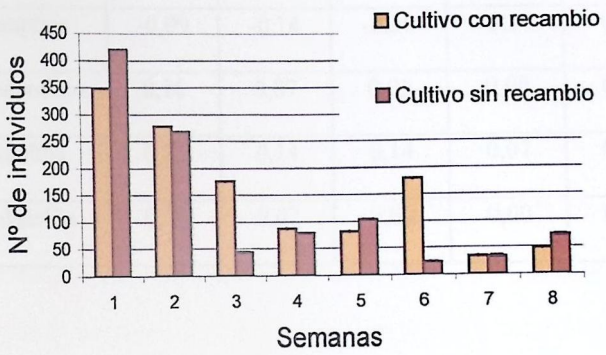


Fig. 19. Variaciones poblacionales para ambos tratamientos.

La Tabla 4 muestra los valores obtenidos al correlacionar los parámetros químicos con las clases etarias y el total de la población en cultivos con recambio del medio. Observamos valores significativos entre la concentración de amonio con la abundancia de los adultos y la población a través del estadístico de Spearman; y entre el contenido de amonio con el número de copepoditos, adultos y la población con el estadístico de Kendall.

Para el caso del cultivo sin recambio del medio (Tabla 5) se observa correlación significativa entre el número de adultos y la concentración de amonio, pH y la concentración de oxígeno, así como la concentración de amonio con la abundancia poblacional a través de ambos estadísticos.

Tabla 4. Coeficientes de correlación de rangos Spearman (ρ) y Kendall (τ) entre abundancia, por clases etarias, y parámetros químicos de cultivo con recambio del medio. En negrita los valores significativos según software Statistica 5.1 ($\alpha = 0,05$).

	[Oxígeno]		pH		[Amonio]	
	ρ	T	ρ	τ	ρ	τ
Nauplios	-0,09	-0,14	-0,50	-0,38	0,28	0,29
Copepoditos	0,16	0,07	0,05	0,00	0,62	**0,50**
Adultos	0,21	0,14	0,14	0,07	**0,76**	**0,57**
Población	0,23	0,07	0,05	0,00	**0.81**	**0,64**

Tabla 5. Coeficientes de correlación de rangos de Spearman (ρ) y Kendall (τ) entre abundancia, por clases etarias, y parámetros químicos de cultivo sin recambio del medio. En negrita los valores significativos según software Statistica 5.1 ($\alpha = 0,05$).

	[Oxígeno]		pH		[Amonio]	
	ρ	τ	ρ	τ	ρ	τ
Nauplios	0,13	0,11	-0,02	-0,03	-0,07	-0,03
Copepoditos	0,14	0,21	0,29	0,21	0,55	0,36
Adultos	**0,71**	**0,50**	**0,71**	**0,50**	**0,69**	**0,50**
Población	0,48	0,43	0,52	0,43	**0.69**	**0,57**

En la Fig. 20 se comparan gráficamente las variaciones del nivel de amonio con las diferentes clases etarias en el cultivo con recambio. Se observa la coincidencia entre el descenso inicial del número de los copepoditos y los adultos con el aumento de la concentración de amonio. La disminución posterior del contenido de amonio también se ve reflejada con una disminución en la abundancia de los estados avanzados de desarrollo. Del mismo modo es posible observar cierta coincidencia entre las variaciones del nivel de amonio en la semana 6 y las fluctuaciones en la abundancia de copepoditos. Las variaciones del número de nauplios no se ven tan claramente representadas. En el caso de los cultivos sin recambio del medio (Fig. 21) también es posible observar gráficamente la correspondencia entre las variaciones de amonio y las fluctuaciones en la abundancia poblacional de copepoditos y adultos inicialmente y de los copepoditos en la semana 5.

Por otro lado, los valores significativos de la correlación entre los adultos y el oxígeno encontrados en los cultivos con recambio, no son tan claramente observados en forma gráfica (Fig. 22). Se aprecia que la disminución inicial de la población corresponde a valores muy estables en el contenido de oxígeno y que el aumento en los valores de oxígeno de la semana 4 no coincide con cambios importantes de la población.

En el caso del pH con el número de adultos en ese mismo tratamiento tampoco se observa gráficamente una correspondencia entre sus variaciones (Fig. 23). La abundancia de los adultos va disminuyendo sostenidamente hasta la última semana donde se observaron más adultos en cultivos que en las semanas anteriores. El pH en cambio presenta variaciones oscilantes durante todo el experimento registrando una tendencia a la disminución hacia el final del mismo.

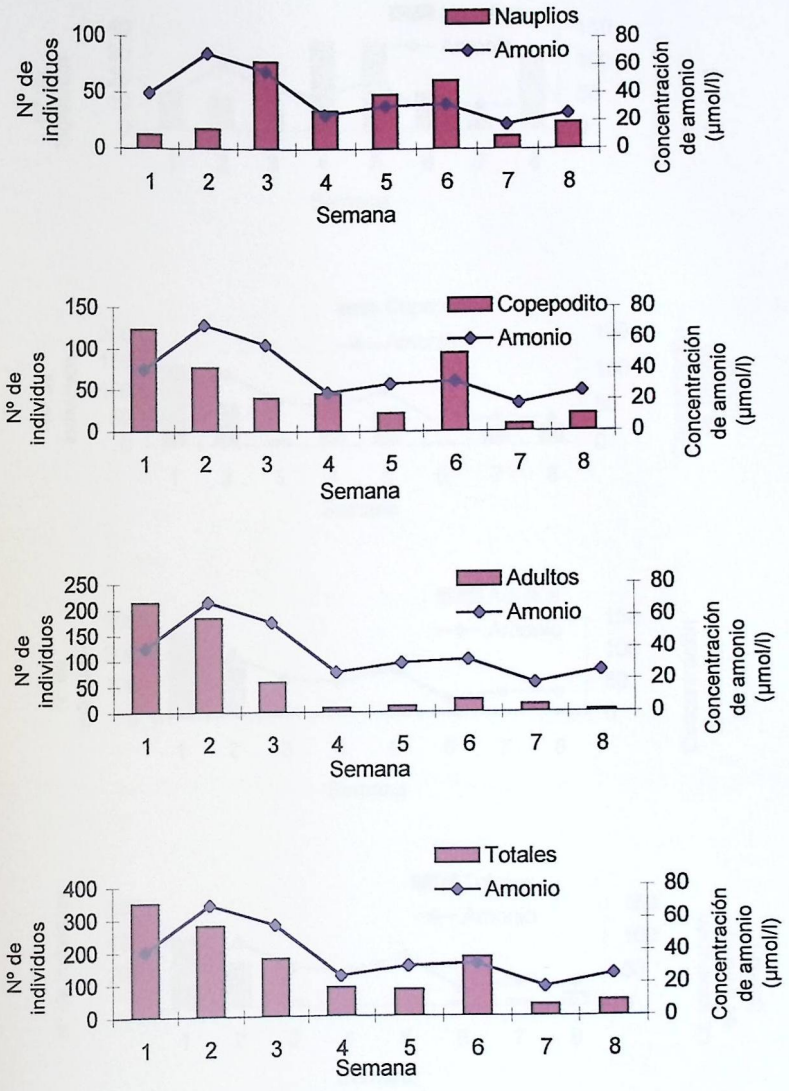


Fig. 20. Variaciones del contenido de amonio comparadas con la abundancia de las diferentes clases etarias en cultivo con recambio del medio.

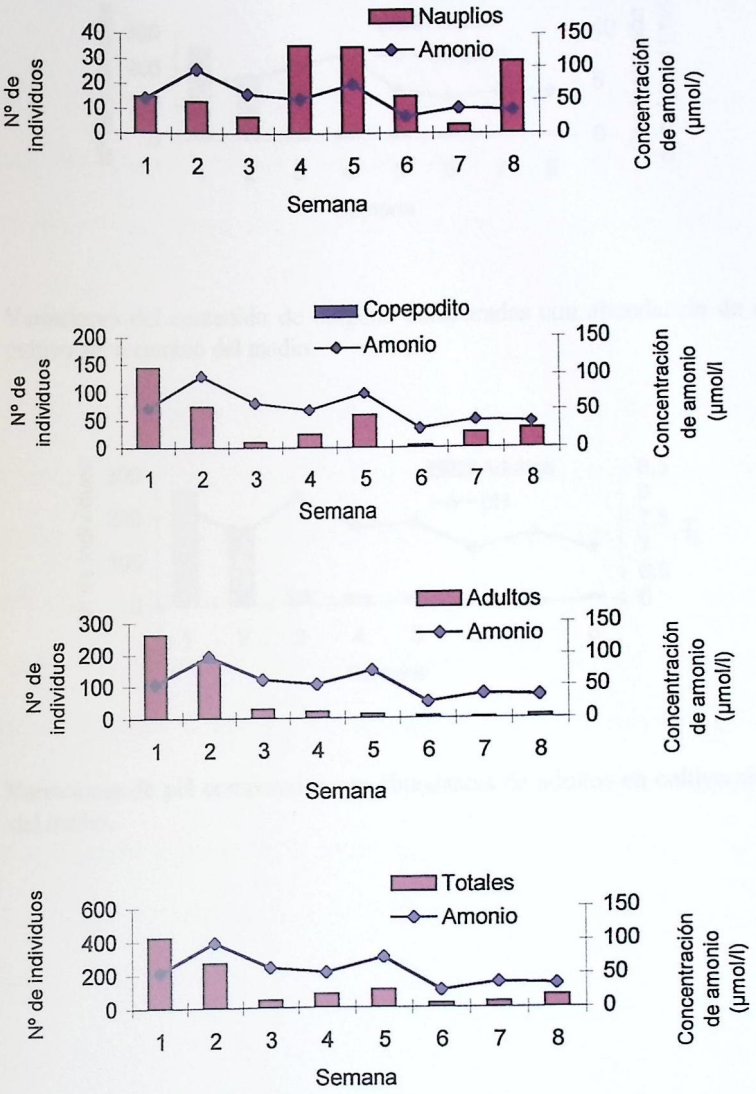


Fig. 21. Variaciones del contenido de amonio comparadas con la abundancia de las diferentes clases etarias en cultivo sin recambio del medio.

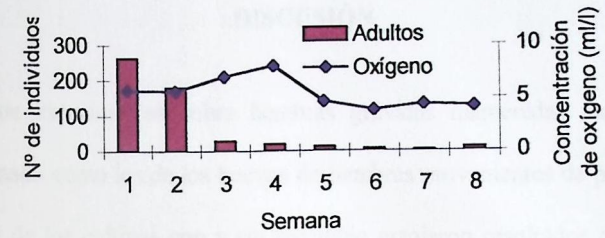


Fig. 22. Variaciones del contenido de oxígeno comparadas con abundancia de adultos en cultivo sin recambio del medio.

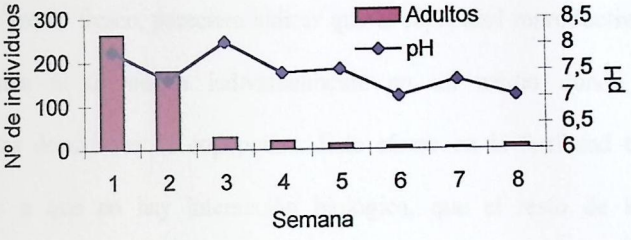


Fig. 23. Variaciones de pH comparadas con abundancia de adultos en cultivo sin recambio del medio.

DISCUSIÓN

Tanto los experimentos sobre hembras grávidas mantenidas individualmente en medio condicionado como los de los huevos de hembras provenientes de pozas renovadas y no renovadas y de los cultivos con y sin recambio arrojaron resultados coherentes con la hipótesis planteada.

El efecto del medio condicionado sobre la fertilidad de hembras grávidas provenientes de medio fresco, pareciera indicar que la capacidad reproductiva de la hembra se ve disminuida al disponerla individualmente en un medio donde se cultivaron previamente altas densidades de copépodos. Este efecto en la fertilidad tendría que ser químico debido a que no hay interacción biológica, que el resto de las condiciones experimentales no fueron limitantes y eran las mismas en ambos tratamientos. Fava y Crotti (1979) sugieren que un compuesto químico complejo puede determinar, directa o indirectamente, una modificación en el estado fisiológico del harpactícido *Tisbe clodiensis* , que conlleva a una disminución de la fertilidad causado por el aumento de la densidad poblacional.

En las hembras dispuestas en medio condicionado que se mantuvieron fértiles, su productividad también se vio disminuida significativamente ya que sólo produjeron un ovisaco en los doce días del experimento mientras que en el medio fresco se produjeron hasta cuatro ovisacos durante el mismo período. Esta baja en la productividad se ve determinada por el aumento del intervalo entre puestas ya que no se observaron diferencias

significativas en la duración del desarrollo embrionario. El intervalo entre puestas para la especie, en medio fresco y esas condiciones experimentales, sería de entre 1 a 2 días, ya que entre estos dos valores reúnen más del 90 % de los casos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Goddard (1993) para la especie. Huizinga (1971) también determinó el intervalo entre puestas de *Tigriopus californicus* en 2 a 3 días. Para el caso del medio condicionado, este valor se ve alterado, incrementando los intervalos entre puestas de 1,5 a 3,8 días. Este aumento en el intervalo entre puestas se señala en los trabajos de Walker en 1979, donde hembras grávidas de *Amphiascoides* sp. cultivadas en medio fresco, registraron un promedio de 2,4 días, mientras que en el medio condicionado llegaron a 3,4 días.

Los resultados de la duración del desarrollo embrionario en medio fresco fueron de 2,7 días con más del 80 % de los casos entre 2 y 3 días. Este resultado es sustentado por Goddard (1993) que estimó la duración del desarrollo embrionario de la especie en 2,5 días a salinidades de 35 ppm y a temperaturas entre 20 y 25° C. Kahan *et al.* (1988) también describió intervalos de dos a tres días entre la emisión del saco y la eclosión de los huevos en *Tigriopus japonicus*. Al analizar las diferencias entre la duración del desarrollo embrionario en medio fresco y condicionado se puede observar que los resultados son similares ya que el valor para el medio condicionado es sólo un 10% menor. Así, se puede sugerir que este agente químico hipotético no afecta la duración del desarrollo embrionario.

No obstante lo anterior, los huevos de organismos de pozas no renovadas eclosionan primero que los provenientes de pozas renovadas al disponerlos en medio fresco. Al comparar estos resultados, se supone que en las pozas de pleamar, existiría algún factor que afecta la duración del desarrollo embrionario que no se observa en los experimentos con medio condicionado. Goddard (1993) encontró una correlación significativa entre la duración del desarrollo embrionario y los cambios de salinidad. Debido a que en el medio condicionado no se ha alterado la salinidad en forma importante y que las pozas de grandes pleamares están sujetas a cambio salinos relevantes, esta podría ser la explicación. La disminución en el tiempo de eclosión puede observarse para la especie en los trabajos de Goddard donde registró una reducción del periodo de desarrollo embrionario al trasladar hembras ovígeras del ambiente natural a medios de menor salinidad debido a que el shock hiposmótico resulta estimulante para la eclosión de los nauplios.

El cambio de salinidad también explicaría el efecto de retención de los huevos provenientes de pozas renovadas, al cultivarlos en agua de pozas no renovadas. Goddard y Zuñiga (1995) también determinó que el traslado de hembras ovígeras de terreno a medio de cultivo de mayor salinidad produce la retención de los huevos.

Esta hipótesis de shock salino tendría una explicación ecológica, ya que la retención de los ovisacos durante períodos de aislamiento en las pozas de pleamar sujetas a altas salinidades sería una adaptación de la especie en espera de condiciones más apropiadas para el desarrollo. Con la llegada de agua fresca producto de una marejada, y la consecuente baja de la salinidad, se induciría la eclosión.

La búsqueda de un agente químico también incluyó feromonas; éstas, al ser compuestos aromáticos de bajo peso molecular, son muy volátiles, y son secretadas en muy baja concentración por lo que el hecho de no haberlas registrado en las muestras analizadas, no necesariamente significa que dicha sustancia no haya estado presente. Suponiendo que la sustancia en cuestión existiese; es posible que debido a su baja concentración no pudo ser detectada por la técnica utilizada; o tal vez pudo haberse volatilizado de la muestra antes de que esta fuese congelada.

Se han aislado feromonas sexuales en algas (Müller, 1986), crustáceos (Kittredge, *et al.* 1971) y otros organismos marinos. Müller (1986) aisló e identificó lamoxireno; una feromona sexual producida por el óvulo de macroalgas pardas que induce la producción de espermatozoides en plantas masculinas cercanas. El lamoxireno es un hidrocarburo monocíclico C_{11} acompañado de un grupo epóxido.

Kittredge *et al* (1971) aisló crustecdisona, una hormona inductora de la muda en jaibas. Este compuesto no tan sólo induciría la muda prenupcial en la hembra sino también estimularía al macho para el cortejo, realizando la función de feromona sexual en éste.

La importancia de la quimiorecepción en el comportamiento de los invertebrados marinos y la implicación de feromonas sexuales en actividades reproductivas ha sido sostenida por muchos autores. En la mayoría de los casos, sus aseveraciones se sustentan a través de métodos indirectos como experimentos conductuales (Atema y Engstrom, 1971), remoción de receptores químicos o sellando los poros secretores (Ryan, 1966). Sin

embargo, son pocos los trabajos que efectivamente han demostrado, en forma química, la existencia de dicho compuesto en el medio; logrando aislarlo e identificarlo. En el caso de los copépodos, la participación de feromonas en procesos reproductivos también ha sido reportada. Katona (1973) demostró la existencia de un mecanismo químico en la localización y atracción de ambos sexos en copépodos planctónicos durante la cópula, sugiriendo que este fenómeno era mediado por feromonas sexuales. Sin embargo no realizó ningún análisis químico que respalde dicha suposición. Lazzaretto *et al* (1990) presenta evidencias de señales químicas en la atracción de sexos de *Tigriopus fulvus*; pero tampoco realiza análisis químicos. Este autor también cita a una serie de trabajos que han demostrado este mecanismo químico de atracción sexual en copépodos planctónicos (Brodsky, 1948; Griffith, 1976; entre otros) pero en ninguno se mencionan análisis químicos que identifiquen el compuesto responsable de dicho fenómeno. Walker (1979) es el primero en sugerir que las feromonas podrían estar involucradas en un supuesto mecanismo denso dependiente de regulación de la población, aunque tampoco realiza algún análisis químico que sustente dicha hipótesis.

Si dicho mecanismo de autorregulación es llevado a cabo por feromonas, se hace necesario determinar la técnica más adecuada para aislarla e identificarla y realizar los estudios respectivos para demostrar dicha hipótesis. El hecho que las publicaciones anteriormente citadas no registren análisis químicos no tan sólo le resta validez al argumento de la participación de feromonas en los procesos descritos, sino que imposibilita la comparación y validación de la técnica utilizada en este trabajo para la detección de feromonas en un medio de cultivo, la cual fue experimental y basada en argumentos

teóricos. Se propone para futuros experimentos la determinación de feromonas no directamente desde el medio de cultivo sino desde el volumen aéreo del contenedor. Este debería ser hermético a fin de permitir la retención y acumulación del compuesto volatilizado, identificándolo a través de cromatografía gaseosa como describe Müller en su trabajo de 1986 para algas pardas. Si bien la participación de feromonas en mecanismos denso dependientes es poco probable, sí se ha demostrado su participación en la atracción sexual y reconocimiento inter específico en copépodos, por lo que definir a futuro una metodología adecuada para la detección de estos compuestos en medios de cultivo reviste gran importancia.

Suponiendo que el propuesto mecanismo denso dependiente no es llevado a cabo por feromonas, es factible que los organismos respondan a cambios químicos en el medio producidos por sus propios desechos o actividades metabólicas. En este sentido, al comparar las variaciones de oxígeno disuelto en cultivos con y sin recambio del medio, observamos que no hay diferencias significativas entre ambos tratamientos por lo que se supone que el recambio del medio no afectó este parámetro y que sus variaciones se deben a otros factores.

La correlación inversa y significativa entre el oxígeno disuelto en el medio sin recambio y la temperatura del cultivo, sugiere que estas variaciones podrían deberse, en parte, a cambios térmicos. La concentración del oxígeno en el agua de mar está en función de la temperatura y la salinidad así como de la fotosíntesis, respiración, oxidación microbiológica y química (Prado, 1995).

La salinidad se mantuvo constante y se suministró talos de *Enteromorpha* en cantidad tal que el oxígeno no fuera limitante. La falta de correlación entre las variaciones de abundancia poblacional y el oxígeno sugieren que este no afectó en forma significativa el desarrollo de los organismos. Además, el rango en el cual fluctuó la concentración de oxígeno en ambos tratamientos no representa valores críticos para la sobrevivencia de la especie ya que está dentro de los rangos en los que fluctúa el oxígeno en el ambiente donde habita *Tigriopus angulatus*. Los registros de oxígeno para aguas costeras de la bahía de Valparaíso varían entre 4 y 8 ml/l (Sievers y Silva, 1973). Cubillos (1955) reportó valores de oxígeno entre 6,5 y 9,5 ml/l en pozas de pleamar de la zona de Montemar donde habita la especie. El valor mínimo de oxígeno registrado en el experimento corresponde a un 70% de subsaturación a esa temperatura y salinidad por lo que se desestima su influencia en los cambios de abundancia de la población.

Si bien se encontró una correlación significativa entre el número de adultos del cultivo sin recambio y el contenido de oxígeno, al comparar los gráficos podemos observar que el brusco cambio de abundancia inicial de la población adulta no responde a variaciones del oxígeno y que los valores extremos del nivel de oxígeno no concuerdan con los extremos en abundancia; al analizar punto por punto ambas curvas, se observa que no presentan relación en absoluto. Es por ello que no obstante el valor estadístico significativo, se desestima esta correlación. La explicación que podríamos sugerir con respecto a porqué los estadísticos utilizados mostraron valores significativos entre estas variables es que ambas curvas presentan tendencias similares a partir de la tercera semana como se observa en la Fig. 24.

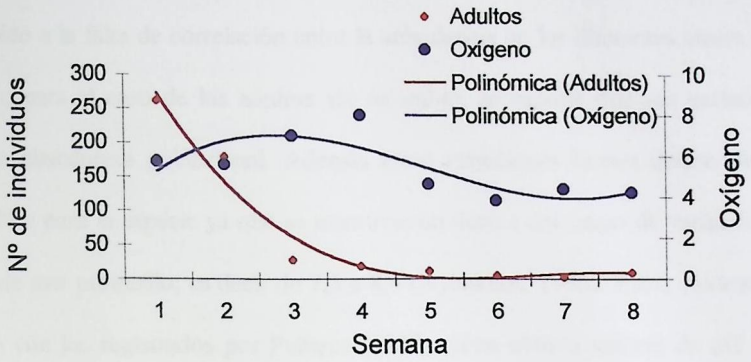


Fig. 24. Líneas de tendencia polinomial de tercer orden de oxígeno y adultos en cultivos sin recambio del medio.

Una explicación similar cabría para la correlación entre el pH y los adultos del cultivos sin recambio, al comparar sus tendencia observamos que ambas curvas presentan similitudes en un 75% de los datos (Fig. 25).

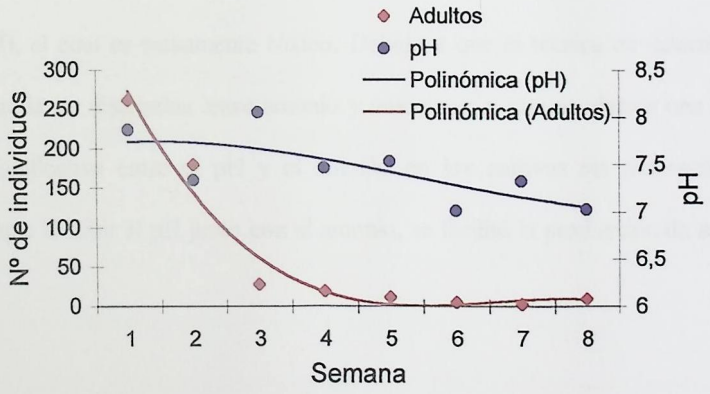


Fig. 25. Líneas de tendencia polinomial de tercer orden de pH y adultos en cultivos sin recambio del medio.

Debido a la falta de correlación entre la abundancia de las diferentes clases etarias y el pH, salvo para el caso de los adultos sin recambio, se supone que sus variaciones no afectaron la abundancia poblacional. Además estas variaciones fueron dentro de valores muy tolerables para la especie ya que se mantuvieron dentro del rango de variación del pH en el agua de mar promedio; es decir de 7,5 a 8,4 (Nybakken, 1996). Estos valores también concuerdan con los registrados por Pallares (1980) quien obtuvo valores de pH de 7,5 a 18°C en pozas de grandes pleamares donde habita una especie afín. Estos ambientes, como se ha mencionado, están sujetos a períodos de aislamiento que determinan importantes variaciones físico-químicas del medio por lo que se supone que la especie no debe ser especialmente sensible a las variaciones de pH. Goddard y Zuñiga (1995) registró valores de pH de hasta 10 en pozas de grandes pleamares donde habitaban poblaciones de *Tigriopus angulatus*. En estas condiciones alcalinas, el amonio se transforma en amoniaco (Libes, 1992), el cual es sumamente tóxico. Debido a que la técnica de determinación de amonio utilizada no discrimina entre amonio y amoníaco; y que se obtuvo una correlación directa y significativa entre el pH y el amonio en los cultivos sin renovación, es que suponemos que al subir el pH junto con el amonio, se facilitó la producción de amoníaco en el medio.

La concentración de amonio en ambos tratamientos no presentó diferencias significativas, no obstante se hubiera esperado obtenerlas entre cultivos que presentaban o no cambio del medio. Se podría presuponer que el cultivo con recambio mantuviera valores relativamente bajos y estables en el tiempo; y que el cultivo sin recambio experimentara

una progresiva acumulación de amonio. Esta diferencia de los resultados entre lo esperado y lo obtenido podría explicarse a través de dos argumentos. Por un lado, dado la naturaleza bentónica de los nauplios, el recambio del medio solo contemplaba el cuerpo de agua y no los desechos del fondo constituidos por pellets fecales y animales muertos. Una vez cambiado el medio, este fondo puede haber reincorporado amonio al agua, manteniendo niveles relativamente altos y variables durante el experimento. El otro argumento se refiere a que, debido a procesos de nitrificación y asimilación biológica, la cantidad de amonio no necesariamente se acumularía progresivamente en un cultivo sin recambio. En presencia de oxígeno, el amonio es transformado en nitrito y luego en nitrato a través de bacterias *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* respectivamente. Las algas marinas por su parte satisfacen sus necesidades nítricas asimilando nitrógeno inorgánico disuelto y debido a su menor estado de oxidación, el amonio se asimila más fácilmente que el nitrito y nitrato (Libes, 1992).

La correlación significativa entre la abundancia poblacional y la concentración de amonio sugiere dos situaciones: En primer término, la concentración de amonio depende de la densidad poblacional, debido a que es el principal desecho excretorio de los crustáceos (Hartenstein, 1970); y por otro que la concentración de amonio determina cambios en la abundancia. Esta última alternativa estaría indicando la existencia de un mecanismo de retroalimentación negativa en la regulación de la densidad poblacional en estos organismos, ya que una sustancia metabólica producida por ellos mismos, afectaría negativamente su proliferación. Ambas situaciones pueden observarse en el experimento ya que entre el inicio de este y la primera semana existe una correlación inversa. Sube bruscamente el amonio y desciende bruscamente la población. Además, como se vio, el pH pudo estimular

la producción de amoníaco, el cual es muy tóxico. Posterior a eso se observa que el amonio varía en función de la abundancia poblacional. Kinne (1976) destacó que los productos finales del metabolismo del nitrógeno, originados de las excreciones de los organismos vivos, de la descomposición de los animales muertos y del alimento no consumido, pueden interferir con los procesos esenciales de la vida.

La disminución de los individuos, a causa de la mortalidad, determinó que el aporte de amoníaco disminuyera a niveles tolerables. Allí sería donde actuaría un segundo sistema de autorregulación más fino en donde la cantidad de amonio no mortal afectaría en mayor o menor grado ciertas funciones biológicas como crecimiento y reproducción a fin de adaptarse a las condiciones que se presentan en el ambiente a cada momento. Fava y Crotti (1979), sugirieron que la inhibición del crecimiento puede ser causada por residuos bióticos producidos por los animales como anhídrido carbónico y amoniaco, los que se acumulan en el medio. Entre estos, el amonio es el más común. Por su parte, De Viana (1987) determinó que los compuestos nitrogenados redujeron significativamente el crecimiento del harpactícido *Schizopera elatensis*, siendo el amoniaco el más tóxico.

Si bien el objetivo de este trabajo se ha orientado a demostrar le existencia de un mecanismo químico de autorregulación poblacional en harpactícidos; es posible proponer que el amoniaco, participa de este mecanismo, no tan sólo como un factor limitante de la capacidad de carga del ambiente donde habita la especie, sino también en la regulación fina y permanente de los procesos metabólicos y reproductivos de *Tigriopus angulatus*.

CONCLUSIONES

Un compuesto químico que se acumula en el medio de cultivo, posiblemente amoniaco, afecta negativamente la fertilidad y la productividad de hembras grávidas de *Tigripous angulatus* provenientes de medio fresco. La disminución en la productividad se debe fundamentalmente al aumento en el intervalo entre puestas ya que la duración del desarrollo embrionario no se ve afectado significativamente.

Los tiempos de eclosión o duración del desarrollo embrionario varían con cambios en la salinidad; ya sea estimulando la eclosión de los huevos en caso de un shock hiposmótico; o retardando y hasta inhibiendo la eclosión en el caso de un golpe hipersalino.

La participación de feromonas en mecanismos denso dependientes en copépodos es poco probable, sin embargo se sugieren aspectos metodológicos para la detección de feromonas en medio de cultivos a fin de aportar al desarrollo de un método químico para estudios de comunicación, reconocimiento y atracción sexual en copépodos

Se encontró relación entre la abundancia poblacional y la concentración de amonio en el medio de cultivo; sin embargo no la hubo entre la abundancia poblacional y cambios en el contenido de oxígeno y pH.

Por lo anterior es posible validar la hipótesis de trabajo propuesta ya que se demuestra, a través de los experimentos realizados, la existencia de una estrecha relación entre los

cambios químicos del medio y variaciones en las capacidades reproductivas de las hembras, la viabilidad y tiempo de eclosión de los huevos y la sobrevivencia de una población de *Tigriopus angulatus*.

La asociación entre los parámetros químicos del medio y variables reproductivas de la población nos indica que esta especie responde a cambios ambientales producidos por desechos metabólicos liberados por ella misma alterado su tasa reproductiva.

Se sugiere que con un adecuado recambio del medio sería posible disminuir los efectos inhibidores del mecanismo y permitir mantener altas tasas de reproducción en condiciones intensivas de cultivo, teniendo especial cuidado en el contenido de amoniaco y que la concentración de oxígeno se mantenga por sobre los 4 ml/l.

REFERENCIAS

Alveal K. 1970. Estudios ficoecológicos en la región de Valparaíso. Revista de Biología. Marina 14 (1): 7-88.

Atema J. & DE. Engstrom. 1971. Sex pheromone in the lobster *Homarus americanus*. Nature 232: 261-263.

Boltovskoy D. 1981. Atlas del Zooplancton del Atlántico sudoccidental. INIDEP. Mar del Plata, Argentina.

Bradford JM. 1967. The genus *Tigropus* Norman (Copepoda: Harpacticoida) in New Zealand with a Description of a new species. Trans. Royal Society of New Zealand Zoology 10 (6): 51-59.

Clarke G. 1958. Elementos de Ecología. Ediciones Omega, Barcelona.

Cubillos R. 1955. Factores que determinan la oxigenación del agua en las pequeñas cubetas rocosas separadas del mar. Revista de Biología Marina 5(1): 5-9.

De Viana ML. 1987. Efectos de compuestos nitrogenados en el crecimiento de *Schizopera elatensis* (Copepoda: Harpacticoidea). Museo de Historia Natural de Valparaíso18: 21-27.

Fava G. & E. Crotti. 1979. Effect of crowding on Nauplii production during mating time in *Tisbe clodiensis* and *T. holothuriae* (Copepoda, Harpacticoidea). Helgoländer wiss. Meeresunters 32: 466-475.

Gee JM. 1987. Impact of epibentic predation on estuarine intertidal harparcticoid copepods populations. Marine Biology 96: 497-510.

Goddard M. 1993. Poblaciones planctónicas de pozas de marea sometidas a perturbaciones térmicas y salinas. Tesis para optar al Grado de Magíster en Cs. Biológicas. Universidad Católica de Valparaíso, 157 pp.

Goddard M. & L. Zúñiga. 1995. Copépodos de pozas intermareales de Montemar, Valparaíso (32°57'S, 77°33'W), Chile. Revista de Biología Marina 30 (1): 91-133.

Hartenstein R. 1970. Nitrogen metabolism in non insects arthropods. In: J. W. Campbell (ed). Comparative Biochemestry of nitrogen metabolism. I The Invertebrates: 299-372. Academic Press, New York

Hicks GRF. & BC. Coull. 1983. The ecology of marine meiobenthic harpacticoid copepods. Oceanography and Marine Biology Annual Review 21: 67-175.

Hiep C. 1986. Conclusion of Symposium on growth, life and culture. p 100. En: Syllogeus 58. Proceedings of International Conference on Copepoda. Otawa, Canada.

Huizinga HW. 1971. Cultivation, life history and salinity tolerance of the tide pool copepod *Tigriopus californicus* in artificial sea water. Trans. Ill. State Academy of Sciences 64: 230-236.

Huntley M. & M. Lopez. 1991. Temperature-dependent production of marine copepods: a global syntesis. The American Naturalist 140 (2): 201-242.

Kahan D. *et al.* 1982. A simple method for cultivating harpacticoid copepods and offering them to fish larvae. Aquaculture 26: 303-310.

Kahan D. *et al.* 1988. Maternal inhibition at High Population Densities in *Tigriopus japonicus* (Copepoda, Crustacea). Biological Bulletin 174: 139-144.

Kahan D. 1992. Studies on High population density cultures of copepods. Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh 44: 129-130.

Katona S. 1973. Evidence for sex Pheromones in Planctonic Copepods. Limnology and Oceanography 18 (4): 574-583.

Katz M. & Y. Lensky. 1970. Gas chromatographic analysis of ecdysone. Experientia 26 : 10-43.

Kinne O. 1976. Cultivation of marine organisms: Water quality management and technology. p. 79-300. In O. Kinne (ed). Marine Ecology. Vol. III Part I. Wiley interscience, New York.

Kittredge JP. *et al.* 1971. Sex pheromone activity of the molting hormone, Crustedysone, on male crabs. Fishery Bulletin 69 (2): 337-343.

Kittredge JP. *et al.* 1974. Chemical signals in the sea: Marine allelochemics and evolution. Fishery Bulletin 72 (1):1-11.

Kraul S. *et al.* 1991. Comparison of copepods and enriched *Artemia* as feeds for larval mahimahi, *Corryphaena hippurus*. Fish and crustacean larviculture symposium (Larvi) 15: 45-47.

Lang K. 1948. Monographie der Harpacticiden. Lund. Hakan Ohlssons Boktyckeri. 1682p.

Lang K. 1965. Copepoda harpacticoidea from the californian pacific coast. K.V.A.Handl. 10 (2): 1-560 .

Lazzaretto L. *et al.* 1990. Evidence of chemical signalling in *Tigriopus fulvus* (Copepoda, Harpacticoidea). Crustaceana 59: 171-179.

Libes S. 1992. An Introduction to Marine Biogeochemistry. Jhon Wiley & Sons, New York. 734p.

Lonsdales DJ. *et al.* 1998. The role of chemical signals in copepods reproduction. Journal of Marine Systems15 (1-4):1-12.

Müller DG. 1986. The role of pheromones in sexual reproduction of kelps. Monografías Biológicas UC 4: 245-254.

Nybakken JW. 1996. Marine Biology. An ecological approach. Addison Wesley Longman (eds.). Miami.481p.

Pallares RE. 1980. Observaciones sobre el ciclo biológico y comportamiento *in vitro* de un copépodo harpacticoide litoral. *Tigriopus californicus.* Contribuciones Científicas 169, 36p. CIBIMA, Buenos Aires.

Petit J. 1990. Water supply, treatment, and recycling in aquaculture. En: Aquaculture 1. Editor: Gilbert Barnabé.

Prado R. 1995. Determinación de amonio. En: Compendio de métodos de análisis químico de los componentes del agua de mar más requeridos en estudios ambientales y oceanográficos. Publicaciones Ocasionales del Instituto de Oceanología Universidad de Valparaíso 8, 95p.

Ryan EP. 1966. Pheromone: Evidence in a decapond crustacean. Science 151: 115-136.

Sievers H. & N. Silva. 1973. Variaciones estacionales de temperatura, salinidad y contenido de oxígeno frente a la Bahía de Valparaíso (Mayo de 1968-Abril de 1969). Investigaciones Marinas 4 (1): 1-16.

Sorgeloos P. & P. Larens. 1996. Production of Copepods. En: Manual on the Production and use of livefood for aquaculture. FAO fisheries technical paper 361: 265-272.

Støttrup JG. & NH. Norsker. 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. Aquaculture 155: 231-247.

Sun B. & JW. Fleeger. 1995. Sustained mass culture of *Amphiscoides atopus* a marine harpacticoid copepod in a recirculating system. Aquaculture 136: 313-321.

Walker I. 1979. Mechanisms of Density-Dependient Population regulation in the Marine Copepod *Amphiascoides* sp. (Harpacticoidea). Marine Ecology progress series 1: 209-221.

ANEXOS

ANEXO 1. Composición de aminoácidos de *Tigriopus brevicornis* cultivados con diferentes tipos de alimentos ($g.100g^{-1}$ de proteína cruda) (Sorgeloos, 1996)

Tigriopus brevicornis cultivado con *Platymona suecica* con diferentes aditivos:

Aminoácido	Levadura	Salvado de arroz	Trigo	Alimento para peces
Ácido aspártico	7.30	6.98	7.08	7.63
Treonina	3.35	3.09	3.53	3.74
Serina	3.37	2.98	3.39	3.59
Ac. Glutámico	12.05	12.00	11.90	10.62
Prolina	5.13	4.49	6.56	4.82
Glicina	4.40	4.24	4.31	4.71
Alanina	5.44	5.45	5.97	5.87
Cistina	0.39	0.84	1.23	1.27
Valina	4.52	4.30	4.21	4.71
Metionina	1.78	1.75	1.64	1.81
Isoleucina	3.35	3.21	3.28	3.48
Leucina	4.79	4.71	6.24	6.73
Tirosina	3.89	3.99	3.21	3.87
Fenilalanina	2.64	2.67	3.37	3.44
Histidina	1.94	1.75	1.78	1.33
Lisina	4.81	4.65	4.81	4.92
Arginina	6.52	6.34	5.76	6.11
Total proteínas	75.67	73.44	78.27	**78.65**
% proteínas	51.1	48.6	43.9	**46.5**

ANEXO 2. **Descripción de la especie**

ORDEN: HARPACTICOIDEA

FAMILIA: HARPACTICIDAE Sars, 1904

GÉNERO: *Tigriopus* Norman, 1868

ESPECIE: *Tigriopus angulatus* Bozic, 1960

Diagnosis de los especimenes de Montemar

El rostro es pequeño, algo más largo que ancho. El cuerpo es alargado. La parte posterior de éste es un poco más angosta que la anterior.

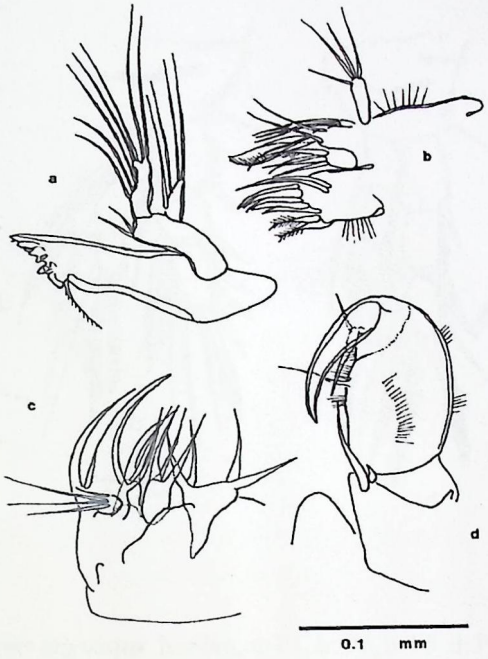
La anténula de la hembra tiene 9 artejos, en el macho es fuertemente geniculada. El artejo terminal del endopodito de la antena posee 3 sedas con dobleces y 3 espinas lisas. El exopodito de la antena tiene 2 sedas en el primer miembro, 1 en el segundo y dos en el tercero.

El primer pereiópodo tiene el endopodito dividido en 3 artejos, el artejo final posee dos garras y el artejo terminal del exopodito 5 garras. Del segundo al cuarto pereiópodo son triarticulados. El segmento terminal del endopodito del segundo pereiópodo del macho es algo reducido. El exopodito del quinto pereiópodo de la hembra es ligeramente ovoide y lleva 5 sedas. El basiendopodito tiene 5 sedas. El quinto pereiópodo en el macho es ovoide, tiene 5 sedas; el sexto pereiópodo está reducido a 3 sedas.

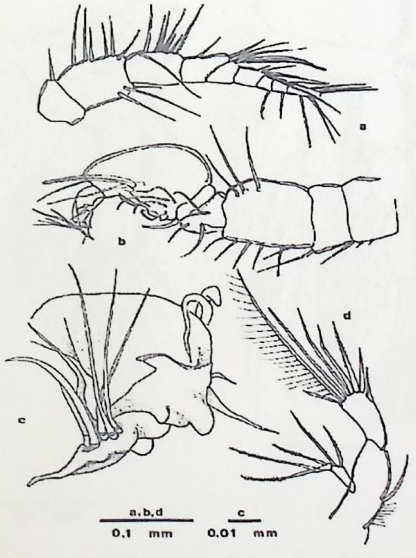
La furca es casi el doble de ancha que larga

Armadura de los P_2-P_4:

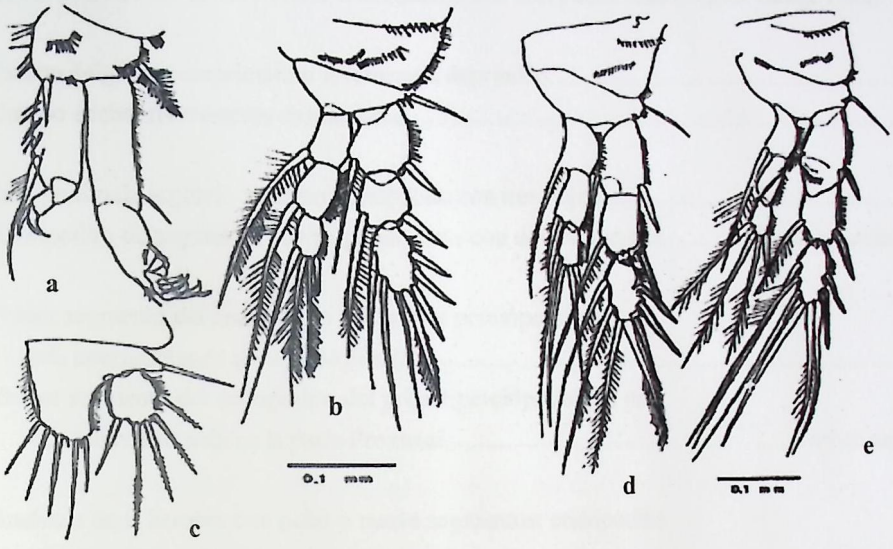
Endp	Exo	
$P_2$1.1.(130)	1.1.(232)	Longitud hembra: 1,15 mm
$P_3$1.1.(130)	1.1.(232)	Longitud macho: 1,1 mm
$P_4$1.0.(130)	1.1.(232)	



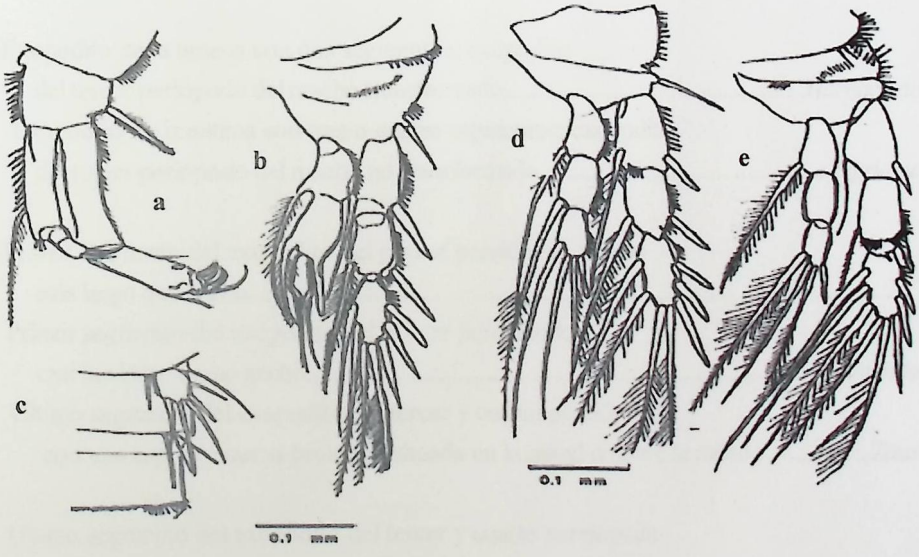
Tigriopus angulatus: a: Mandíbula, b: Maxílula, c: Maxila, d: Maxilípedo.



Tigriopus angulatus: a: Anténula de la hembra, b: Anténula del macho, c: Extremo distal de anténula del macho, d: Antena



Tigriopus angulatus hembra. a: P1, b: P2, c: P5, d: P3, e: P4



Tigriopus angulatus macho: a. P1, b: P2, c: P5, 6, d: P3, e: P4

CLAVE TAXONÓMICA PARA GENEROS DE Harpacticidae (Según Lang, 1965)

1. Cuerpo delgado, comprimido o levemenete deprimido.....2
   Cuerpo ancho, fuertemente deprimido.....6

2. Endopodito de segundo a cuarto pereiópodo con tres segmentos.....3
   Endopodito de segundo a cuarto pereiópodo con dos segmentos.....*Discoharpacticus*

3. Primer segmento del endopodito del primer pereiópodo con una seda interna situada en la parte distal.....4
   Primer segmento del endopodito del primer pereiópodo con una seda interna situada en la parte Proximal.....*Perissocope*

4. Anténula de la hembra con ocho o nueve segmentos; endopodito del segundo pereiópodo del macho transformado.....*5*

   Anténula de la hembra con siete segmentos; endopodito del segundo pereiópodo del macho no transformado.....*Harpacticella*

5. Exopodito de la antena con dos segmentos; exopodito del tercer periópodo del macho transformado.....*Harpacticus*
   Exopodito de la antena con tres o cuatro segmentos; exopodito del tercer periópodo del macho no transformado.....*Tigriopus*

6. Primer segmento del exopodito del primer pereiópodo mucho más largo que ancho.....7
   Primer segmento del exopodito del primer pereiópodo casi tan largo como ancho.....*Zausodes*
7. Ultimo segmento del exopodito del tercer y cuarto pereiópodo con una espina externa proximal situada en la mitad o sobre la mitad .....*Zaus*

   Ultimo segmento del exopodito del tercer y cuarto pereiópodo con una espina externa proximal situada cerca del final.....*Zausopsis*

CLAVE TAXONÓMICA PARA ESPECIES DE *Tigriopus* (Según Bradford, 1967)

1. El exopodito del quinto pereiópodo tiene cinco sedas en machos y hembras.....2

   El exopodito del quinto pereiópodo tiene 5 sedas en las hembras y

   cuatro en los machos 3

2. Tercer segmento del exopodito del cuarto pereiópodo con

   siete espinas y sedas.....*T. Californicus y japonicus*

   Tercer segmento del exopodito del cuarto pereiópodo con

   ocho espinas y sedas.....*T. angulatus*

3. Segmento basal del quinto pereiópdo de la hembra con 4 sedas internas

   Ambos sexos menores a 1 mm de longitud.....4

   Segmento basal del quinto pereiópodo de la hembra con 5 sedas internas

   Ambos sexos mayores a 1 mm de longitud.....5

4. Seda interna del quinto pereiópodo del macho presente.....*T. minutus*

   Seda interna del quinto pereiópodo del macho ausente.....*T. raki*

5. Quinto pereiópodo con espinas y sedas solo en los bordes.....*T. brevicornis*

   Quinto pereiópodo con sedas también en la superficie.....*T. fulvus*