

# Efecto del pH sobre la supervivencia embrionaria, periodo embrionario y de eclosión de *Galaxias maculatus*

Effect of pH on embryonic survival, embryonic and hatching period of *Galaxias maculatus*

Juan Barile<sup>1</sup>, Manuel Escudero<sup>1</sup> y Luisa Jara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco, Av. Rudecindo Ortega 02950 Temuco, Chile. jbarile@uct.cl

**Abstract.**- This study aims to evaluate the effect of pH on embryonic survival of *Galaxias maculatus*. Embryos were incubated at 6 different pH levels in the water. One-way ANOVA was used to compare averages between treatments and Tukey test to determine post hoc differences. The Probit regression was used to estimate the embryonic and the hatching period. Embryos survive pH from 5 to 11 and die at pH extremes 3 and 13. The best average survival rates were obtained at neutral pH ( $78.7 \pm 1.2$ ) and as the pH decreases away from embryonic survival 7 embryonic survival decreases. In conclusion, pH is an important factor to consider for the production of larval *G. maculatus*.

**Key words:** Pisciculture, embryos, incubation, pH tolerance

## INTRODUCCIÓN

En el cultivo de peces uno de los factores ambientales que afectan la supervivencia es el pH, valores por ejemplo que se alejan del neutro generalmente producen alteraciones fisiológicas y que dependiendo de lo extremo del valor y el tiempo expuesto del individuo suelen producir mortandad. Valores de pH entre 5,0 a 5,5 pueden ser dañinos para la reproducción de los peces, puesto que los huevos y los alevines son más sensibles al pH bajo que los peces juveniles y adultos (Hepher 2001).

Peterson & Martin (1982) demostraron que la captación de agua para la formación del espacio perivitelino de las ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) a pH 4 y 4,5, decreció significativamente respecto de ovas colocadas en pH 5 y 6,8 y a pH 4 murieron dentro de las 8 h de exposición sugiriendo que las reducciones en la cantidad del fluido perivitelino a bajo pH podría aumentar la susceptibilidad de los huevos a lesiones físicas. Rombough & Jensen (1985), también encontraron que los huevos de *Oncorhynchus mykiss* absorbieron significativamente menos agua a pH 5,5 y fueron significativamente más sensibles a la deformación mecánica a pH 6,0 que los que estuvieron a pH 7,2.

En cuanto al pH básico, existen pocos trabajos que especifiquen su efecto en la etapa embrionaria de peces. Meyer & Hansen (2002) determinaron que el contenido corporal de Na a pH 10 fue un 14% más bajo que los controles y que hubo una tendencia hacia un agotamiento más rápido de las larvas

de *Deltistes luxatus*. Bergerhouse (1992) demostró que breves periodos de pH altos causan mortalidades significativas en alevines de walleye (*Stizostedion vitreum*). Del mismo modo Xuemin & Randall (1991) demostraron que la actividad natatoria de juveniles de *Oncorhynchus mykiss* fue afectada en pH ácidos y básicos. Actualmente no se cuenta con información respecto de la influencia del pH en embriones de puye *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842), por lo tanto en el presente trabajo se evaluó la influencia del pH en la supervivencia embrionaria, periodo embrionario y periodo de eclosión del puye sometidos a 6 niveles de pH del agua (3, 5, 7, 9, 11 y 13). La hipótesis de trabajo fue que los embriones de *G. maculatus* por habitar en ambientes estuarinos poseen la capacidad de tolerar y adaptarse a amplias variaciones de pH.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MUESTRA BIOLÓGICA

Las ovas se obtuvieron de reproductores provenientes de una población migratoria de *Galaxias maculatus* criada en cautiverio. Un total de 20 hembras fueron desovadas mediante masaje abdominal y posteriormente fertilizadas artificialmente con un pool de semen de 30 machos. La selección de los especímenes maduros se determinó mediante una escala macroscópica de madurez sexual adaptada para esta especie (Barile *et al.* 2003).

Previamente al tratamiento, los embriones fueron mantenidos en agua de salinidad 10 preparada con agua dulce proveniente de agua de pozo con sal de mar comercial, fotoperiodo de luz natural y temperatura de  $10 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ . Estas condiciones se mantuvieron durante el bioensayo cambiando solo el pH a las que fueron expuestos los embriones de cada tratamiento. Para obtener el pH del agua de los tratamientos con pH ácido se utilizó ácido clorhídrico (HCl) y para el pH básico hidróxido de sodio (NaOH), ambas soluciones a 0,1 N.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

Embriones con disco embrionario en desarrollo fueron seleccionados al quinto día post fertilización mediante microscopio estereoscópico e incubados en placas Petri estériles a pH de 3, 5, 7, 9, 11 y 13. Cada tratamiento se realizó con 3 réplicas y 100 embriones por réplica. De cada tratamiento los embriones muertos fueron retirados y contabilizados diariamente, el recambio total del agua por placa se realizó diariamente.

Para cuantificar el efecto del pH en los embriones se determinaron las siguientes variables: supervivencia embrionaria, que correspondió a la diferencia entre el número total de embriones al inicio del periodo experimental y el número total de embriones eclosionados al final de dicho periodo expresados en porcentaje día<sup>-1</sup>. Periodo embrionario (*th50%*), definido como el intervalo de tiempo desde la fertilización del huevo hasta que el 50% de ellos eclosionara, expresado en días, y Periodo de eclosión (*te50%*), definido como el intervalo de tiempo desde el día que eclosionó el primer embrión hasta que eclosionó el 50% de ellos, expresado en días.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de supervivencia embrionaria de los distintos tratamientos se presentan como media matemática y su desviación estándar. Se utilizó análisis de varianza de una vía y test de Tukey para determinar diferencias *a posteriori* ( $P < 0,05$ ). El test de Shapiro-Wilk y Levene se emplearon para evaluar los supuestos de normalidad y homocedasticidad, respectivamente. Los datos porcentuales se transformaron mediante la transformación angular (Sokal & Rohlf 1980). Para estimar el periodo embrionario y el periodo de eclosión se utilizó la regresión Probit graficando el porcentaje de ovas eclosionadas ( $H, \%$ ) contra el tiempo ( $t, \text{días}$ ) y para linealizar la curva ( $H, \%$ ) fueron convertidos a unidades Probit ( $y$ ) y graficado contra el logaritmo del tiempo ( $x = \log t$ ) usando la regresión lineal  $y = A + Bx$  (Kamler 2002). Los análisis anteriormente señalados se realizaron empleando el software SPSS 20 (IBM® SPSS® Statistics).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA

Los tratamientos a pH 3 y 13 generaron 100% de mortalidad, en ambos casos los embriones no superaron las 36 h de vida. En los restantes tratamientos a pH 5; 7; 9 y 11 la supervivencia embrionaria expresada en porcentaje fue de  $38,0 \pm 7,2$ ;  $78,7 \pm 1,2$ ;  $45,4 \pm 9,3$  y  $33,3 \pm 4,2$ , respectivamente. El mayor porcentaje promedio se presentó en el tratamiento de pH 7 y los menores fueron para los tratamientos de pH 11 y 5 con diferencias significativas entre el tratamiento de pH 7 *versus* los restantes tratamientos ( $F = 32,09_{(3,8)}, P < 0,05$ ). La supervivencia embrionaria se estabilizó posterior a los 5 días post-eclosión (Fig. 1).

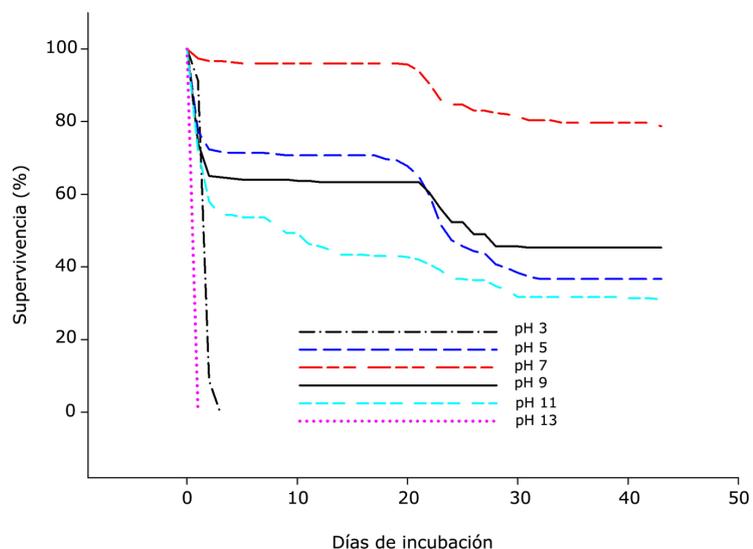


Figura 1. Días de incubación de embriones de *Galaxias maculatus* sometida a diferentes tratamientos de pH / Days incubation embryos *Galaxias maculatus* subjected to different pH

**Tabla 1. Valores de la regresión Probit para estimar el periodo embrionario y el periodo de eclosión expresado en días de embriones de *Galaxias maculatus* incubados a 4 niveles de pH / Values Probit regression to estimate the embryonic period and the hatching period expressed in days embryos *Galaxias maculatus* incubated at 4 levels of pH**

pH	Periodo embrionario 50% (días)	Ecuación de la recta del periodo embrionario	Periodo de eclosión 50% (días)	Ecuación de la recta del periodo de eclosión
5	30,4	Y = -4,6814 + 0,1540x	9,4	Y = -1,4479 + 0,1540x
7	29,5	Y = -4,7868 + 0,1624x	8,5	Y = -1,3760 + 0,1624x
9	32,2	Y = -4,3967 + 0,1365x	9,2	Y = -1,2572 + 0,1365x
11	28,8	Y = -4,8282 + 0,1677x	4,9	Y = -0,6805 + 0,1397

El periodo embrionario total promedio expresado en días fue de  $33,3 \pm 0,57$ ;  $33,0 \pm 1,73$ ;  $29,0 \pm 1,73$  y  $34,3 \pm 7,5$  a pH 5, 7, 9 y 11, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos ( $F= 1,01_{(3,8)}$ ,  $P > 0,05$ ). En la Tabla 1 se entregan los valores de la ecuación Probit para la estimación del periodo embrionario al 50% para cada tratamiento de pH.

El periodo de eclosión total expresado en días fue de  $18,6 \pm 0,57$ ;  $17,3 \pm 2,51$ ;  $16,0 \pm 0,0$  y  $12,3 \pm 2,3$  a pH 5, 7, 9 y 11, respectivamente, con diferencias significativas ( $F= 7,44_{(3,8)}$ ,  $P < 0,05$ ), entre el pH 11 *versus* el pH 5 y 7. En la Tabla 1 se entregan los valores de la ecuación probit para la estimación del periodo de eclosión al 50% para cada tratamiento de pH.

De acuerdo a los resultados los embriones de *Galaxias maculatus* sobreviven más a pH 7 y la supervivencia disminuye en la medida que se alejan de este pH y no son capaces de tolerar los pH extremos de 3 y 13 los cuales provocaron 100% de mortalidad embrionaria. Al respecto Jellyman & Harding (2014) determinaron que las larvas de *G. maculatus*, no sobreviven a pH 4,5 y en cambio los adultos si sobreviven a pH 4,0, demostrando que los estadios tempranos son más sensible que los adultos.

West *et al.* (1997) evaluaron la respuesta de 9 especies nativas de peces de agua dulce frente a las variaciones de pH, determinando que la mayoría evitaron valores de pH sobre 9,5 excepto *Galaxias maculatus*. Esta capacidad de resistir pH básico también se observó en el embrión que toleró un pH constante extremo de 11, sin embargo el porcentaje de supervivencia embrionaria a este pH fue significativamente menor que a pH neutro. Considerando el pH 7 como el óptimo, *G. maculatus* resistió mejor el pH básico que el pH ácido; en este caso a pH de 5 y 3 se obtuvieron valores de supervivencia de 38,0 y 0% respectivamente, mientras que a pH de 9 y 11 las supervivencias fueron de 45,4 y 33,3%. En concreto, *G. maculatus* soporta un gradiente mayor de pH básico que ácido

durante su desarrollo temprano. Sin embargo, uno de los mayores problemas que existe con pH básicos, es su toxicidad (Abernathy 2004).

Lee & Gerking (1980) demostraron que los huevos de los peces son más sensibles a aguas con pH ácido durante sus primeras horas después de la fertilización. Stoessel *et al.* (2015), encontraron que *Galaxias fuscus* desova en ambientes con pH entre 5,7 y 7,1. Cleveland *et al.* (1986) e Ingersoll *et al.* (1990) encontraron que las concentraciones de pH entre 4,5 a 5,5 disminuyeron la supervivencia de las ovas con ojo, mientras que Kwain & Rose (1985) señalan una mortalidad de 100% para las ovas de trucha de arroyo *Salvelinus fontinalis* a exposiciones a pH del agua de 4,5.

Los resultados obtenidos concuerdan con estudios relacionados con la incidencia del pH en la supervivencia embrionaria, al respecto Kwain & Rose (1985) en esta etapa, asumen como primera causa de mortalidad de la trucha de arroyo *S. fontinalis* la imposibilidad de romper el corión, lo cual fue observado al nivel de pH 4,5, comúnmente a pH 5,0 y escasamente a pH 5,5. Según Law *et al.* (2002), los niveles bajos de pH inhiben la enzima que es requerida para ablandar el corion previo a la eclosión, lo que concuerda con Abernathy (2004) quien menciona que los bajos niveles de pH del agua perjudican la función de la enzima de eclosión (corionaza), lo que puede ser tóxico para las larvas recientemente eclosionadas y pueden inhibir la hidratación y turgencia adecuada del huevo.

Según Peterson & Martin (1982) otra posible causa del incremento de la mortalidad a pH ácido, sería la disminución de la captación de agua en el proceso de hidratación de la ova recién fertilizada a niveles de pH ácidos, sugiriendo que reducidas captaciones de agua a bajos pH podrían causar que el huevo sea más susceptible a shocks mecánicos. También Rombough & Jensen (1985) encontraron en *O. mykiss* que la hidratación y presión interna aparente de los huevos fue

disminuida significativamente en todos los niveles de pH ácidos probados; estos mismos investigadores en 1984, encontraron que la hidratación estuvo inhibida significativamente a niveles de pH 5,1, y menos después de 2 h de exposición a niveles de pH 5,5, y menos después de 24 h, determinando que los huevos de Steelhead absorbieron significativamente menos agua a pH 5,5 y fueron significativamente más sensibles a la deformación mecánica a pH 6,0 que los que estuvieron a pH 7,2. El bajo pH tuvo un gran efecto durante el endurecimiento. La exposición a bajo pH después del endurecimiento redujo significativamente la captación de agua y aumentó la susceptibilidad a la deformación mecánica, pero, a diferencia de los efectos causados por la exposición durante el endurecimiento, los cambios fueron completamente reversibles. Peterson & Martín (1982) sugirieron que las reducciones en la cantidad del fluido perivitelino a bajo pH podría aumentar la susceptibilidad de los huevos a lesiones físicas, al encontrar que el contenido de agua de las ovas disminuye con el pH de incubación, concluyendo así que la captación de agua de las ovas de salmón del Atlántico parece ser completamente sensible a bajos pH, especialmente bajo 5,0.

En cuanto al porcentaje de eclosión en este trabajo se obtuvo que la mejor condición fue el resultado por el tratamiento de pH 7 el cual presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) con respecto a los restantes tratamientos. En general exceptuando el pH neutro los mejores porcentajes de eclosión fueron alcanzados en los niveles básicos y un menor porcentaje para los tratamientos ácidos. Claramente el nivel óptimo de pH del agua para asegurar un exitoso proceso de eclosión para *Galaxias maculatus* es un pH neutro o cercano a neutro.

En relación al periodo de incubación no se observaron diferencias entre los distintos tratamientos, a diferencia que otros factores ambientales como la temperatura y salinidad si generan diferencias significativas en relación a este parámetro (Barile *et al.* 2013a, b; 2015). En relación al periodo de eclosión se observaron diferencias significativas entre el pH neutro y los pH extremos de 5 y 11.

La incidencia del pH en el desarrollo de las primeras etapas de vida del puye *Galaxias maculatus* le confieren un rol de factor principal dentro de las variables de la química del agua, el cual no puede obviarse al momento de cultivar organismos acuáticos. Es esencial para el éxito en la producción de larvas, sea para fines comerciales o de repoblamiento, mantener el pH del agua en valores cercanos a pH 7, determinando que la supervivencia será menor en la medida que los valores se alejen de un pH neutro.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento de la Piscicultura Pulelfu S.A., de Osorno en el desarrollo del trabajo.

## LITERATURA CITADA

- Abernathy M. 2004.** Effect of water hardness on the survival of rainbow sharkminnow (*Epalzeorhynchus frenatum*) eggs and larval. Thesis of Master of Science, University of Florida, Gainesville, 29 pp.
- Barile J, A Bórquez, P Dantagna, A Mardones, J Quevedo, I Valdebenito & R Vega. 2003.** Antecedentes para el cultivo del puye, 144 pp. Universidad Católica de Temuco, Temuco.
- Barile J, M Escudero & E Carreño. 2013a.** Efecto combinado de la temperatura y salinidad sobre la supervivencia embrionaria de *Galaxias maculatus*. Revista de Biología Marina y Oceanografía 48(3): 641-645.
- Barile J, E Carreño, M Escudero & A Bello. 2013b.** Efecto de la temperatura en la supervivencia embrionaria del puye *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842). Latin American Journal of Aquatic Research 41(5): 839-845.
- Barile J, M Escudero, E Carreño & D San Martín. 2015.** Efecto de la salinidad en la supervivencia embrionaria de puye *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842). Latin American Journal of Aquatic Research 43(2): 282-286.
- Bergerhouse D. 1992.** Lethal effects of elevated pH and ammonia on early life stage of walleye. North American Journal of Fisheries Management 12: 356-366.
- Cleveland L, E Little, E Hamilton, S Bukler & J Hunn. 1986.** Interactive toxicity of aluminium and acidity to early life stage of brook trout. Transaction of the American Fisheries Society 115: 610-620.
- Hepher B. 2001.** Cultivo de peces comerciales, 316 pp. Limusa Noriega, México.
- Ingersoll C, D Mount, D Gulley, T Lapoint & H Berrgman. 1990.** Effects of pH, aluminum and calcium on survival and growth of eggs and fry of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 47: 158-1592.
- Jellyman P & S Harding. 2014.** Variable survival across low pH gradients in freshwater fish species. Journal of Fish Biology 85(5): 1746-1752.
- Kamler E. 2002.** Ontogeny of yolk-feeding fish: an ecological perspective. Reviews in Fish Biology and Fisheries 12(1): 79-103.
- Kwain W & G Rose. 1985.** Growth of brook trout *Salvelinus fontinalis* subject to sudden reductions of pH during their early life history. Transactions of the American Fisheries Society 114: 564-570.
- Law A, Y Wong & A Abol-Munafi. 2002.** Effect of hydrogen ion on *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) egg hatchability in brackish water. Aquaculture 214: 247-251.

- Lee R & S Gerking. 1980.** Sensitivity of fish eggs to acid stress. *Water Research* 14: 1676-1681.
- Meyer J & J Hansen. 2002.** Subchronic toxicity of low dissolved oxygen concentrations, elevated pH, and elevated ammonia concentrations to Lost River Suckers. *Transactions of the American Fisheries Society* 131: 656-666.
- Peterson R & D Martin-Robichaud. 1982.** Water uptake by Atlantic salmon ova as affected by low pH. *Transactions of the American Fisheries Society* 111: 772-774.
- Rombough P & J Jensen. 1985.** Reduced water uptake and resistance to deformation in acid-exposed eggs of steelhead *Salmo gairdneri*. *Transactions of the American Fisheries Society* 114: 571-576.
- Sokal R & J Rohlf. 1980.** *Introducción a la bioestadística*, 362 pp. Reverté, Barcelona.
- Stoessel D, A Raadik & R Ayres. 2015.** Spawning of threatened barred *Galaxias*, *Galaxias fuscus* (Teleostei: Galaxiidae). *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 137: 1-6.
- West D, J Boubéé & R Barrier. 1997.** Responses to pH of nine fishes and one shrimp native to New Zealand freshwater. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 31: 461-468.
- Xuemin Y & D Randall. 1991.** The effect of water pH on swimming performance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). 1991. *Fish Physiology and Biochemistry* 9(1): 15-21.

---

Recibido el 2 de julio de 2015 y aceptado el 21 de diciembre de 2015

Editor: Claudia Bustos D.