

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
ESCUELA DE BIOLOGIA

UTILIZACION DE SEIS DIETAS PARA EL CULTIVO DE Pomacea flagellata
(Say) (Gastropoda: Ampullariidae), EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

JORGE A. MUÑOZ RIVERA

PRACTICA DIRIGIDA PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN BIOLOGIA
CON ENFASIS EN ZOOLOGIA

"CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO"

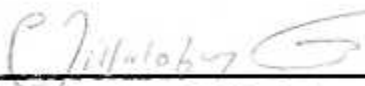
1987

UTILIZACION DE SEIS DIETAS PARA EL CULTIVO DE Pomacea flagellata
(Say) (Gastropoda: Ampullariidae), EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

JORGE A. MUÑOZ RIVERA

PRACTICA DIRIGIDA

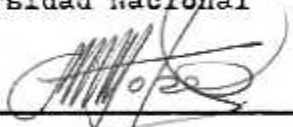
Presentada a la Escuela de Biología como requisito parcial
para optar al grado de LICENCIATURA EN BIOLOGIA


M. Sc. Carlos Villalobos S.
Universidad de Costa Rica

Director de la Práctica
Director de la Escuela


M. Sc. Clemencia León B.
Universidad Nacional

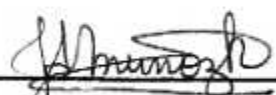
Miembro del Tribunal


Lic. Myrna López S.
Universidad de Costa Rica

Miembro del Tribunal


Lic. Hernán Camacho V.
Universidad de Costa Rica

Miembro del Tribunal


Jorge Arturo Muñoz Rivera.

Sustentante

DEDICATORIA

A quienes les debo todo,
mis padres.

Agradecimiento

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al M. Sc. Carlos Villalobos, por sus valiosos consejos en la dirección de este trabajo.

A la M. Sc. Clemencia León, por enseñarme muchas de las técnicas usadas durante el ensayo, su dedicación y su amistad.

A los Licenciados Myrna López y Hernán Camacho, por las observaciones y revisión del manuscrito.

A los señores Jesús Rojas y Rafael Hernández, por su ayuda en la realización de este trabajo.

A mis compañeros por su apoyo y su sincera amistad.

A Patricia Castro A. por su compañía, ayuda y amor.

RESUMEN

En este trabajo se utilizaron seis diferentes dietas para cultivar el caracol P. flagellata, en condiciones de laboratorio, en la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica.

La investigación pretendía determinar el crecimiento del caracol según la dieta, comparar las diferencias en peso y longitud total de concha con los valores del porcentaje de proteínas alcanzado por estos en cada dieta.

En la primera parte se determinó que en condiciones naturales, este molusco se alimenta principalmente de microalgas clorofíceas de las especies Chlorella vulgaris, Scenedesmus obliquus y Ankistrodesmus falcatus.

Las microalgas anteriores se aislaron y se cultivaron en forma individual y mezcladas. Se determinó las constantes de crecimiento de dichos cultivos. También se calculó la cantidad de repollo que era ingerido por los caracoles, con el fin de evaluar posibles residuos de la agricultura como alimento para estos moluscos.

Luego con dietas de repollo y microalgas se determinó el cre-

cimiento de los caracoles y su respectivo porcentaje de proteínas alcanzado según la dieta, encontrándose que con solo repollo alcanzaron los más altos valores en peso y longitud total de concha, pero el valor proteínico de los caracoles fue bajo. En el tratamiento con las tres especies de microalgas mezcladas más repollo, se notó un alto valor proteínico de los caracoles, pero la longitud de concha y el peso fueron bajos. En la dieta de las tres especies de microalgas mezcladas, los caracoles alcanzaron altos valores en todos los parámetros medidos. Esto anterior indicó que de acuerdo a la finalidad del cultivo de los caracoles, así puede utilizarse una u otra dieta según sea el caso.

Considerando el tipo de alimentación del caracol P. flagellata, puede adaptarse bien a policultivos pues se alimenta de microalgas adheridas al sustrato y también de hojas tiernas de algunas hortalizas, aumentando así la productividad del policultivo.

INTRODUCCION

La acuicultura en términos generales se conoce como la producción de biomasa en cuerpos de agua limitados (Soeder, 1981), tal biomasa se considera como una fuente alterna de producción de proteína para consumo humano.

Lo anterior hace que la acuicultura tome gran importancia, ya que pretende el aprovechamiento de especies animales y vegetales, con características tales como una alta tasa de reproducción, crecimiento rápido, resistencia a enfermedades y adaptabilidad a condiciones de cultivo (Coll, 1983; Bardach et al., 1972 y Merales, 1978).

Para obtener mayor rendimiento y bajar los costos de producción en acuicultura se trata de utilizar alimento barato; es aquí donde cobran importancia especies dulceacuícolas que se nutren de la producción natural algal de un estanque. Un ejemplo de esto son los peces conocidos como lisas (familia Mugilidae), cuyo principal alimento son algas filamentosas y diatómeas, según análisis de contenidos estomacales (De Lemus et al., 1980).

Epifanio (1975, 1978, 1979) y De Pauw et al., (1983), señalan que las dietas para moluscos a base de microalgas favorecen el

crecimiento en el peso de los organismos. Algunas microalgas utilizadas en estas pruebas han sido bacilariofíceas tales como Skeletonema costatum, Nitzschia sp., Chaetoceros sp. y clorofíceas como Chlorella sp. y Chlamydomonas sp.. En otros casos, las microalgas son utilizadas para alimentar organismos como crustáceos copépodos, Artemia salina (Branchiopoda:Cladocera) y rotíferos, que sirven de alimento a otros animales de importancia comercial, como lo son larvas de langostas, larvas de peces, camarones de agua dulce y otros, (Uhlig, 1981; Witt et al., 1981 y Sick, 1976).

Los gastrópodos también son organismos de importancia para el desarrollo de la acuicultura, especialmente los herbívoros, como es el caso de los caracoles del género Pomacea (=Ampullaria) (Pseudobranchia: Ampullariidae). Así Maita (1978), indica que Pomacea maculata puede ser empleado en acuicultura debido a que se alimenta en condiciones de laboratorio, de hojas tiernas de plátano, rábano, lechuga, repollo entre otras y en forma natural lo hace de vegetación asociada al borde de los ríos, como Limnaea minor (Lampazo) y Eichornia crassipes (Lirio de agua); alcanzando éstos pesos de 11.6 gramos en 125 días de cultivo y mortalidades de tres por mil.

Otra especie de importancia alimenticia es Pomacea flagellata (Say), introducida a Costa Rica como Pomacea zeteki (Morrison).

P. flagellata se encuentra actualmente en los estanques de la

Estación Enrique Jiménez Núñez (EEJN) en Cañas, Guanacaste, propiedad del Ministerio de Agricultura y Ganadería.

Algunos individuos de P. flagellata fueron trasladados a la estación de Acuicultura de A.S.B.A.N.A. en 28 Millas, Limón donde han mostrado buen rendimiento en crecimiento y reproducción, (Villalobos, 1985; comunicación personal).

Lebo (1986) trabajando con P. flagellata, evaluó aspectos biométricos y de composición bioquímica de la carne, utilizando caracoles recolectados en los estanques de la EEJN, hizo observaciones en aspectos reproductivos en condiciones de laboratorio. Durante su estudio utilizó repollo (Brassica oleracea var. capitata) para alimentarlos. Briceño (1986) también alimentó con repollo caracoles de esta misma especie, en un estudio de infección experimental con Angiostrongilus costaricensis (Nematoda:Angiostrongilidae), logrando infectarlos experimentalmente y encontrando una fuerte actividad inmunológica como respuesta a la presencia del parásito.

De la biología de esta especie de caracoles se tiene poca información. Se sabe que su principal alimento son las algas que se adhieren al sustrato y otras materias vegetales.

OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio, es determinar el crecimiento del caracol Pomacea flagellata (Say), utilizando seis diferentes dietas de microalgas y repollo.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1- Determinar las especies de microalgas que constituyen el principal alimento de P. flagellata, en los estanques de la estación Enrique Jiménez Núñez.
- 2- Analizar el valor proteínico de las diferentes dietas, para establecer su relación con el crecimiento observado.

REVISION DE LITERATURA

El phylum Mollusca, según Willows (1973), Merten (1967), Purchon (1977), Wilbur y Yonge (1968) y Hess (1971), está constituido de siete clases: Aplacophora, Monoplacophora, Poliplacophora, Gastropoda, Bivalvia (Pelecypoda) y Cephalopoda. Dentro de la clase Gastropoda se encuentran tres subclases: Prosobranchia, la que según Barnes (1980) y Meglitsch (1983), corresponde a los caracoles marinos y dulceacuícolas. portadores de branquias, la cavidad del manto y los órganos que contiene se encuentran en la parte anterior del animal. Opisthobranchia: en su mayoría animales marinos, que tienen una sola aurícula y un solo nefridio del lado derecho, presentan reducción o pérdida de la concha y la cavidad del manto y son hermafroditas. Pulmonata: caracoles o babosas que tienen una aurícula, un solo nefridio, faltan las branquias y la parte derecha de la cavidad del manto está convertida en una cámara vascularizada para intercambio gaseoso, sin opérculo y son hermafroditas.

La subclase Prosobranchia según Morton (1967), ha sido dividida en tres órdenes a saber, Archaeogastropoda en donde se incluyen caracoles "primitivos" que suelen tener dos branquias bipectinadas, dos aurículas y dos nefridios, aunque la branquia derecha puede estar reducida o no existir; concha espiral o secundariamente simétrica; la mayor parte de las especies son marinas.

Los miembros del orden Mesogastropoda poseen una sola branquia unipectinada, una aurícula y un nefridio en el lado izquierdo; son principalmente marinos pero hay muchos géneros de agua dulce y terrestres; este es el mayor de los tres órdenes.

En el orden Neogastropoda los individuos tienen también una sola branquia unipectinada, un osfradio bipectinado, sistema nervioso concentrado y una concha con una muesca o un canal sifonal. En su mayor parte son especies marinas y carnívoras.

El orden Mesogastropoda ha sido dividido en una serie de superfamilias; una de éstas es Viviparidacea, en la cual se encuentra la familia Ampullariidae (Burky y Burky, 1977). Según Novikoff (1963) y Pennak (1953) todos sus miembros tienen opérculo concéntrico, poseen simultáneamente una branquia y un saco pulmonar; el corazón con una aurícula sencilla y probóscide dividida con dos tentáculos; usualmente viven en sustratos lodosos, son dioicos y tienen una rádula tipo taenioglosada la cual, según Hyman (1967), consiste de siete dientes en hilera transversal, con uno central y a cada lado uno lateral y dos marginales.

Dentro de la familia Ampullariidae, Malek (1980) incluye los géneros Afropomus (Pilsby y Bequaert), Saulea (Gray), Asolene (D'Orbigny), Pila (Roding) de África y Asia, Lanister (Montfort) en

Africa; Marisa (Gray) en Sur América y Pomacea (= Ampullaria) (Perry) en Centro y Sur América, Sur de Estados Unidos e Islas del Caribe (Malek y Cheng, 1976 y Pointier, 1974). Dentro de este último género se encuentra P. costaricana, que es endémica de la cuenca del Tempisque, Costa Rica, P. conoidea y P. flagellata que se encuentran en la misma zona (Martens, 1890), que como se indicó antes fue introducida.

Lobo (1986) describe a P. flagellata (según Martens, 1890), de la siguiente manera: " se caracteriza por tener una concha de forma muy variable, principalmente distinguible por su forma ovalada, con espira bastante obtusa y sutura superficial; la superficie de la concha es suave y ligeramente brillante, con numerosas impresiones, el peristoma relativamente grande y expandido, condición observable especialmente en lado externo en la mitad inferior del mismo.

La concha es generalmente de color amarillo-verdoso (oliva) palido, ligeramente más oscura en la mitad inferior. Los especímenes viejos adquieren una coloración violeta como ocurre en la mayoría de las especies de este género. En las conchas frescas, las espiras superiores son a menudo de color violeta, e inclusive, algunas veces se vuelven negruzcas. El interior de la abertura es generalmente de un color pardo púrpura oscuro".

Sobre esta especie los únicos trabajos disponibles son los de

Lebo (1986), Briceño (1986) y la descripción de Martens (1890). Sin embargo, sobre otros miembros del mismo género si hay información diversa disponible. En su gran mayoría está referida a su importancia como fuente de alimento de aves, tortugas y lagartos (Snyder y Kale, 1983; Beissinger, 1983; Kushlan, 1975; Bourne y Berlin, 1982 y Collett, 1977). También estos autores mencionan que en general estos caracoles son activos durante la noche mientras se alimentan; algunas de las especies estudiadas son: P. urceus (Miller), P. paludosa (Say), P. haustum (Reeve), P. dolioides (Reeve), P. chemnitzii y P. maculata (Perry).

Algunos otros trabajos informan sobre características relacionadas con los desoves. Así Filho (1965) hizo conteos de masas de huevos todos los meses durante tres años, encontrando que hay una correlación inversa y positiva entre el volumen de precipitación pluvial y el número de masas de P. haustum, en condiciones de estanque. En ambiente natural Kushlan (1978) ha intentado explicar la estrategia de la coloración de las masas de huevos de P. paludosa; concluye que estos no son crípticos sino evidentes, lo que parece ser un carácter importante para evitar la depredación por parte de los principales depredadores, como lo son las aves y algunos peces, aunque no evita la depredación por parte de invertebrados, principalmente saltamontes.

Hay trabajos orientados hacia la adaptación que tienen caracoles de este género, para sobrevivir a condiciones adversas como por ejemplo la sequía. Tal adaptación conocida como estivación, ha suscitado una serie de estudios, de resistencia a la desecación, como en P. haustum (Andrade, 1978, 1981); regulación de la temperatura corporal cuando hay exposición directa al sol, (Burky et al., 1972); tasa de eclosión de huevos en relación al ciclo-estival (Pacheco et al., 1971); características respiratorias durante su ciclo estacional (Pereira y Pacheco, 1971). Asimismo se han realizado estudios comparativos de estructuras de los epitelios del intestino de P. urceus, en los que se menciona la presencia de altas densidades de células mucoides, en diferentes procesos de autofagia celular; diversas formas de lisosomas y presencia de cuerpos densos que sugieren acumulaciones de reserva proteica. También aparecen células basales que pueden ser las responsables de la regeneración de los tejidos una vez superada la época seca (Pacheco, 1973; Pacheco y Scorza, 1971). Pacheco (1971 a,b) hizo análisis ultraestructurales del epitelio superior del riñón de P. urceus, encontrando la formación de uratos durante la etapa estival, o sea se producen acumulaciones de ácido úrico en tal concentración que se forman concreciones lo que permite economizar al máximo el agua. Las reservas de carbohidratos durante la estivación ha sido también motivo de estudio.

Según Cedeño et al. (1971); Cedeño-León (1984) y Little (1968), las reservas de carbohidratos son reguladas por el hepatopáncreas; en el primer mes se utiliza el glicógeno del hepatopáncreas pero luego se usa el del pie, las gónadas (en los machos) y el galactógeno de la glándula del albumen en las hembras, aunque según McMahon et al. (1957), las hembras de P. zeteki, no tienen galactógeno en la glándula de albumen sino glucógeno.

También se han realizado estudios para estimar y predecir la biomasa, utilizando pesos y mediciones lineales de las conchas (Bourne y Berlin, 1982; Collett, 1977; Guedes et al. 1981); en general se ha encontrado una fuerte correlación para Ampullaria canaliculata, entre el peso total y el peso de la carne, peso de concha y peso de la carne. Con P. paludosa se ha trabajado en regeneración de concha y se ha logrado determinar diferencias tanto en la de los cristales, como en la cantidad de materiales que son depositados en la zona regenerada (Meenakshi et al. 1975).

Se han llevado a cabo estudios desde el punto de vista microbiológico, y se ha logrado observar tremátodos (Schistosoma dermatitis) y contaminación por salmonelas, los cuales pueden afectar al hombre si no se tiene ningún control (Hanning y Leedon, 1978; Bartlett y Trust, 1976).

Según Lim Boo Liat et al. (1978), el ampullárido Pila scutata es usado como fuente de alimento para muchas comunidades humanas asociadas a los campos de cultivo de arroz anegado, como son los pueblos del sudoeste de Asia (China, India y Malasia); esto tiene repercusión desde el punto de vista médico ya que estos caracoles son vectores de parásitos; pero se pueden tomar algunas medidas para evitar este problema, como sería hervir los organismos por más de un minuto para matar las larvas de los parásitos. Briceño (1986) señala que para evitar la transmisión de Angiostrongylus costaricensis, además de lo recomendado anteriormente, se debe refrigerar los caracoles no menos de 72 horas a unos 4 - 6 grados Celcius o utilizar concentraciones de ácido acético al 0.1 % también durante no menos de 72 horas.

En cultivos de gastrópodos son pocas las especies de importancia directa ya que su utilización está restringida al Indo-Pacífico, Asia Oriental, Europa y algunas regiones del Norte y Centro America, (Lauchner, 1980 y Bardach et al., 1972). Ejemplo de estos son el abalón [Haliotis spp. (Gastropoda:Haliotilidae)] en el Pacífico (Japón y California); concha real [Strombus gigas (Strombidae)] en Bahamas e Indias Occidentales (Brownell, 1977); Littorea (Litorinidae) y Bussinum undatum (Bussinidae), especialmente en Inglaterra, Francia y Belgica (Lauchener, 1980). Los casos anteriores son organismos marinos aunque también en Francia se cultivan algunos caracoles terres-

tres del género Helix; sin embargo, sobre especies de agua dulce la información es escasa, ejemplo de estos trabajos son los de Maita (1978) y Filho (1956), los cuales tienden a ser ilustrativos y preliminares y no señalan ningún sistema a seguir para cultivo a gran escala.

En cuanto a la utilización de cultivos de microalgas para alimentar moluscos, la mayoría de los trabajos están dirigidos hacia el engorde de bivalvos, peces y crustáceos como copépodos y Artemia salina (Branchiopoda: Cladocera), que a la vez se utilizarán para alimentar peces o larvas zooplanctónicas (Epifanio, 1975, 1979 a,b; Uhlig, 1980; De Lemus et al., 1980; Witt et al., 1981 y De Pauw et al., 1983). Para uso en la alimentación de caracoles se han realizado pocos trabajos. Así Brownell (1977), alimentó Strombus gigas, S. costatum y S. pugilus con microalgas, pero no determinó cuáles microalgas eran su principal alimento, ni la cantidad consumida por los organismos; sólo estudió el comportamiento de alimentación de las larvas velíger y de los juveniles. También logró determinar que estos organismos son aptos para cultivarlos en forma de policultivo con peces, tortugas y crustáceos.

Doremus y Harman (1977) estudiaron los efectos del forrajeo de dos especies de caracoles de agua dulce sobre el perifiton, y demostraron que ambas especies actuando juntas pueden ser eficientes para eliminar el exceso de perifiton, aumentando la calidad del agua.

MATERIALES Y METODOS

Esta investigación se realizó en condiciones de laboratorio en la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, durante los meses de setiembre de 1985 a mayo de 1986, utilizando caracoles de la especie Pomacea flagellata (Say) y microalgas de la Estación Enrique Jiménez Núñez (EEJN).

RECOLECCION DE MUESTRAS

Se tomaron cuatro muestras de agua (dos en agosto y dos en setiembre de 1985) y cuatro raspados de las paredes y los monjes de los estanques de tierra de la EEJN (dos en agosto y dos en setiembre de 1985).

De las muestras recolectadas se hicieron cultivos en medio WC, el cual es específico para microalgas de agua dulce y consiste en una modificación del medio Chu N°10 de Gerloff, Fitzgerald y Skoog, hecha por Wright (1964), [ver anexo I.]

También en la EEJN, en el mes de setiembre de 1985, se extrajeron contenidos estomacales de doce organismos de P. flagellata, de diferentes tamaños y a diferentes horas del día, siguiendo el método de McKillup (1979), el cual consiste en extraer el contenido estomacal con una pipeta e gotero y sembrar en tubos de ensayo, que contengan medio de cultivo, en este caso WC. Para este proce-

dimiento es necesario equipo de disección esterilizado y agua destilada estéril abundante, cada disección y siembra se realizó en menos de diez minutos.

CULTIVO Y SELECCION DE MICROALGAS

Una vez que se logró que las microalgas crecieran en los tubos de ensayo (indicado por la presencia de color verde en el contenido del tubo), se hicieron preparaciones para observar al microscopio y determinar las especies de microalgas más abundantes, tanto en las muestras de agua como en los contenidos estomacales. Se seleccionaron las tres especies de microalgas más abundantes en las muestras de contenidos estomacales.

AISLAMIENTO

Con una asa esterilizada se tomaron gotas del contenido de los tubos de ensayo y se procedió a rayar en agar con medio WC.

Una semana después se examinaron las cajas de Petri al microscopio y se procedió a sembrar las colonias de microalgas seleccionadas de nuevo en agar.

Una vez que el crecimiento de las microalgas fue evidente, se tomaron colonias de microalgas con ayuda de pipetas Pasteur esterilizadas y se sembraron en diez tubos de ensayo con diez mililitros de medio WC. Dos semanas después mediante observación al microscopio se notó que el cultivo no era unialgal.

Para obtener un cultivo unialgal se utilizaron diluciones seriadas (1:10), hasta tener en el tubo de ensayo únicamente la especie de microalga deseada. El crecimiento mediante este proceso tardó entre 15 y 22 días. El procedimiento anterior se repitió para cada una de las tres especies de microalgas seleccionadas, pero solo en dos se logró obtener cultivos unialgales.

Para lograr el cultivo de la tercera microalga en forma unialgal, se tomó una muestra del contenido de un tubo y con ayuda de una pipeta Pasteur, se vertió una gota del contenido sobre un portaobjetos con depresión. Se hicieron diluciones seriales sobre varios portaobjetos con depresión hasta obtener en forma unialgal la especie deseada. Utilizando una micropipeta Pasteur y bajo el microscopio (a 10X) se tomó una o varias células de la microalga seleccionada y se sembró en un tubo de ensayo con medio de cultivo WC.

Una vez obtenidos los cultivos unialgales de las tres especies más abundantes, fueron purificadas tratándolas con una mezcla de antibióticos compuesta de Streptomycin, Penicilina y Cloranfenicol, para eliminar posibles bacterias y hongos según Stein (1973). [ver anexo 1]

Una semana más tarde los cultivos unialgales y puros se sem-

braron en erlenmeyer de 125 ml conteniendo medio WC. Para aumentar el volumen del cultivo se repitió este procedimiento tres veces con intervalos de dos semanas, utilizando erlenmeyers de 250, 500 y 1000 ml respectivamente, esto se realizó para cada microalga seleccionada.

La determinación de las especies de microalgas fue realizada por el M. Sc. Gerardo Umaña, utilizando las claves de Prescott (1962, 1970).

Para el crecimiento de las microalgas en cultivo se utilizaron lámparas Sylvania f20t12 de 15 watts, para iluminación permanente y la aereación proporcionada por un compresor de aire, con un ámbito de carga y descarga de 35 a 60 libras de presión.

Al inicio la determinación del crecimiento de las microalgas se realizó mediante conteos directos utilizando un hemocitómetro de 0.1 mm de profundidad, (Improved Neubauer Levi-Hausser) y un microscopio. Al finalizar el ensayo, se repitió la determinación del crecimiento de las microalgas, utilizando un espectrofotómetro (Zumatzu 80 uv.). Con este se realizaron mediciones de densidad óptica (DO), la cual es proporcional con el número de organismos por mililitro en suspensión. Para calcular la longitud de onda adecuada para cada cultivo, se utilizaron los métodos de Sorokin

(1973), Bianchini et al. (1985), que consisten en hacer mediciones empleando suspensiones de células, diluidas consecutivamente seis u ocho veces (1 , $1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$, $1/32$, $1/64$, etc.). Las mediciones se hacen a diferentes longitudes de onda. A las mediciones realizadas se les resta la última (correspondiente a la más diluida en cada serie) para obtener valores corregidos. Se toma el valor corregido más alto de cada longitud de onda y se divide entre su respectivo número de diluciones. La longitud de onda que tenga el valor más cercano a 1.00, es la más adecuada para el cultivo que se está analizando. Esto se hace para cada cultivo. Una vez determinadas las longitudes de onda para cada cultivo se realizan las mediciones de DO. Cada cinco días dichos valores se comparan con conteos de células realizados con el hemocitómetro al microscopio. Lo anterior se hizo para los siguientes cultivos de microalgas : Chlorella vulgaris, Scenedesmus obliquus y para un cultivo donde estaban las tres especies de algas juntas, no así para Ankistrodesmus falcatulus , pues durante este período no se contó con la cantidad suficiente para realizar estas mediciones.

Se contruyeron curvas de crecimiento para cada cultivo unialgal y se calculó la constante de crecimiento exponencial, también conocido como el número de divisiones por día (k), y el tiempo de generación (G), según lo describe Guillard (1973).

Las dietas ensayadas para determinar el crecimiento de Pomacea flagellata en cultivo fueron:

- 1- Mezcla de las tres especies de microalgas seleccionadas.
- 2- Mezcla de las tres especies de microalgas seleccionadas más repollo.
- 3- Sólo repollo (Brassica oleracea var. capitata).
- 4- Sólo Ankistrodesmus falcatus. (Corda) Ralfs 1848.
- 5- Sólo Chlorella vulgaris. Beyerinck 1890.
- 6- Sólo Scenedesmus obliquus. (Turp) Kuetzing 1833.

Para calcular la cantidad de repollo que se utilizó en los tratamientos 2 y 3 se hizo lo siguiente: se agregó una cantidad de repollo mojado previamente pesado, a un grupo de 30 caracoles (de diferentes tamaños), durante dos días. Al cabo de estos se recogió el residuo de repollo, se calculó la diferencia del peso y se comparó en términos de porcentaje con el peso total de los 30 caracoles. Lo anterior se hizo cinco veces y se logró determinar que para el segundo tratamiento (dieta), se debía agregar cada dos días una cantidad de repollo, equivalente al 2.5% del peso de los caracoles y para el tercer tratamiento se debía agregar una cantidad de repollo equivalente al 5% del peso de los caracoles.

La tasa de adición de repollo se ajustó semanalmente, pues con el crecimiento de los caracoles la cantidad de repollo debía aumentarse proporcionalmente al peso.

Para cada dieta se utilizó un frasco de vidrio transparente de un galón de capacidad, con tres litros de medio WC más 500 ml de cultivo unialgal y puro de la microalga respectiva. El frasco se tapó con un cilindro de espuma de poliuretano de 6 cm de grueso.

CULTIVO DE CARACOLES

Se recolectaron 250 caracoles de P. flagellata de la EEJN con un promedio de longitud de concha de 10 mm. Antes de incluirlos a los frascos se les eliminó las algas adheridas a sus conchas, sumergiéndolas en una solución de mertiolato, seguido de sucesivos lavados con agua destilada (método modificado de Sick, 1976). Seguidamente los caracoles se transfirieron a frascos provistos con medio WC por una semana. Al final de este lapso se tomaron muestras del medio, con ayuda de pipetas Pasteur, se examinó al microscopio y se constató la ausencia de algas. Posteriormente se colocaron 35 de estos caracoles en cada una de las seis diferentes dietas.

Durante los primeros 45 días la temperatura ambiente osciló entre 17 y 22 grados celcius (se utilizó un termómetro clínico tipo "Thomas"), lo que provocó mortalidad de caracoles en todos los tratamientos, pues temperaturas inferiores a 18 °C son letales para estos caracoles. A partir del 28 de febrero de 1986 se controló la temperatura utilizando termostatos "Penn-plax" de 100 watts y

10 pulgadas de longitud (0.5 °C de precisión) y se estabilizó en 22 grados celcius, hasta el final del experimento.

Para determinar el crecimiento de los caracoles, se realizaron mediciones semanales de longitud total de concha y peso total, utilizando un calibrador "Mitutoyo" (0.05mm de precisión) y una balanza "Ohaus" de 0.1 gramo de precisión.

Antes de cada medición los caracoles se colocaron en papel absorbente (papel toalla) por 15 minutos, para eliminar el exceso de agua.

Los análisis de los valores proteínicos de las dietas y de los caracoles alimentados con su respectiva dieta, se realizaron en el laboratorio del Centro de Investigaciones en Producción Naturales (CIPRONA), de la Universidad de Costa Rica. Para estos análisis se utilizó el método de Micro-Kendall, con el cual se obtiene el porcentaje de proteínas de la muestra respecto a su peso seco. Para el cálculo del porcentaje se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ml gastados del titulador} \times \text{normalidad del titulador} \times 0.014 \times 100 \times 6.25}{\text{peso seco de la muestra}} = \%$$

donde: el titulador es ácido sulfúrico al 0.0169 N., 0.014 valor para corregir la multiplicación ml de titulador gastados por su normalidad y 6.25 es una constante.

PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Se tomaron datos de peso y longitud total de concha durante trece semanas consecutivas. Se calculó el promedio y desviación estándar con los datos de cada semana para cada dieta. Se utilizó la prueba de Kruskal y Wallis (Sokal y Rohlf, 1979), con una significancia del 5%, para establecer posibles diferencias entre las dietas, tanto para peso como para longitud total de concha.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los análisis de las muestras de agua de los estanques de la EEJN, mostraron la presencia de gran número de microalgas entre las cuales están:

DIVISION	FAMILIA	ESPECIE
Cyanochloronta	Chroococcaceae	<u>Microcystis</u> sp.
	Oscillatoriaceae	<u>Oscillatoria</u> sp.
		<u>Lyngbya</u> sp.
	Nostocaceae	<u>Anabaena</u> sp.
Chrysophycophyta	Nitzschiaceae	<u>Nitzschia</u> sp.
	Naviculaceae	<u>Navicula</u> sp.
	Chaetoceraceae	<u>Chaetoceros</u> sp.
Chlorophycophyta	Chlorococcaceae	<u>Chlorococcum</u> sp.
		<u>Tetracystis</u> sp.
	Oedogoniaceae	<u>Oedogonium</u> sp.
	Chlorellaceae	<u>Chlorella vulgaris</u>
		<u>Ankistrodesmus falcatus</u>
	Scenedesmaceae	<u>Scenedesmus obliquus</u>
	Chlamydomonadaceae	<u>Chlamydomonas</u> sp.
Cryptophycophyta	Cryptochrysidae	<u>Rodomonas</u> sp.

De las anteriores microalgas las más abundantes en todas las muestras fueron: Chlorella vulgaris, Ankistrodesmus falcatus y Scenedesmus obliquus, Chlorococcum sp. y Tetracystis sp.

En los contenidos estomacales de los caracoles se observó la

presencia de Microcystis sp., Chlorella vulgaris, Ankistrodesmus falcatus y Scenedesmus obliquus; donde las tres últimas fueron las más abundantes. Con base en lo anterior las microalgas seleccionadas para preparar las dietas fueron: C. vulgaris, S. obliquus y A. falcatus.

Las curvas de crecimiento de los cultivos de microalgas aparecen en la figura 1. Se observa que para C. vulgaris y S. obliquus, sus curvas son similares pues alcanzan máximos entre 1×10^7 y 1.1×10^7 células por mililitro durante igual tiempo de vida. En A. falcatus se nota que en menos tiempo se alcanza un número mayor de células por mililitro, a sea 1.5×10^7 , pero su tiempo de vida fue menor en relación a las otras dos especies de microalgas. Este comportamiento se debe a que agotan los nutrimentos del medio más rápidamente que las otras dos especies. Cuando las tres especies de microalgas están mezcladas en un mismo cultivo, se alcanzan números de células de 9×10^6 /ml y el tiempo de vida del cultivo también fue menor en relación a S. obliquus y C. vulgaris. Lo anterior sugiere que la competencia por los nutrimentos entre las especies, impide que se alcance un mayor número de células por mililitro, como si lo hacen individualmente las especies de microalgas. También la competencia entre especies por la toma de los nutrimentos es tal que estos disminuyen y las poblaciones de microalgas decaen en poco tiempo.

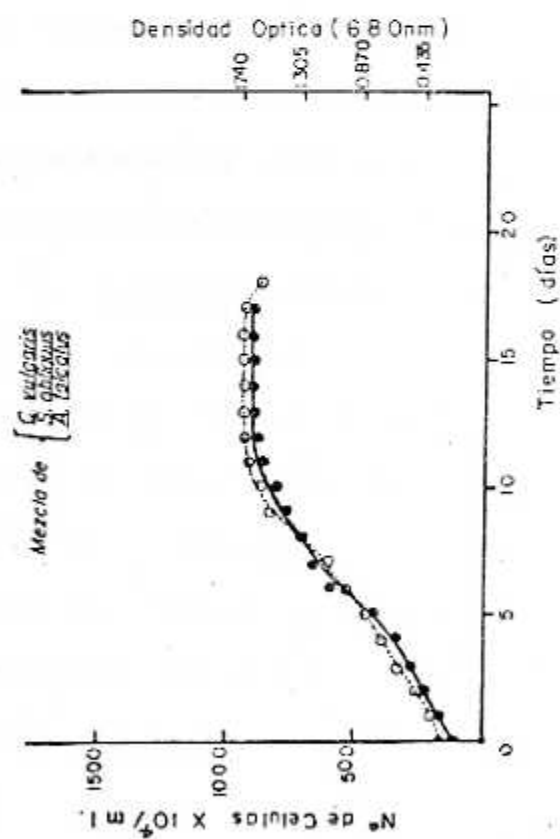
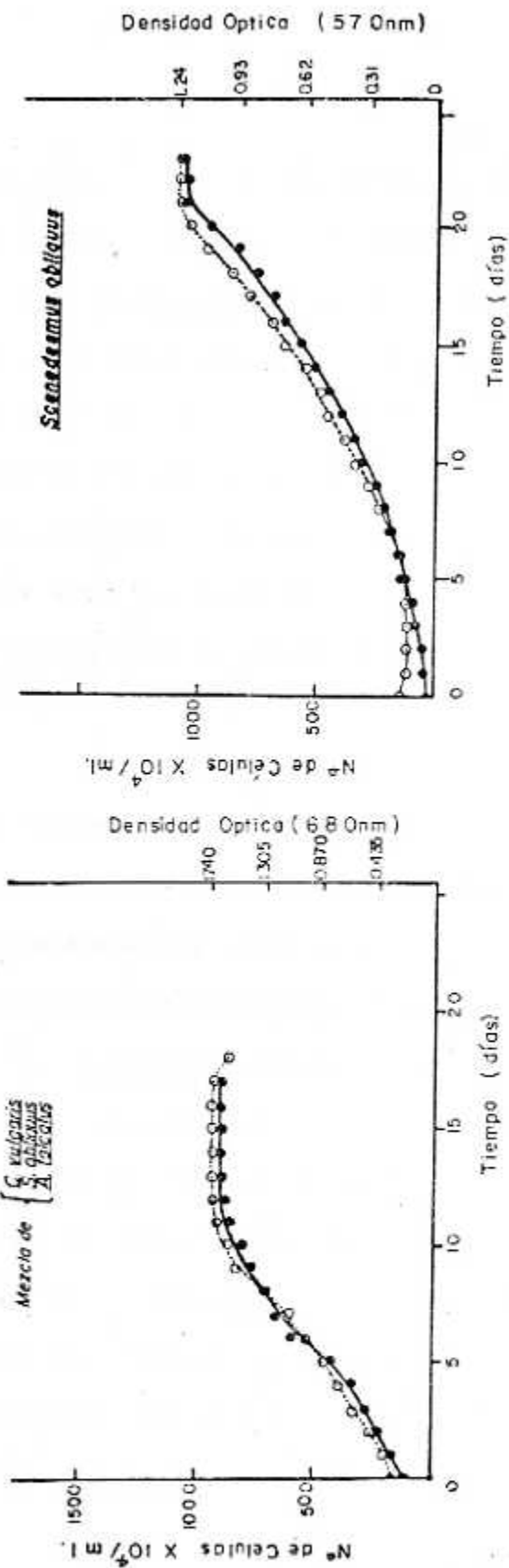
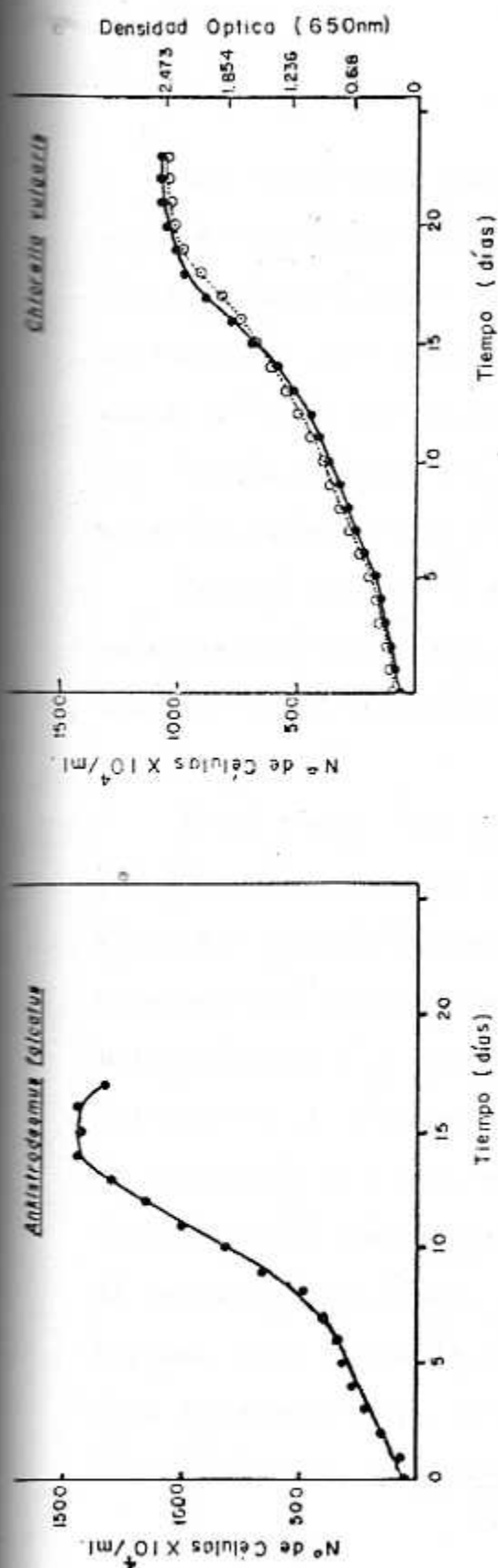


Figura 1. Curvas de crecimiento de los cultivos de microalgas, durante un período de 23 días, utilizados para la alimentación del caracol *P. flagellata* en condiciones de laboratorio.

—○—○—○— N° de células obtenido por conteo directo.
 - - - ○ - - - N° de células obtenido por densidad óptica.

Las determinaciones de las longitudes de onda óptimas, para efectuar las mediciones de D O en los cultivos utilizando el espectrofotómetro, indicaron que para S. obliquus, la longitud de onda adecuada era de 570 nanómetros (nm). Esta determinación concuerda con la obtenida por Oliveira y Rosemberg (1980) para S. quadricauda. Para C. vulgaris resultó ser de 650 nm, valor cercano al informado por Tamiya (1957) y Sorokin y Kraus (1958), que fue de 680 nm.

Para el cultivo de las tres especies mezcladas la longitud de onda fue de 680nm. Para A. falcatus como se indicó antes no se realizaron estas mediciones.

En el cuadro 1 se observa los valores del número de divisiones por día (k) y el tiempo de generación (G), calculados por conteo directo y densidad óptica. Se nota que los tiempos de generación para las tres especies de microalgas mezcladas y A. falcatus fueron bajos respecto a C. vulgaris y S. obliquus; esto guarda relación directa con la longevidad de los cultivos, pues cuando el tiempo de generación es corto, el número de individuos se duplica en menor tiempo, por lo que la utilización de los nutrimentos disueltos en el medio es mayor, o sea, la tasa de incorporación de éstos es más rápida. Esta situación propicia una caída en el número de individuos de la población, una vez agotados los nutrimentos. Por eso los cultivos con C. vulgaris y S. obliquus, los cuales poseen tiem-

TABLA 1

Valores del número de divisiones por día (k) y tiempo de generación (G), en los cultivos de microalgas.

	Censo directo (hemocitómetro)		Densidad óptica (espectrofotómetro)	
	k (por día)	G (en días)	k (por día)	G (en días)
<u>Chlorella vulgaris</u>	0.0638	4.70	0.0655	4.60
<u>Scenedesmus obliquus</u>	0.0711	4.23	0.0711	4.23
<u>Cryptosporidium falcatus</u>	0.0823	3.66	x	x
<u>Mezcla de las 3 especies</u>	0.1106	2.72	0.1082	2.78

x No se determinó.

pos de generación mayores, tienen mayor amplitud en su fase exponencial.

Nótese en el cuadro 1, que los tiempos de generación obtenidos con el conteo directo y con la densidad óptica, son parecidos y en el caso de S. obliquus son iguales. Ya Guillard (1973), Stein (1973), Oliveira y Rosemberg (1980) y Bianchini et al (1985), habían mencionado que el uso de métodos colorimétricos (como la densidad óptica) para determinar el número de células por mililitro en una suspensión de microalgas, es muy confiable y rápido de obtener.

En cuanto a la importancia de las dietas, se nota en el cuadro 2 que con la dieta de repollo, los caracoles alcanzaron mayor peso y longitud total de concha que los caracoles con las otras dietas. Estas diferencias son estadísticamente significativas como lo muestra el cuadro 3, lo que parece indicar que el repollo es la mejor dieta si se quisiera utilizar como principal fuente de alimento para el crecimiento de P. flagellata. Sin embargo el valor proteínico del repollo, el cual se muestra en el cuadro 4, es muy bajo y los caracoles alimentados con esta dieta también presentan un valor proteínico bajo, apenas superando a aquellos alimentados con la dieta de A. falcatus, la cual es una de las más pobres desde el punto de vista proteínico y es la de menor aprovechamiento tanto en peso como en longitud total de concha.

CUADRO 2

Promedios y desviación estándar del peso y longitud total de concha de los 35 caracoles P. flagellata, alimentados en cada una de las seis diferentes dietas, en condiciones de laboratorio durante trece semanas.

DIETA	PESO (gr)		LONGITUD (cm)	
	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S
Solo repollo	1.283	0.499	1.549	0.226
3 especies de microalgas mezcladas + repollo	0.821	0.212	1.356	0.143
3 especies de microalgas mezcladas	0.901	0.235	1.389	0.123
<u>Ankistrodesmus falcatus</u>	0.749	0.183	1.194	0.113
<u>Scenedesmus obliquus</u>	0.861	0.194	1.294	0.156
<u>Chlorella vulgaris</u> *	0.888	0.226	1.403	0.268

* Solo 11 semanas, $\bar{X}$ = Promedio, S = Desviación estándar

Los caracoles con la dieta repollo, mostraron durante el período de cultivo daños en sus conchas (desgaste y fisuramiento), situación que no se observó en los caracoles de las otras dietas.

Lo anterior puede deberse a dos factores: el primero, a la actividad de los mismos caracoles de roerse las conchas con las rádulas, para raspar microalgas adheridas; el segundo, por baja concentración o ausencia de carbonato de calcio en el medio. Si se recuerda los caracoles antes de ser introducidos en los frascos de cultivo se les eliminó las microalgas, por lo tanto sería una pérdida de energía raspar las conchas donde no hay alimento, además en los cultivos donde sí hay microalgas no se notó daños en las conchas, por lo que se deduce que este no es el factor que explica tales daños observados. En cuanto a la concentración de carbonato de calcio, no fue determinado, por lo que no se sabe si fue el factor que influyó.

El cuadro 4, también muestra que el valor proteínico de los caracoles con la dieta "tres especies de microalgas más repollo", es el más alto, aunque el valor proteínico de la dieta sea bajo, esto se debe a que el valor proteínico de la dieta se obtiene del porcentaje de proteínas de la muestra respecto a su peso seco; en volumen y peso el repollo aporta más que las tres especies de microalgas, con lo que influye directamente en el valor proteínico final de la dieta. Por el contrario, observamos en el cuadro 2 que el

CUADRO 3

Valores de la prueba de Kruskal y Wallis a ($\chi^2 = 3.48$), entre las seis diferentes dietas a que fue sometido el caracol P. flagellata, en condiciones de laboratorio.

	3sp+repollo	3 especies	<u>A. falcatus</u>	<u>S. obliquus</u>	<u>C. vulgaris</u>	repollo
3sp+repollo	---	3.48	1.040	1.11	2.90	8.570
3 especies	1.330	---	1.760	4.920	0.021	5.740
<u>A. falcatus</u>	0.716	2.609	---	6.520	8.490	15.480
<u>S. obliquus</u>	1.578	0.277	2.440	---	5.650	10.570
<u>C. vulgaris</u>	4.770	0.041	0.050	0.168	---	6.760
repollo	5.933	5.530	6.660	10.270	5.720	---
3sp+repollo	3 especies	<u>A. falcatus</u>	<u>S. obliquus</u>	<u>C. vulgaris</u>	repollo	

* = Diferencia estadísticamente significativas.

3sp = Tres especies de microalgas mezcladas.

Las comparaciones en longitud de concha se muestran en la parte superior; mientras las comparaciones en peso se encuentran en la parte inferior de la línea inclinada que divide el cuadro.

TABLO 4

Porcentaje de proteína de cada dieta y de los caracoles P. flagellata, alimentados con cada una de las diferentes dietas, en condiciones de laboratorio.

Dieta	Porcentaje proteínico de la dieta	Porcentaje proteínico de los caracoles en esa dieta
5 especies de micro- algas mezcladas	30.186 $\pm$ 1.72	39.710 $\pm$ 0.26
5 especies de microal- gas mezcladas + repollo	13.725 $\pm$ 0.25	41.360 $\pm$ 0.39
Solo repollo	12.065 $\pm$ 0.16	39.210 $\pm$ 1.50
<u>Chlorella vulgaris</u>	24.186 $\pm$ 0.19	x
<u>Scenedesmus obliquus</u>	32.116 $\pm$ 0.32	39.547 $\pm$ 0.14
<u>Skistodesmus falcatus</u>	28.713 $\pm$ 0.76	29.915 $\pm$ 0.24

x No se determinó.

aumento en el peso y longitud de concha es bajo comparándolo con las otras dietas y sólo superando a la dieta A. falcatus, la cual como se mencionó antes es la más pobre de todas las dietas.

En cuanto a la dieta denominada "tres especies de microalgas", presenta (cuadro 4) un alto porcentaje proteínico y los caracoles alimentados con esta dieta también muestran un alto contenido proteínico, además el aumento en el peso y longitud total de concha de los caracoles con esta dieta fue segundo en orden de mayor aumento, precedido de la dieta repollo. (Cuadro 4).

Las dietas compuestas de una sola especie de microalga mostraron diferencias entre ellas, así S. obliquus fue la de mayor porcentaje proteínico y el porcentaje de proteínas de los caracoles alimentados con esta dieta también fue alto según se ve en el cuadro 4; pero en el cuadro 2, se muestra que el aumento de longitud total de concha y peso, fue bajo en comparación con las otras dietas.

El valor proteínico de la dieta C. vulgaris, fue más bajo que las dietas de S. obliquus y A. falcatus. El porcentaje de proteínas para los caracoles alimentados con C. vulgaris, no se pudo determinar porque dos semanas antes de concluir el ensayo, hubo una mortalidad total de los caracoles, situación que coincidió con el final de la fase exponencial del cultivo algal. Wilbur y Yonge (1968) y

Coll (1983), indican que cuando los cultivos de Chlorella sp. están altamente concentrados, los organismos se alimentan muy activamente y provocan que la digestión de tales cantidades de algas no sea efectiva y algunas de esas microalgas terminan el proceso de fotosíntesis liberando oxígeno, el cual en el estómago es tóxico y causante de muerte.

El cuadro 2 muestra claramente que los caracoles de la dieta C. vulgaris, alcanzaron un peso y una longitud de concha relativamente altos, hasta dos semanas antes de concluir el ensayo.

Se nota claramente que las dietas compuestas por las tres microalgas mezcladas producen los valores más altos en el nivel proteínico de los caracoles. Lobo (1986) utilizando caracoles P. flagellata traídos de los estanques de la EEJN, encontró que los valores proteínicos de estos variaban entre 49 a 63% durante los seis meses que recolectó datos; esto sugiere que a mayor diversidad de microalgas como fuente de alimento es mayor el valor proteínico alcanzado por los caracoles, además la ingestión en forma accidental de hongos, bacterias y protozoarios, durante el raspado de las microalgas, puede influir también en el contenido proteínico del alimento y que se refleja en el porcentaje proteínico de los caracoles.

Al considerar el tipo de alimentación del caracol P. flagella-

ta, este podría adaptarse muy bien en policultivos, pues raspa las microalgas adheridas al sustrato que no son utilizadas por los demás miembros del policultivo tales como la tilapia, algunas carpas y almejas de agua dulce, de esa manera utilizaría completamente la capacidad biogénica del estanque. También se podrían aprovechar algunos residuos agrícolas para alimentarlos, tales como hojas tiernas de legumbres y hortalizas, aumentando así la productividad del policultivo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 1- Con base en los contenidos estomacales, se determinó que los caracoles P. flagellata en los estanques de la Estación Enrique Jiménez Núñez, se alimentan principalmente de clorofíceas de las especies C. vulgaris, S. obliquus y A. falcatus.
- 2- En este trabajo las especies de microalgas mezcladas en cultivos de volumen limitado, alcanzaron números de células por mililitro inferiores a cultivos de las mismas especies, pero cultivadas en forma individual.
- 3- En este estudio los cultivos de microalgas con tiempos de generación cortos, mostraron períodos de vida más cortos, que cultivos con tiempos de generación largos.
- 4- La dieta compuesta por la microalga C. vulgaris favorece el aumento en longitud de concha y pese de los caracoles P. flagellata, pero debe controlarse la concentración de esta en el medio, para evitar la muerte de los caracoles.
- 5- En este trabajo la dieta de microalgas mezcladas que contiene alto valor proteínico, logró que los caracoles alimentados con ésta, alcancen altos valores en porcentaje de proteínas, así como

en peso y longitud de concha, que con dietas de una sola microalga.

6- La dieta de sólo repollo favorece el aumento en peso y longitud total de concha de los caracoles P. flagellata, pero el valor proteínico de los caracoles con esta dieta es bajo, además se producen daños externos en la concha.

7- La dieta con las tres especies de microalgas mezcladas y repollo fue la de mayor valor proteínico alcanzado por los caracoles, pero el aumento en peso y longitud total de concha es bajo, durante el período de estudio.

8- Para estudios similares se recomienda determinar los ciclos de vida y valores proteínicos de las microalgas que se utilicen, con el fin de seleccionar aquellas que presenten mayor rendimiento.

9- También se recomienda hacer estudios de la adherencia de microalgas a diferentes superficies y materiales, con el fin de favorecer la alimentación de organismos que raspan paredes para alimentarse.

BIBLIOGRAFIA

- Andrade, R. 1979. Resistencia a desecacao de Pomacea haustum capturados en Lago Pampulla, Belo Horizonte, M. G. (Brasil). *Ciencia e Cultura* 31: 531 - 532.
- Andrade, R. 1981. Resistencia a desecacao de Pomacea haustum (Reeve, 1856) capturados en Lago Pampulla, Belo Horizonte, M. G. (Brasil) (Mollusca Pilidae). *Revista Brasileira de Biologia* 41 (1) : 215 - 221.
- Bardach, J.; J. Ryther and McLarney, W. 1972. *Aquaculture. The farming and husbandry of freshwater and marine organisms*. New York, U.S.A. John Wiley & Sons, Inc. 868p.
- Barlett, K. and T. Trust. 1976. Isolation as Salmonellae and other potential pathogens from the freshwater aquarium snail Ampullaria sp. *Applied and Environmental Microbiology* 31 (5): 635-639.
- Barnes, R. 1980. *Invertebrates Zoology*. 4th ed. Philadelphia, U.S.A. Saunder College. pp. 316 - 462.
- Beissinger, S. 1983. Hunting behavior, prey and energetics of snail kites in Guyana: consumer choice by a specialist. *The Auk* 100 : 84 - 92.
- Bianchini, L.; A. Viera and A. Toledo. 1985. Colorimetric determination of the number of cells in axenic cultures of Scenedesmus quadricauda. A comparison with direct counting. *Hydrobiologia* 122 : 167 - 170.
- Bourne, G. and J. Berlin. 1982. Predicting Pomacea dolioidea (Reeve) (Prosobranchia: Ampullariidae), weights from linear measurements of the shells. *The Veliger* 24 (4): 367 - 370.
- Briceño, Cristina. 1986. Infección experimental de Pomacea flagellata (Gastropoda: Ampullariidae) con Angiostrongylus costaricensis (Nematoda: Angiostrongylidae). Tesis para optar al grado de Licenciatura. San José, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 49 p.
- Brownell, W. 1977. Reproduction, laboratory culture, and growth of Strombus gigas, S. costatus and S. pugilus, in Los Robles, Venezuela. *Bulletin of Science* 27 (4): 668 - 680.
- Burky, A.; J. Pacheco and E. Pereira. 1972. Temperature, water and res-

- piratory regimes of an amphibious snail Pomacea urceus (Miller), from the Venezuelan savannah. *Biological Bulletin* 143 : 304 - 316.
- Burky, K. and A. Burky. 1977. Buoyancy changes as related to respiratory behavior in an amphibious snail Pomacea urceus (Muller), from Venezuela. *The Nautilus* 91 (3): 97 - 104.
- Cedeño-León, A. 1984. Carbohydrates reserves during aestivation of Pomacea urceus (Muller) (Gastropoda : Ampullariidae). *Comparative Biochemistry and physiology* 78 A (3): 553 - 557.
- Cedeño, A.; J. Pacheco y C. Alvarez. 1971. Aspectos preliminares de las variaciones de glucógeno y glucosa en el ciclo estival de Pomacea urceus. *Acta Científica Venezolana* 22 (1): 58.
- Coll M., J. 1983. *Acuicultura marina animal*. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa. 670p.
- Collett, S. 1977. Sizes of snail kite and limkins in Costa Rican marsh. *The Auk* 94 : 365 - 367.
- De Lemus, V.; E. Eskimazi-Leca y A. Da Souza. 1980. Hábitos alimentares de mugilidos em cultivo em la região de Itamaraca (Pernambuco, Brasil). *Primer Simposio Brasileiro de Acuicultura*. pp. 121-132.
- De Pauw, N.; J. Verboven y C. Claus. 1983. Large-escala microalgae production for nursery rearing of marine bivalves. *Aquacultural engineering* 2: 27 - 47.
- Doremus, C. and W. Harman. 1977. The effects of grazing by physids and planorbid freshwater snail on periphyton. *The Nautilus* 91 (3) : 92 - 95.
- Epifanio, C. 1979 a. Comparison of yeast and algal diets for bivalve molluscs. *Aquaculture* 16 : 187 - 192.
- Epifanio, C. 1979 b. Growth on bivalve molluscs: Nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the American oyster Crassostrea virginica (Gmelin) and the hard clam Mercenaria mercenaria (L). *Aquaculture* 18 : 1 - 12.
- Fausto, J. 1965. Sobre o numero de posturas de arua Pomacea haustorium (Reeve) (Mollusca: Mesogastropoda). *Boletim Sociedade Cearense Agron.* 6 : 43 - 47.
- Guillard, R. 1973. Division Rates. In: Stein, Janet (Ed). *Handbook of*

- phycological methods. Culture methods and growth measurements. London, England. Cambridge University Press. pp. 289 - 311.
- Guillard, R. 1976. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W. and Chanley (Eds). Culture of marine invertebrates animals. New York, U.S.A. Plenum Press. pp. 26-60.
- Guedes, L.; Fiori, A. and C. Da Diefenbach. 1981. Biomass estimation from weight and linear parameter in the apple snail Ampullaria canaliculata. (Gastropoda: Prosobranchia). Comparative Biochemistry and Physiology 68 A (2): 285 - 288.
- Haning, G. and W. Leedon. 1978. Schistosoma dermatitis from Pomacea paludosa (Say) (Prosobranchia: Pilidae) The Nautilus 92: 105 - 106.
- Hess, O. 1971. Freshwater gastropoda. In: Reberverri R. (Ed). Experimental embryology of marine and freshwater invertebrates. Netherlands, Holland. North Holland Publishing Company. pp. 215 - 246.
- Hyman, Libbie E. 1967. The invertebrates. Mollusca. New York, U.S.A. McGraw-Hill Inc. 792 p. Volumen 6.
- Kushlan, J. 1975. Population changes of the apple snail Pomacea paludosa in the Southern Everglades. The Nautilus 92: 57 - 58.
- Kushlan, J. 1978. Predation on apple snail eggs (Pomacea). The Nautilus. 92 (1): 21 - 23.
- Lauchner, G. 1980. Diseases of Mollusca: Gastropoda In: Klinne, O. (Ed). Diseases of marine animals. London, England. John Wiley & Sons Ltd. pp. 311 - 400. Volumen 1.
- Lim Boo Liat; Yap Loy Fong; M. Krishnansamy; P. Ramachandran y S. Mansor. 1978. Freshwater snail consupcion and angiostrongyliasis in Malaya. Tropical and Geographical Medicine 30: 241 - 246.
- Little, L. 1986. Aestivation and ionic regulation in two species of Pomacea (Gastropoda: Prosobranchia) The Journal of Experimental Biology 48 (3) : 569 - 586.
- Lobo, Xinia. 1986. Estudio de algunos aspectos de la biología del molusco Pomacea flagellata, (Say). (Prosobranchia: Ampullariidae). Tesis para optar al grado de Licenciatura. San José, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 54p.
- Malek, E. 1980. Snail-Transmitted parasitic diseases. C.R.C. Press. Inc. Boca Raton, Florida. 334 p. Volumen 1.

- Malek, E. and T. Chang. 1974. Medical and economical malacology. New York. Academic Press. U.S.A. 398 p.
- Martens, E. von. 1890-1901. Land and freshwater mollusca. In: Biología Centrali-Americana. Zoología. 9: 1 - 706.
- Mayta, R. 1978. Estudio sobre la biología del "Churo" Pomacea maculata (Perry) (Gastropoda: Ampullariidae) en el laboratorio. Anales Científicos Universidad Nacional Agraria, La Molina. 16: 11-14.
- McKillup, S. 1979. A technique for the isolation of microscopic algae suitable for feeding to specific invertebrate larvae. Aquaculture 16 : 361 - 362.
- McMahon, Patricia; von Brand, T. and M. Nolan. 1957. Observation on the polysaccharides of aquatic snail. Journal of Cellular and comparative physiology 50: 219 - 240.
- Meenakshi, U.; P. Blackwelder; P. Hare; K. Wilbur and N. Watabe. 1975. Studies on shell regeneration I. Matrix and mineral composition of the normal and regenerated. Shell of Pomacea paludosa. Comparative Biochemistry and Physiology 50 A : 347 - 353.
- Meglitsch, P. 1983. Zoología de Invertebrados. Traducido de la 2da ed. en inglés por Moreno, I. Madrid, España. Hermann Blume Ediciones 906 p.
- Morales, H. 1978. La revolución azul? Acuicultura y ecodesarrollo. México D.F. Editoria Nueva Imagen S.A. 159 p.
- Morton, J. 1967. Molluscs. 4a Ed. London, Great Britain. Hutchinson & Co. Ltd. 244 p.
- Novikoff, M. 1963. Fundamentos de la morfología comparada de los invertebrados. Traducido del alemán por Gaurilov, C. Argentina. Editorial Universitario de Buenos Aires. pp. 249 - 250.
- Oliveira-Dias G. y J. Rosenberg. 1980. Avaliação do crescimento de Scenedesmus quadricauda. Revista Latinoamericana de Microbiología 22 : 83 - 85.
- Pacheco, J. 1971 a. Morfología submicroscópica del epitelio del riñón de Pomacea urceus (Mollusca: Gastropoda), en período de actividad. Acta Biológica Venezolánica 7 (4): 379 - 397.
- Pacheco, J. 1971 b. Ultraestructura de las concreciones del epitelio renal de Pomacea urceus (Gastropoda: Prosobranchia). Acta Biológica Venezolánica 7 (4): 443 - 458.

- Pacheco, J. 1973. Estudio comparado de la ultraestructura del epitelio de la región media intestinal de Pomacea urceus (Gastropoda), durante el ciclo activo-estival. Acta Biológica Venezolánica 8 (2) ; 207 - 243.
- Pacheco, J. y J. Scorza. 1971. Estudio al microscopio electrónico del epitelio del intestino anterior de Pomacea urceus (Mollusca: Gastropoda). Acta Biológica Venezolánica 7 (4): 399 - 420.
- Pacheco, J.; O. Travieso y R. Miranda. 1971. Contribución al estudio de la biología Pomacea urceus (Mollusca: Ampullariidae). Acta Científica Venezolana 22 (1) : 58.
- Pennak, R. 1953. Freshwater invertebrates of the United States. New York U.S.A. Ronald Press. 768 p.
- Pereira, E. y J. Pacheco. 1971. Características respiratorias de Pomacea urceus (Mollusca: Gastropoda), en su ciclo estacional. Acta Científica Venezolana. 22 (1) : 58.
- Pointier, J. 1974. Faune malacologique dulceaquicole de l' isle de La Guadalupe (Antilles Francaises). Bulletin Du Museum National D' Histoire Naturelle. Zoologie. 159 (235) : 905 - 933.
- Prescott, G. 1962. Algae of the western great lakes area. Iowa, U.S.A. W.M.C. Brown Company Publishers. pp. 237, 253 y 279.
- Prescott, G. 1970. How to know the freshwater algae. 2a ed. Iowa, U.S.A. W.M.C. Brown Company Publishers. 349p.
- Puechon P. 1977. The biological of the mollusca. 2a Ed. London, Great Britain. Pergamon Press. 560 p. Volumen 57.
- Sick, L. 1976. Nutritional of five species of marine algae on the growth development, and survival of the brine shrimp Artemia salina. Marine Biology 35: 69 - 78.
- Snyder, N. y H. Kale. 1983. Mollusk predation by snail kite in Colombia. The Auk. 100 : 93 - 97.
- Soeder, C. 1981. Toward enforced aquaculture. U.O.F.S. Publishers U.S.A. Series N° 3 pp. 187 - 194.
- Sokal, R. y J. Rohlf. 1979. Biometría. Traducido del inglés por Lahoz, M. Madrid, España. Ediciones Blume S.A. pp. 426 - 438.
- Sorokin, C. 1973. Dry eight, paked cell volumen and optical density. In:

- Stein, Janet. Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. London, England, Cambridge University Press. pp. 321 - 343.
- Sorokin, C. y W. Kraus. 1958. The effects of lighth intensity on the growth rates of green algae. Plant physiology. 33: 109 - 113.
- Stein, L. 1973. Handbook of phycological methods; culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. 448 p.
- Tamiya, H. 1957. Mass culture of algae. In: Crafts, A. (Ed). Annual Review of plant physiology. California U.S.A. Annuals Reviews Inc. pp. 309 - 333. Volumen 8.
- Uhlig, G. 1980. Microfaunal food organisms for mariculture. Germany-Israel. Seminar on aquaculture. Resparch on intensive aquaculture sefayin (Israel). pp. 93 - 115.
- Wilbur, K. y C. Yonge. 1968. Physiology of mollusca. New York, U.S.A. Academic Press Inc. 473 p. Volumen 1.
- Willows, A. 1973. Learning en gastropods mollusks. In: Corming, W. ; Dyal, J. and A. Willows (Eds). Invertebrate learning. Artropods gastropods mollusks. New York, U.S.A. Plenum Press. 472 p. Volumen 2.
- Witt, V.; P. Koske; D. Kulman; J. Lenz and W. Nellen. 1981. Production of Nannochloris (Chlorophyceae) in large-escale outdoor tanks Aquaculture. 23: 171 - 181.
- Wright, R. 1964. Dynamics of a phytoplankton community in ice covered lake. Lymnology and Oceanography 96 : 163 - 178.

ANEXO 1

Medio WC.

El medio WC según Guillard (1976), es una modificación hecha por Wright (1964) al medio Chu N° 10 de Gerloff, Fitzgerald y Skoogs, de ahí su nombre, el Chu de Wright (the Wright's Chu). Este medio es utilizado para hacer crecer algas de agua dulce comunes y no es necesario agregar amortiguadores.

Composición del medio WC.

(Tomado de Guillard, 1976)

NUTRIMENTOS	Solución Original (% p/v)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36.76
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	36.97
NaHCO_3	12.60
K_2HPO_4	8.71
NaNO_3	85.01

Oligoelementos:

Se disuelven 4.36 mg de Na_2EDTA y 3.15 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 900 mililitros de agua destilada.

Se agrega luego 1ml de cada una de las siguientes soluciones de metales traza, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.98, % p/v), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2.2, % p/v), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 % p/v), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (18 % p/v) y $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (.63 % p/v).

Vitaminas:

La solución de vitaminas esta compuesta por 1.0 ml solución de biotina (0.1 mg/ml), 0.1 ml de B_{12} (1mg/ml) y 20 mg de Tiamina. HCl y se lleva a 100 ml de agua destilada.

Para preparar un litro del medio WC se agrega 1.0 ml de cada una de las soluciones preparadas anteriormente.

Solucion de antibióticos

(Tomado de Stein, 1973)

Se disuelven 100 mg de Penicilina-G y 50 mg de Estreptomicina en 10 mililitros de agua destilada.

Luego se agregan 10 mg de Cloranfenicol disuelto en 1 ml de etanol al 95 %, a la solución de Penicilina-Estreptomicina. Debe mezclarse bien y luego se filtra con una membrana.