



“ Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible ”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE LOS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE

Trabajo de graduacion

**Eclosión de huevos de Artemia (*Artemia franciscana*,
Kellogg) a Nivel de Laboratorio en la Universidad
Nacional Agraria Managua, Nicaragua**

AUTOR

Br. Harvin Antonio Cornejo Gómez

ASESORES

Ing. Msc. Francisco Giovanni Reyes Flores
Lic. Rosa María Reyes Pérez
Lic. Heraldo Salgado Aráuz

Managua, Nicaragua

Febrero, 2016



“ Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible ”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE LOS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE

Trabajo de graduacion

Eclosión de huevos de Artemia (*Artemia franciscana*, Kellogg) a Nivel de Laboratorio en la Universidad Nacional Agraria Managua, Nicaragua

AUTOR

Br. Harvin Antonio Cornejo Gómez

ASESORES

Ing. Msc. Francisco Giovanni Reyes Flores
Lic. Rosa María Reyes Pérez
Lic. Heraldo Salgado Aráuz

Managua, Nicaragua

Febrero, 2016



“ Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible ”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE LOS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE

**Este Trabajo de Graduacion fue evaluado y aprobado por el
Honorable Tribunal Examinador designado por la Decanatura
de la Facultad de Recursos Naturales y del Ambiente, como
requisito parcial para optar al Titulo Profesional de:**

Ingeniero Forestal

Ing. Jolvin Mejía
Presidente

Ing. Mercedes González
Secretario

Lic. Martha M. Salgado
Vocal

Managua _____ de _____ del año 2016

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCION	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE FIGURA	iii
INDICE DE FOTOS	iv
INDICE DE GRAFICOS	v
INDICE DE CUADROS	vi
INDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRAC	ix
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo general	2
2.2 Objetivos específicos	2
III. MATERIALES Y METODOS	3
3.1 Ubicación del estudio	3
3.2 Diseño del estudio	3
3.3 Diseño del estudio	4
3.4 Descripción del estudio	4
3.5 Variables a evaluar	6
3.5.1 Toma de pH de los tratamientos	6
3.5.2 Toma de temperatura de los tratamientos	6

3.5.3 Medición de sobrevivencia	6
3.5.4 Sistema de iluminación calorífica	7
3.5.5 pesado de huevos de <i>Artemia</i> para su eclosión	8
3.5.6 Alimentación de las <i>Artemias</i> en estudio	8
3.5.7 Producción de oxígeno para los tratamientos en estudio	9
3.5.8 Materiales utilizados para la toma de datos	9
3.6 Agregación de sal a los tratamientos	10
3.7 Manejo del ensayo	11
3.7.1 Tratamiento del agua del ensayo	11
3.8 Análisis de datos	11
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4.1 Análisis de temperatura de tratamientos a las 10:00 A.M y 4:00 P.M	12
4.2 Análisis de pH de los tratamientos a las 10:00 A.M y 4:00 P.M	14
4.3 Porcentaje de sobrevivencia de <i>Artemia franciscana</i>	17
4.3.1 Porcentaje de sobrevivencia de <i>Artemia franciscana</i> a los 16 días	18
4.3.1.1 Porcentaje de sobrevivencia general del ensayo	21
4.4 Manejo para la eclosión de huevos de <i>Artemia</i> a nivel de laboratorio	22
4.4.1 Manejo para tratamiento que registró mayor eclosión	23
4.5 Recomendaciones para futuros cultivos de <i>Artemia</i>	24
V. CONCLUSIONES	25
VI. RECOMENDACIONES	26

VII. LITERATURA CITADA

27

VIII. ANEXOS

28

Dedicatoria

Dedico este trabajo primeramente a **DIOS** por haberme permitido nacer y ser el quien ayudara a mi formación guiando mis pasos en cada camino y aventura que decidía emprender en el transcurso de mi vida, gracias por ello DIOS padre todopoderoso guía siempre mis pasos y no me abandones cobíjame bajo tu sombra omnipotente y guía mis pasos por el camino correcto y del bien apartándome de todo mal Amen.

En segundo plano le dedico este trabajo de titulación a mi madre **Auxiliadora del Carmen Gómez Zamora** quien fue padre y madre para mi y que nunca dejo que me callera al contrario me motivaba a seguir adelante y siempre se preocupó por mi educación pues es su filosofía decir que es lo mejor que me puede heredar y tomo el riesgo junto conmigo de llevar acabo este experimento dándome el apoyo económico que necesitaba para realizar esta investigación. Madre ni dando mi vida a cambio podría pagar todo lo que has hecho por mi gracias muchas gracias mi viejita linda.

Dedico a mis hermanas este trabajo quienes me han ayudado de diversas maneras para lograr culminar mis estudios dándome su apoyo de diversas maneras.

Dedico este trabajo a mi abuelo **Juan Antonio Gómez Lagos** Q.E.P.D que me dijo un día que yo podía lograr lo que me propusiera y que demostrara a quienes me criticaban que estaban equivocados gracias viejo DIOS te tenga en su santa gloria.

“SI DIOS ESTA CONMIGO, QUIEN CONTRA MI”

Harvin Antonio Gómez

Agradecimientos

Agradezco primeramente a **DIOS** por haberme guiado y darme sabiduría y paciencia para la realización de este trabajo de titulación.

Agradezco a mi madre **Auxiliadora del Carmen Gómez Zamora** por haberme apoyado económicamente para auto financiar este trabajo de titulación y haberme costado los gastos de la universidad a lo largo de la duración de la carrera y así por haberme mantenido todo este tiempo.

De igual manera le agradezco al **Ing. MSC. Francisco Reyes Flores** por haberme dado un voto de confianza y darme la oportunidad de realizar este ensayo bajo su tutoría guiándome en todo momento desde que iniciamos este proyecto.

Agradezco al **Ing. MSC. Álvaro Noguera Talavera** quien me presto su ayuda sin esperar nada a cambio al momento de análisis de datos arrojados por el software utilizado para concluir el análisis estadístico de esta investigación.

Así también al **Lic. Heraldo Salgado Aráuz** encargado del laboratorio quien estuvo en cada momento apoyándome en la etapa de laboratorio exigiéndome para que no descuidara el trabajo investigativo.

A la **Ing. Yasmina Carvajal** quien me ayudo al procesamiento de los datos obtenidos en la etapa de laboratorio y me brindara su tiempo sin pedir nada a cambio mas que solo llevándose la satisfacción de ayudar a sus estudiantes.

A la **Lic. Rosa Maria Reyes Pérez** quien me apoyara en la redacción del protocolo de dicho trabajo y así apoyarme para la jornada científica universitaria donde se expuso la preliminar de este trabajo.

Les agradezco a mis compañeros y amigos Camilo Rene Solórzano García y Luis Marcial Gonzales Romero por compartir ideas de como llevar a cabo este proyecto investigativo.

Harvin Antonio Gómez

ÍNDICE DE FIGURA

	PÁGINA
1. Esquema de establecimiento del ensayo de <i>A. franciscana</i> en Laboratorio de Ciencias Biologicas de la Universidad Nacional Agraria, 2014.	4

INDICE DE FOTOS

	PAGINA
1. Conteo de <i>Artemias</i>	7
2. Estructura del sistema de iluminación y calor	7
3. Pesado de huevos de <i>Artemia</i>	8
4. Motor HP 200 que producía el oxígeno de los tratamientos	9
5. Pesado de sal	10

INDICE DE GRAFICAS

	PAGINA
1: Variación de temperatura en los días de la eclosión del ensayo	12
2: Asociación de temperatura con tratamientos durante evaluación ensayo	13
3: Análisis, temperatura media de tratamientos en estudio por la mañana y la tarde 2015	14
4: variacion de pH en los dias de eclosion de <i>Artemia</i> durante evaluacion del ensayo	15
5: Asociacion de pH con tratamiento, determinar significancia	16
6: Análisis pH de tratamientos en estudio por la mañana y la tarde	17
7: Porcentaje de sobrevivencia de <i>Artemia</i> a los 16 días	20
8: porcentaje de sobrevivencia general del ensayo	21

INDICE DE CUADROS

	PÁGINA
1: Coeficiente de correlación de Pearson	18

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
1. Formato de toma de pH de los cuatros tratamientos en estudio	28
2. Formato de toma de datos de temperatura de los cuatros tratamientos en estudio	28
3. Formato de control de alimentación de <i>Artemias</i>	28
4. Formato Toma de estadio de <i>Artemia</i>	28
5. Formato toma de sobrevivencia de <i>Artemia</i>	28

RESUMEN

En el estudio de eclosión de *Artemia franciscana* a nivel de laboratorio, tuvo como objetivo determinar el tipo de tratamiento que se adapta a condiciones de laboratorio brindando buenos resultados para la eclosión del crustáceo *Artemia* (*Artemia franciscana Kellogg*). La metodología utilizada consistió en la toma de datos en el laboratorio evaluando los siguientes tratamientos: Toma de pH de los ensayos; Toma de temperatura; Salinidad; Medición de Supervivencia. Una vez establecido el estudio se procedió a poner el huevo de *Artemia*, en lo cual se pusieron a eclosionar durante 48 horas para iniciar el proceso eclosivo del crustáceo. El manejo que se aplicó en el estudio consistió en tomar datos de temperatura y del pH para llevar un control y seguimiento a la eclosión de *Artemia* así como el control de la alimentación que consistía a base de una dieta de pastilla de alga *Spirulina máxima* triturada. De acuerdo al análisis estadístico realizado con metodología de DUNCAN, correlación de Pearson y procesado en el programa estadístico INFOSTAT indican que la mejor eclosión se obtuvo en el tratamiento D con un 65.40% dando pautas de ser el tratamiento que mejor se adaptó a las condiciones de laboratorio. La supervivencia de los otros tratamientos es positiva y adaptable a las condiciones de laboratorio donde es recomendable utilizar recipientes con mayor capacidad de almacenamiento de agua. Recomendándose para futuros cultivos de *Artemia* se puede llevar a cabo el manejo ya implementado en el Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Agraria para un mayor rendimiento en la supervivencia del estudio. Y seguir proporcionando información para la eclosión de dicho crustáceo que representa una opción alimenticia de bajo impacto a productores pesqueros del país.

ABSTRACT

In the reproduction test *Artemia franciscana* in the laboratory level, we aimed to determine the type of test that fits laboratory conditions giving good results for the reproduction of the crustacean *Artemia* (*Artemia franciscana* Kellogg). The methodology involved the collection of data in the laboratory to evaluate the following treatments: Taking pH of the trials; Taking temperature; Salinity; Measurement of Survival. Once we established the test, we proceeded to put the egg of *Artemia* in which they began to hatch for 48 hours to start the reproductive process of the crustacean. The handling that was applied to the test data, consisted of taking temperature and pH data to control and monitor the *Artemia* production and also to control the food, that was based on a seaweed crushed *Spirulina maximum*. According to statistical analysis using DUNCAN methodology, Pearson correlation and processed in the statistical program INFOSTAT indicate that the best reproduction was obtained in the test D with 65.40% giving the test patterns to be best adapted to the conditions of laboratory. The survival of the other test is positive and adaptable to laboratory conditions where it is advisable to use containers with larger storage capacity of water. Recommending that for future crops *Artemia* can carry out the management and implemented in the Laboratory of Biological Sciences of the National Agricultural University for higher performance in the survival of the trial. And continue to provide information for reproduction of the crustacean that is a low impact food choice to fish producers in the country.

I. INTRODUCCIÓN

El crustáceo *Artemia* (*Artemia franciscana*, Kellogg) es originario del Norte de América hasta Centro América y el Caribe. Este crustáceo es alimento natural de especies de origen marino debido a que su hábitat natural es el mar y los lagos de concentración salina que se encuentran en Norte América, las propiedades que posee *A. franciscana* como alimento vivo de peces, es proporcionar al pez que la consuma, una dieta rica en proteínas y vitaminas que mejoraran la alimentación del pez y su ciclo reproductivo (Castro, 2005).

A nivel mundial *A. franciscana* se ha reproducido en Estados Unidos, Centro América y el Caribe así como en ciertos países de Europa y Asia que comercializan *A. franciscana* como alimento vivo para acuarios, criaderos y santuarios de peces esto con la finalidad de proveer a las especies alimentos vivos con gran potencial de proteínas y valor energético (Castro, 2005). Es importante destacar que *Artemia* es alimento de toda la cadena trófica de zooplancton acuático.

En Nicaragua en el año 1989 la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) realizó dos estudios que informan de la reproducción artesanal de *A. franciscana* discutiendo generalidades de esta sin hacer un minucioso ensayo que determinen el valor económico y la importancia que tiene a niveles proteicos y su valor alimenticio en pro de mejorar la producción de peces a nivel de acuicultura.

El crustáceo *A. franciscana* es una alternativa de alimento para peces, que vendría hacer una opción de alimentación que ayudaría a la reproducción y producción de peces mejorando su crianza debido a que se les daría un alimento vivo y no tratado industrialmente, lo que además brindaría un acuario mas limpio para el pez que lo ingiriera (APROMAR, 2004).

En el Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Agraria (UNA) se logró eclosionar el crustáceo *A. franciscana* para contribuir a la generación de información científica debido a que existe poca información de este crustáceo en nuestro país.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar el tipo de tratamiento que se adapta a condiciones de laboratorio brindando buenos resultados para la eclosión del crustáceo *Artemia* (*Artemia franciscana*, Kellogg).

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la sobrevivencia de *Artemia franciscana* en cuatro tratamientos sometidos a estudios en el Laboratorio de Ciencias Biológicas de la UNA.
- Describir el manejo apropiado para la eclosión de *Artemia franciscana* a nivel de laboratorio.
- Brindar recomendaciones para llevar a cabo la eclosión de *Artemia franciscana* a nivel de laboratorio.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del estudio

El presente estudio se llevó a cabo en la Universidad Nacional Agraria, la cual se localiza en el km 12 y ½ de la carretera panamericana norte, siendo el sitio exacto dentro de la universidad, el Laboratorio de Ciencias Biológicas perteneciente a la Facultad de Recursos Naturales y del Ambiente (FARENA), este se ubica al costado norte de la Universidad Nacional Agraria (UNA) contiguo a las instalaciones de cultura.

3.2 Diseño del ensayo

El ensayo se estableció en cuatro frascos de plásticos con capacidad de almacenamiento de agua que iban de un litro a cuatro litros, el criterio utilizado para seleccionar cuatro frascos con capacidad de almacenamiento de agua previamente definido, se dio a través de pláticas con el productor Mauricio Rivas quien eclosiona el crustáceo *Artemia franciscana* para alimentar sus peces en acuarios que están incluidos en la decoración de su hogar de habitación donde el comentaba que es más fácil el manejo en frascos pequeños para la limpieza del hábitat de las *Artemias* y así llevar un control de la eclosión de los huevos.

Se estableció un sistema de iluminación y calor con tres bujías de 25 watts cada una para propiciar la incubación de los huevos de *Artemia* en tres de los tratamientos, quedando el tratamiento A o tratamiento testigo sin bujía de incubación de los huevos, siendo testigo solo durante la eclosión de los huevos y luego paso a ser un tratamiento general del ensayo.

El sistema de iluminación y calor se estableció con la finalidad que el calor producido por las bujías propiciara mayor numero de eclosión en los tratamientos tomando como ejemplo la eclosión de huevos en granjas avícolas donde se pone luz a los huevos para generar influencia en la eclosión de estos.

Se colocó un motor HP 200 para generar producción de oxígeno a los cuatros tratamientos quedando establecido de la siguiente manera, el cual a su vez actuaba como un compresor que generaba cierta producción de oxígeno. Véase figura 1

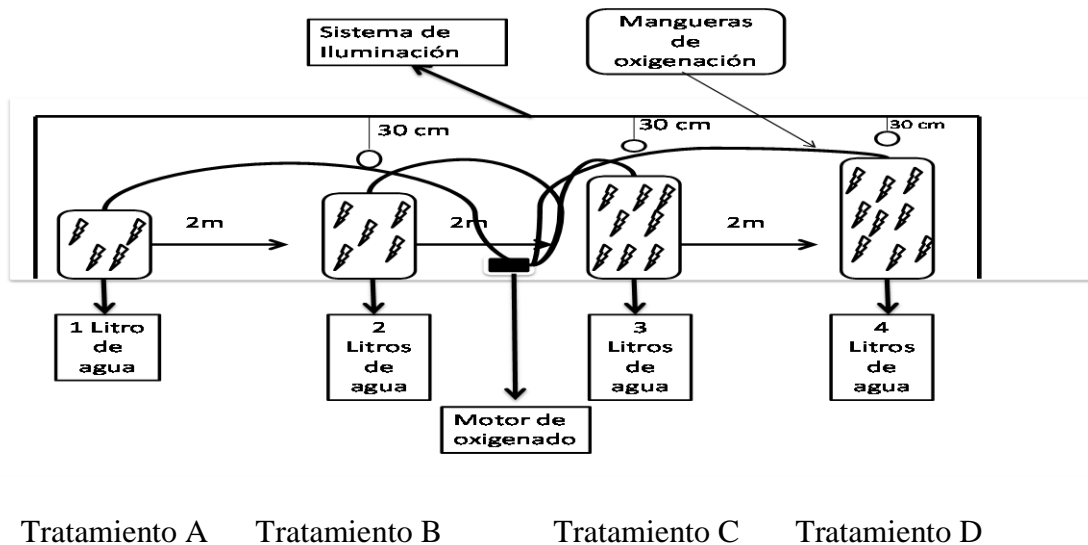


Figura 1. Esquema de establecimiento del ensayo de *Artemia franciscana* en el Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Agraria, 2015.

3.3 Diseño del estudio

El ensayo consiste en un Diseño Completamente Aleatorio trifactorial con una réplica por tratamiento (DCA), se asume que las unidades experimentales de una población se asignan al azar a grupos que generalmente son llamados tratamientos (en nuestro caso los tratamientos son la toma de datos del ensayo en estudio) (Universidad de Colombia, 2002).

Este tipo de Diseños Completamente Aleatorio trifactorial por tratamiento se elaboran previamente con unidades de muestreo definidas ya sea una constante en la alimentación u horario definido de tomas de datos invariables, (siendo puntuales a la hora de la toma de datos de los cuatro tratamientos que fueron establecidos previamente) (Universidad de Colombia, 2002).

3.4 Descripción del ensayo

El ensayo tuvo una duración de 30 días en las instalaciones del Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Agraria con el objetivo de determinar que

tratamiento de los cuatros establecidos era el más factible para la eclosión en laboratorio del crustáceo *A. franciscana*.

Los 4 tratamientos se denominaron: Tratamiento A o tratamiento testigo que constaba con un sistema de oxigenación, sin sistema de iluminación y calor considerándose este tratamiento testigo solo durante el periodo de eclosión de los huevos de *Artemia*, el tratamiento B estaba colocado en un recipiente con capacidad de almacenar dos litros de agua con sistema de iluminación y calor y sistema de oxigenación, el tratamiento C se encontraba en un recipiente con capacidad de almacenar tres litros de agua constando con sistema de iluminación y calor y sistema de oxigenación y el tratamiento D encontrándose en un recipiente con capacidad de almacenar cuatros litros de agua contando con sistema de iluminación y calor y sistema de oxigenación teniendo estos definidos sus tratamientos (alimentación, toma de pH y temperatura) y periodos de tiempos de observación para llevar un control de lo que sucedía en el ensayo previamente mencionado.

En el estudio se consideraron tres factores por tratamientos quedando estos definidos de la siguiente manera.

Factor 1: Nivel de agua, siendo los tratamientos los 4 diferentes niveles de agua colocados en los recipientes que iban de un 1 litro de agua, 2 litros de agua, 3 litros de agua y 4 litros de agua.

Factor 2: Incidencia de eclosión, siendo el tratamiento la luz que se coloco en tres de los cuatros tratamientos, durante la eclosión por 48 horas y la no presencia de luz en el tratamiento A, que se considero testigo durante el periodo de tiempo que dura la eclosión de los huevos de *Artemia*.

Factor 3: Alimentación, siendo el tratamiento en este factor la variación en la cantidad de alimento que se le proporcionaba a cada tratamiento por la mañana y por la tarde, estando la cantidad de alimento distribuida de la siguiente manera, tratamiento A 0.15 gramos, tratamiento B 0.30 gramos, tratamiento C 0.45 gramos y al tratamiento D 0.60 gramos.

3.5 Variables a evaluar

Las variables que se tomaron en cuenta durante los 30 días que duro el ensayo fueron la toma de pH, Temperatura y la Sobrevivencia en los cuatros tratamientos en estudio.

3.5.1 Toma de pH de los tratamientos

El pH se tomaba a diario en dos periodos de tiempos previamente establecidos esto con el objetivo de mantener regulado el pH del agua en los cuatros tratamientos que debe comprender un rango de 7 a 9, punto de acides, según Ríos, 2001. Para la eclosión del crustáceo, el punto de acides (pH) de los tratamientos se llevaba registrado en formatos elaborados previamente antes de iniciar el estudio. (Véase anexo 1).

3.5.2 Toma de temperatura de los tratamientos

La temperatura se tomaba a las 10:00 A.M de la mañana y 4:00 P.M de la tarde registrándose en formatos previamente establecidos para llevar un control de la variación de la temperatura con respecto al aumento de esta y así determinar un rango de temperatura al que debe darse la eclosión del ensayo. (Véase anexo 2).

3.5.3 Medición de sobrevivencia

Para medir la sobrevivencia se tomaron muestras de *A. franciscana* y se depositaron en platos Petri, seguidamente se contabilizó la cantidad de *Artemias* que salía una a una en cada muestra tomada de cada uno de los tratamientos (Véase foto 1), luego se sumaron el total de las muestras para sacar un promedio de la sobrevivencia. Se calculó porcentaje de mortalidad y de sobrevivencia aplicando la siguiente formula:

*Porcentaje de Mortalidad: Número de Individuos Muertos / Total de Individuos * 100*

Porcentaje de Sobrevivencia: N - % mortalidad

Donde:

N: Porcentaje Total del Número de individuo al (100 %)



Foto 1: Conteo de *Artemias* para cálculos de sobrevivencia, 2015.

3.5.4 Sistema de iluminación calorífica

Tomando en cuenta el principio de las granjas avícolas donde se coloca una red de bujías para propiciar cierta cantidad de calor para generar influencia en la eclosión de los huevos de gallina, se tomó como modelo este principio y se colocó un sistema de iluminación y calor para generar influencia en la eclosión de los huevos de *Artemia* y tener un mayor número de eclosión en los tratamientos.

Este sistema se colocó en el tratamiento B, tratamiento C y el tratamiento D por 48 horas esto con el objetivo de influir en la eclosión de los huevos de *Artemia* estando colocadas a 30 cm de la superficie del frasco una bujía de 25 watts la cual se apago luego de la eclosión de los huevos que duro 48 horas. (Véase foto 2).



Foto 2: Estructura del sistema de iluminación y calor, 2015.

3.5.5 Pesado de huevos de *Artemia* para su eclosion

Se colocaron 15 gramos de huevos de *Artemia* por tratamiento para su debida eclosión, en esta porción colocada en los cuatro tratamientos se contabilizaron 1,500 huevos de *Artemia*, para hacer el conteo de estos se utilizo un microscopio electrónico compuesto, de los 1500 huevos que se depositaron no todos eclosionaron debido a que pasan en reposo dentro del sobre donde se comercializan, una vez colocado los huevos es necesario realizar el manejo de control del pH y temperatura regulados, para tener una mayor eclosión de los huevos. (Véase foto 3).



Foto 3: Pesado de huevo de *Artemia* para colocar en eclosión, 2015.

3.5.6 Alimentación de *Artemias franciscanas* en estudio

La alimentación designada a *Artemia franciscana* es de origen vegetal siendo esta un alga que proporciona una serie de proteína, vitaminas, hierro y fosforo, así como también regula la cantidad de grasa en el cuerpo del animal que la ingiera manteniendo un nivel propicio de grasa en el cuerpo del individuo, y siendo *Artemia* un crustáceo rico en proteína y vitaminas, se considera el alga *Spirulina* como una buena dieta para el crustáceo.

La cantidad de alimento colocado en los tratamientos se definió de acuerdo al nivel de agua en dependencia de la suciedad que provocaba el alimento al momento de ser depositado en los frascos, entonces quedo establecida una relación de 0.15 gramos de alga *Spirulina* triturada por litro de agua para realizar limpieza del acuario sin mucha complicación tanto para el ensayista como para el crustáceo *Artemia franciscana*.

Las *Artemias* fueron alimentadas con alga *Spirulina máxima* que constituye una pastilla de origen vegetal, esta se trituraba y se le daba de comer a las *Artemias* a las 10 de la mañana y 4 de la tarde en las siguientes cantidades 0.15 gramos al tratamiento A, 0.30 gramos al tratamiento B, 0.45 gramos al tratamiento C y 0.60 gramos al tratamiento D. (véase anexo 3).

3.5.7 Producción de oxígeno para los tratamientos en estudio

Para la producción de oxígeno en los tratamientos se utilizó un motor HP 200 conectado con una red de mangueras para hacer llegar el oxígeno a los tratamientos donde el motor actuaba como un compresor que proporcionaba la oxigenación del agua para la sobrevivencia de *Artemias*. (Véase foto 4).



Foto 4: Motor HP 200 que producía el oxígeno de los tratamientos, 2015.

3.5.8 Materiales utilizados para la toma de datos

Para la toma de datos del estudio se utilizaron materiales en específicos que tomaban el pH y la temperatura, así tomando los datos de sobrevivencia, cómo ir viendo su desarrollo desde etapa nauplio a estado adulta, para distribuir correctamente la alimentación y realizar la limpieza del agua de los ensayos véase listado a continuación.

- ✓ Peachimetro digital de mesa multiparámetro electrónico compuesto
Marca: ADWA

Modelo: Ad1020 Kit De Mesa Multiparamétrico

- ✓ Microscopio Eclipse electrónico compuesto

Marca: Nikon

Modelo: Eclipse E200

- ✓ Estereoscopio de luz integrada electrónico compuesto

Marca: Heerbrugg

Modelo: Wild M3z

- ✓ Pesa electrónica Solo Peso gramera compuesta

Marca: COBOS

Modelo: SK-500

3.6 Agregación de sal a los tratamientos

A la hora de la preparación de los tratamientos se utilizó sal sin yodo para regular la acidez del agua utilizando 10 gr de sal por litro de agua quedando la distribución de sal por tratamiento de la siguiente manera: tratamiento A 10 gramos de sal, tratamiento B 20 gramos de sal, tratamiento C 30 gramos de sal y el tratamiento D 40 gramos de sal esta proporción fue determinada en el laboratorio mediante pruebas de regulación de pH. (Véase foto 5).

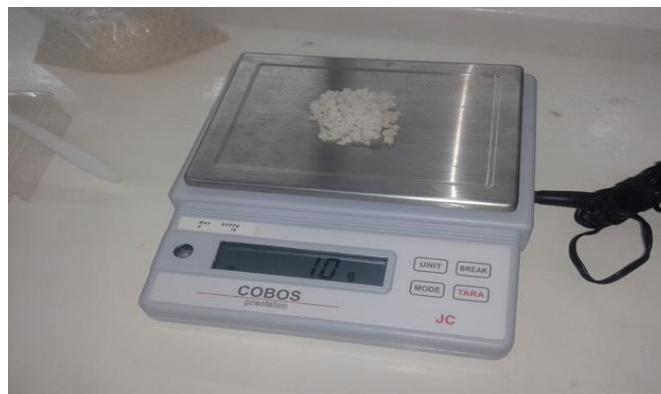


Foto 5: Pesado de sal sin yodo para utilizar en los tratamientos, 2015.

3.7 Manejo del ensayo

El manejo para los cuatro tratamientos fue el mismo sin tener variación en este durante el periodo de tiempo que duro el ensayo.

3.7.1 Tratamiento del agua del ensayo

El agua llega a tornarse de color verdusco debido al asentamiento de la pastilla *Spirulina máxima* que se le daba de alimento al crustáceo *Artemia* para eliminar los residuos que quedan de la pastilla se utilizó una jeringa, para retirar del fondo de los frascos los residuos de la pastilla que pueden llegar a fijar dióxido de carbono que se produce por la descomposición de residuos alimenticios que se le daba a *Artemia* que perjudicaría la reproducción de estas creando una inconsistencia en el micro hábitat establecido produciendo putrefacción en los cuatros tratamientos sometidos en estudio, al retirar los residuos de la pastilla de los frascos se rellenaban los frascos con agua previamente desclorada y salada para recuperar la cantidad de agua en los frascos perdida por la evaporación y la limpieza del agua presente en los tratamientos.

3.8 Análisis de datos

La evaluación estadística de los datos obtenidos de las variables en estudios se procesaron por medios del análisis de varianza (ANDEVA) y separación de medias por la prueba de rangos múltiples de Duncan con un error estadístico de 5% y confiabilidad del 95% utilizando un software estadístico llamado INFOSTAT.

Los datos de temperatura y pH fueron ordenados y analizados de acuerdo a la distribución realizada en el ensayo considerando las variaciones por tratamientos. Para el procedimiento del análisis de los datos se hicieron en tablas Excel siguiendo el orden del ensayo en cada uno de los tratamientos y las horas de toma de datos establecidas.

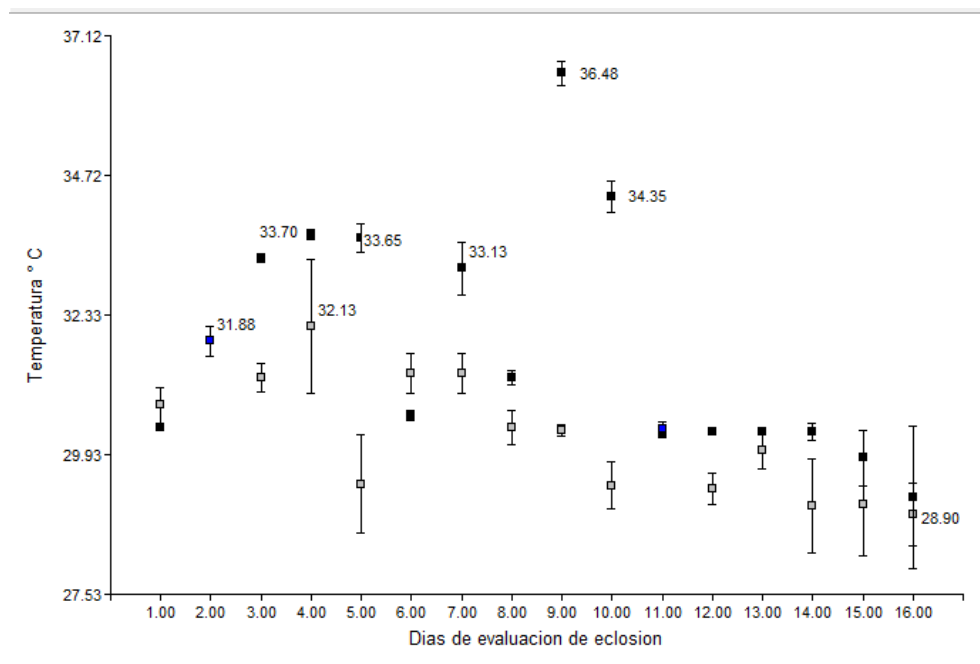
IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Análisis de temperatura de los tratamientos a las 10:00 am y 4:00 pm

Los valores de temperatura diaria para el tiempo de evaluación de la eclosión muestran diferencias entre días y el momento de registro de esta variable. La temperatura por la tarde muestra los valores más altos con un rango entre **29.02 °C y 36.48 °C**; con 29.02 °C como valor más bajo obtenido el día 16, y 36.48 °C como valor más alto registrado el día 9; aun así los valores de temperatura por la tarde muestran baja variabilidad en la muestra.

Los valores de temperatura tomada por la mañana durante el periodo de eclosión de *Artemia* fueron menores en comparación a las temperaturas de la tarde; sin embargo, es posible observar variabilidad en los valores a partir del día 4 hasta el final del ensayo. Las temperaturas matutinas se distribuyeron en un rango de entre 28.90 °C y 32.13 °C.

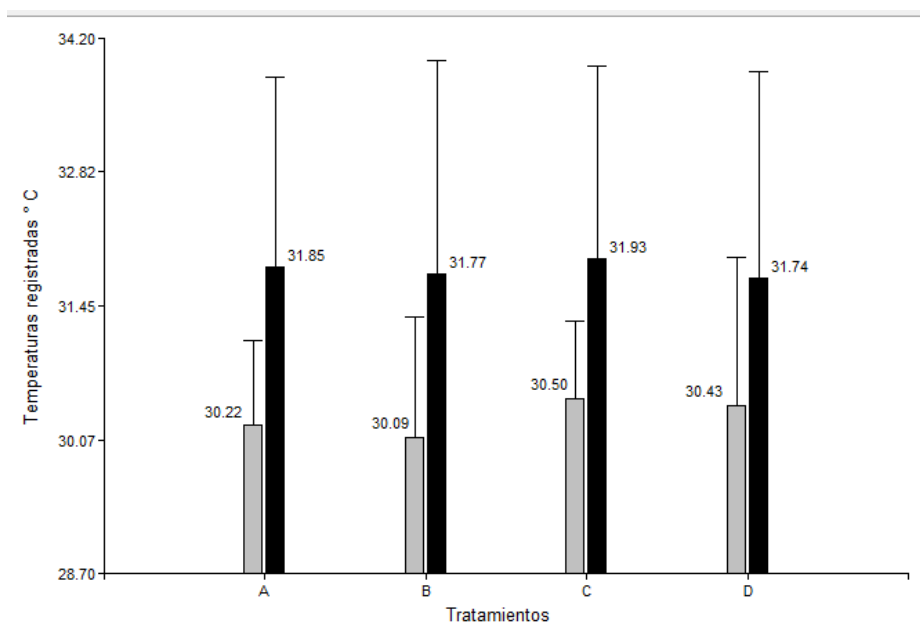
En la siguiente grafica se muestra la variación de la temperatura comparándola diariamente con respecto a la toma diaria de esta.



Grafica 1: Variación de temperatura en los días de estudio del ensayo.

Los valores promedios obtenidos para cada tratamiento durante la evaluación de la eclosión comparados a través de un análisis de varianza, no muestran diferencias significativas, sin embargo, los resultados de eclosiones por tratamientos muestran que los tratamientos B y D registraron la mayor cantidad de eclosiones; lo que puede estar asociado directamente a la temperatura prevaleciente (Sorgeloos, 1986).

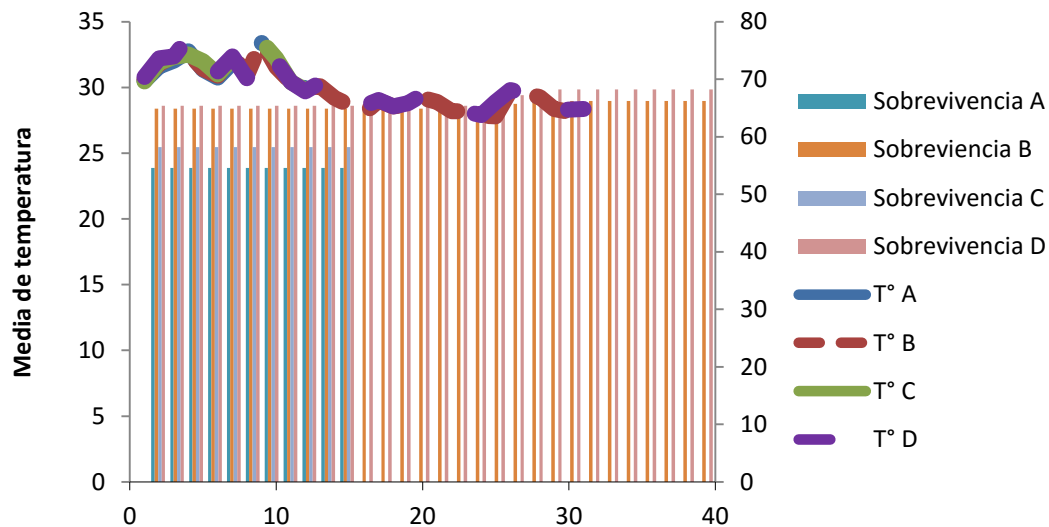
En la siguiente grafica se muestra la relación de la temperatura asociada a los tratamientos del ensayo.



Grafica 2: Asociacion de temperatura con tratamientos durante evaluacion del ensayo.

En la gráfica 3 se presenta la variación de la temperatura en cada uno de los tratamientos. Durante el periodo de tiempo del ensayo las temperaturas más altas registradas fueron hasta de 32.5°C y las más bajas de 30.4°C (Ver anexo 3), el tratamiento A obtuvo la temperatura más baja, con respecto a la sobrevivencia en estos tratamientos, en la primera quincena del ensayo correspondiente a la mitad del ensayo la eclosión de los huevos fue favorable lo que indica que la temperatura a la que se mantuvieron los tratamientos son propicias, siendo estas condiciones ambientales no significativas para su eclosión, según Ortega, 1991 reporta que de hecho *Artemia* sp puede vivir en condiciones ecológicas muy diversas y adversas soportando temperaturas que oscilan entre los 5°C y los 35°C.

Según análisis realizados de separación de medias basándose en la metodología de Duncan se obtuvo una media en los tratamientos de 28.90 °C y 32.13 °C siendo la temperatura registrada en los tratamientos una media a la que se puede dar la eclosión del crustáceo *A. franciscana* ya que la temperatura a estado ambiente no es significativa ni influye en la reproducción de dicho crustáceo.



Grafica 3: Análisis de temperatura media de los tratamientos en estudio por la mañana y por la tarde 2015.

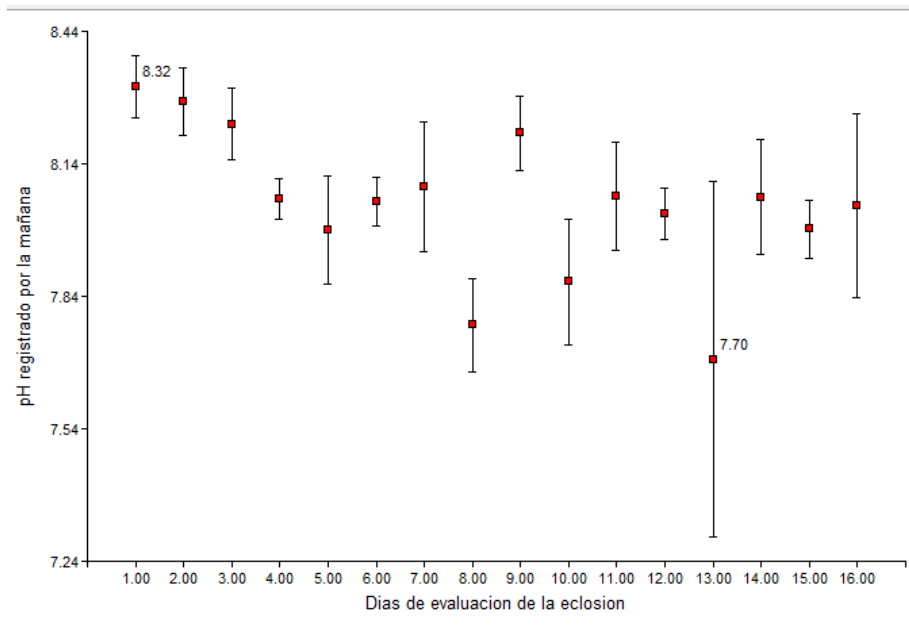
En la gráfica anterior se indica que durante la mañana y por la tarde la temperatura no influye en el comportamiento del crustáceo *A. franciscana* y por lo tanto no afecta la eclosión de esta.

4.2 Análisis de pH de los tratamientos a las 10:00 am y 4:00 pm

La variable pH registrada en horas de la mañana, muestra diferencias altamente significativas ($p=0.0001$) entre los días de evaluación; distribuyéndose en un rango entre 7.70 y 8.32 punto de acides, lo que indica que los sustratos de eclosión de *Artemia* estuvieron ligeramente alcalino hasta medianamente alcalino. El valor medio del pH para todo el periodo de evaluación fue de 8.05 punto de acides, presentando alta variabilidad entre días.

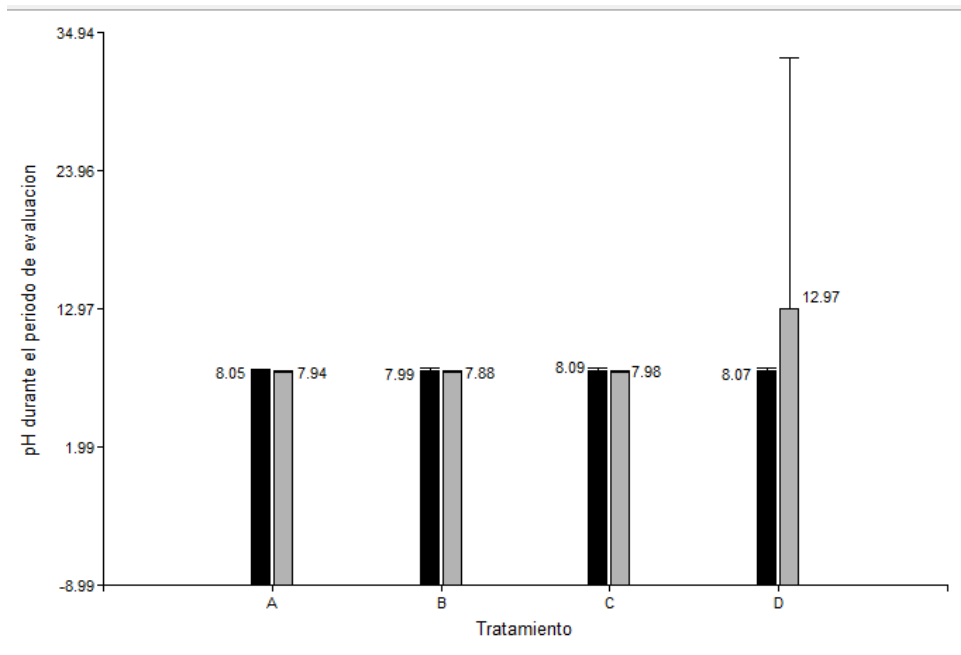
Para el caso de los valores de pH tomados por la tarde, se obtuvo un valor medio de 9.19 punto de acides, para todo el periodo de eclosión, y por presentar alta igualdad en los valores diarios, no se encontró diferencias significativas ($p>0.05$).

En la siguiente grafica se detallan las variaciones en el pH durante el periodo de tiempo del ensayo.



Grafica 4: variacion de pH en los dias de estudio de *Artemia* durante evaluacion del ensayo.

En la siguiente grafica se puede observar la asociaci3n de la toma de pH por la mañana y de la tarde haciendo una asociaci3n a los tratamientos del ensayo para determinar la significancia de esta variable en el ensayo.



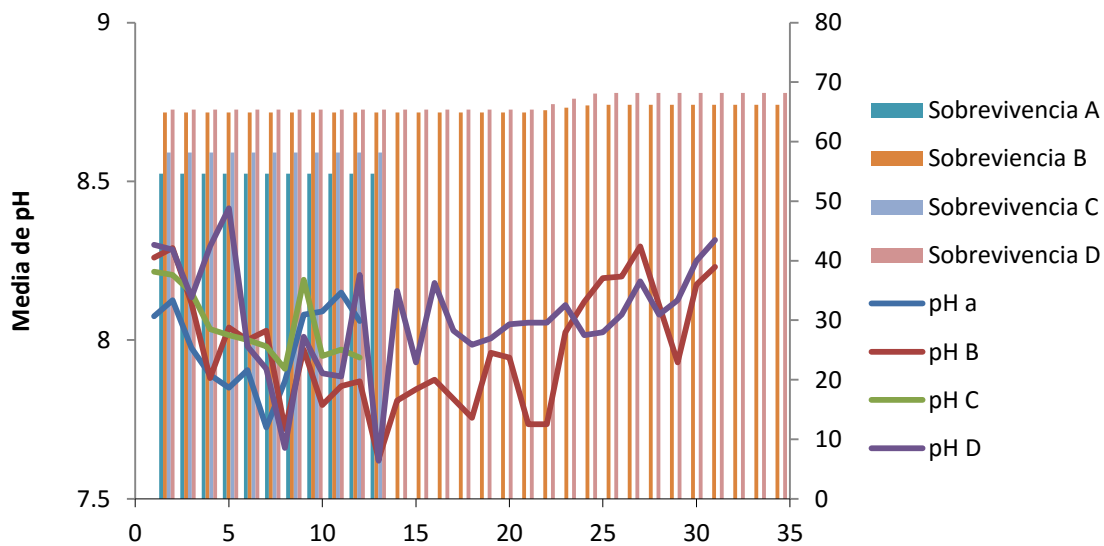
Grafica 5: Asociación de pH con los tratamientos, para determinar significancia en el ensayo.

Según Ruiz, 2008. el pH del agua debe estar entre 7 a 9 punto de acides siendo estos los niveles recomendados para la eclosion del crustáceo *A. franciscana* en cuanto a porcentaje de salinidad se refiere. Los resultados del ensayo en el análisis de comparación a través de la metodología de Duncan, la gráfica indica que el pH más bajo lo obtuvo el tratamiento B con 7.90 punto de acides y el más alto el tratamiento D con 8.13 punto de acides en los tratamientos se obtuvieron resultados similares a los descrito en bibliografía consultada. Según Salgado, 2001 la supervivencia de las poblaciones de *Artemia* es dependiente de las interacciones de salinidad-temperatura y de la concentración de sales en su ambiente.

Haciendo separación de medias con la metodología de Duncan se logro obtener una media en la reproducción de los ensayos de 7.90 a 8.13 punto de acides estando la media obtenida en el laboratorio en el rango de la media que recomienda la bibliografía consultada siendo esta significativa para la eclosión de dicho crustáceo.

En la gráfica 6 se muestran las medias obtenidas en los ensayos relacionándola a la eclosión del crustáceo *A. franciscana* donde se ve que el manejo del pH que se realizó durante el

ensayo fue acertado ya que la eclosión se dio satisfactoriamente, lo que demuestra que el buen manejo del pH influyo de manera positiva en la eclosión del huevo del crustáceo, ya que esta pudo adaptarse al micro hábitat creado en el laboratorio donde se monitoreaba el pH diariamente dos veces al día y se mantenía una media en relación a la bibliografía consultada lo que dio una finalidad acertada a la eclosión de *A. franciscana* dando confiabilidad a la implementación de los tratamientos.



Gráfica 6: Análisis de pH media de los tratamientos en estudio por la mañana y por la tarde 2015.

Está presente grafica indica que durante la mañana y por la tarde el control del pH influye en el comportamiento del crustáceo *A. franciscana* y por lo tanto ayuda a la eclosión de esta.

4.3 Porcentaje de sobrevivencia de *Artemia franciscana*

Un análisis de asociatividad basado en el coeficiente de correlación de Pearson muestra probabilidad de asociatividad entre la sobrevivencia, la alimentación (0.67) y el pH registrado (0.63); valores que indican correlación positiva que significa que las variables alimentación y pH se correlacionan en sentido directo, es decir que a medida que aumenta la cantidad de alimento, el pH es más alcalino lo que favorecerá una mayor sobrevivencia

de la especie *Artemia*. El pH no mostro correlación con la alimentación, expresada en los gramos de alimentos aplicados a cada tratamiento, lo que indica que el pH pudo incrementar o disminuir independientemente de la cantidad de alimentos que se utilizó en el ensayo. Véase el siguiente cuadro.

Cuadro1: Coeficiente de correlación de Pearson: Alimentación, sobrevivencia, temperatura y pH.

	T° mañana en °C	T° tarde en ° C	Alimentación (gr)	Sobrevivencia	pH mañana
T° mañana °C	1.00	0.01	0.42	0.96	0.01
T° tarde °C	0.31	1.00	0.94	0.83	0.27
Alimentación (gr)	0.10	-0.01	1.00	1.6 E-0.9	0.63
Sobrevivencia	-0.01	-0.03	0.67	1.00	0.63
pH mañana	0.31	0.14	0.09	-0.06	1.00

4.3.1 Porcentaje de sobrevivencia de *Artemia* a los 16 días

El porcentaje de sobrevivencia de los tratamientos se tomó a los 16 días de ser establecido el ensayo con sus tratamientos haciendo una grafica de sobrevivencia (véase grafica 7) al final del ensayo dando como resultado los datos en la grafica.

1). El tratamiento A, a los 16 días obtuvo una sobrevivencia del **54.0.7 %** tomando en cuenta que se pusieron 1500 huevos a eclosionar y eclosionaron un total de 811 individuos y no eclosionaron 689 huevos entonces aplicando las siguientes formulas obtenemos el porcentaje de sobrevivencia.

$$\% \text{ mortalidad: } \text{Número de individuos} / \text{total de individuos} * 100$$

Sustituyendo datos en la fórmula:

$$\% \text{ mortalidad: } 689 / 1500 * 100 = \mathbf{45.93 \% \text{ de mortalidad}}$$

Para obtener la sobrevivencia utilizamos la siguiente formula

% sobrevivencia: N - % de mortalidad

Sustituyendo los datos en la fórmula:

$$\% \text{ sobrevivencia: } 100 \% - 45.93 \% = \mathbf{54.07 \% \text{ de sobrevivencia}}$$

2). El tratamiento B a los 16 días obtuvo una sobrevivencia de **58.2 %** colocándose 1500 huevos de *Artemia* a eclosionar donde hubo una eclosión de 873 huevos y una no eclosión de 627 huevos aplicamos la formula anterior para tener el porcentaje de sobrevivencia del tratamiento B.

$$\% \text{ mortalidad: } \text{Número de individuos} / \text{total de individuos} * 100$$

Sustituyendo datos en la fórmula:

$$\% \text{ mortalidad: } 627 / 1500 * 100 = \mathbf{41.8 \% \text{ de mortalidad}}$$

Para obtener la sobrevivencia utilizamos la siguiente formula

% sobrevivencia: N - % de mortalidad

Sustituyendo los datos en la formula

$$\% \text{ sobrevivencia: } 100 \% - 41.8\% = \mathbf{58.2 \% \text{ de sobrevivencia}}$$

3). El tratamiento C a los 16 días obtuvo una sobrevivencia de **58.60%** colocándose a eclosionar 1500 huevos de *Artemia* eclosionando 879 huevos y no eclosionando 621 para obtener la sobrevivencia de este tratamiento aplicamos las siguientes formulas.

$$\% \text{ mortalidad: } \text{Numero de individuos} / \text{total de individuos} * 100$$

Sustituyendo datos en la fórmula:

$$\% \text{ mortalidad: } 621 / 1500 * 100 = \mathbf{41.4 \% \text{ de mortalidad}}$$

Para obtener la sobrevivencia utilizamos la siguiente fórmula

% sobrevivencia: N - % de mortalidad

Sustituyendo los datos en la fórmula:

$$\% \text{ sobrevivencia: } 100 \% - 41.4 \% = \mathbf{58.6 \% \text{ de sobrevivencia}}$$

4). El tratamiento D a los 16 días obtuvo una sobrevivencia de **65.40%** colocándose a eclosionar 1500 huevos de *Artemia* eclosionando un total de 981 y no eclosionando 519 huevos para los cálculos de sobrevivencia aplicamos la siguiente fórmula.

$$\% \text{ mortalidad: } \text{Numero de individuos} / \text{total de individuos} * 100$$

Sustituyendo datos en la fórmula

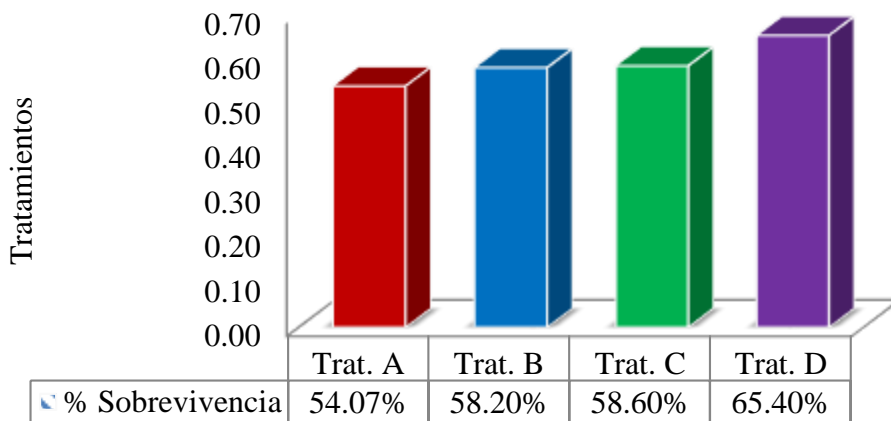
$$\% \text{ mortalidad: } 519 / 1500 * 100 = \mathbf{34.6 \% \text{ de mortalidad}}$$

Para obtener la sobrevivencia utilizamos la siguiente fórmula

$$\% \text{ sobrevivencia: } N - \% \text{ de mortalidad}$$

Sustituyendo los datos en la fórmula

$$\% \text{ sobrevivencia: } 100 \% - 34.6 \% = \mathbf{65.4 \% \text{ de sobrevivencia}}$$



Grafica 7: Porcentaje de sobrevivencia de *Artemia* a los 16 días, 2015.

4.3.1.1 Porcentaje de supervivencia general del ensayo

En la gráfica 8 se representa el porcentaje de supervivencia del ensayo general a los 16 días colocándose a eclosionar un total de 6000 huevos de *Artemia* estando distribuidos 1500 huevos por tratamiento obteniendo 3544 huevos eclosionados y una no eclosión de 2456 huevos donde para obtener el porcentaje de supervivencia general del ensayo se aplicaron las siguientes formulas.

$$\% \text{ mortalidad: } \text{Numero de individuos} / \text{total de individuos} * 100$$

Sustituyendo datos en la formula

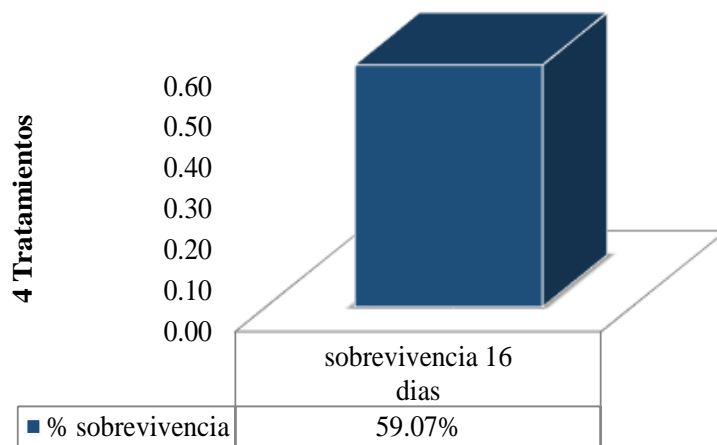
$$\% \text{ mortalidad: } 2456 / 6000 * 100 = \mathbf{40.93 \% \text{ de mortalidad}}$$

Para obtener la supervivencia utilizamos la siguiente formula

$$\% \text{ supervivencia: } N - \% \text{ de mortalidad}$$

Sustituyendo los datos en la formula

$$\% \text{ supervivencia: } 100 \% - 40.93 \% = \mathbf{59.07 \% \text{ de supervivencia}}$$



Grafica 8: porcentaje de supervivencia general del ensayo a los 16 días, 2015.

4.4 Manejo para la eclosión de huevos de *Artemia* a nivel de laboratorio.

El manejo descrito en el laboratorio de ciencias biológicas de la UNA se realizó en tres etapas siendo estas el establecimiento, el monitoreo y la etapa final con la recolección de datos.

Etapa 1, Establecimiento: En primera instancia se procedió a desinfectar los cuatro frascos utilizados para los tratamientos lavándose con agua fría y posteriormente se pusieron a hervir en agua caliente por 3 minutos cada uno. Paralelo a esta actividad se colocó agua tomada de la llave en un recipiente a descolorar por 24 horas.

Una vez los frascos fueron desinfectados se colocaron a una distancia de 2 mts entre ellos, con cantidades de agua que iban de un litro a cuatro litros, dejándolos en el sitio donde se ubicarían durante el periodo de ensayo, se colocó un marco de madera con un circuito eléctrico complejo y sencillo de hacer para colocar tres bujías que se ubicarían en tres de los cuatro tratamientos en estudio.

Se colocó un motor HP 200 para producir oxígeno que se distribuyó por una red de mangueras instaladas desde el motor hasta los frascos para propiciar la producción de oxígeno en el agua.

Se procedió a colocar 10 gramos de sal pura sin yodo para controlar el ácido del agua, el aire bombeado por el motor permitió acelerar la disolución de los granos de sal en el estudio.

Etapa 2, Monitoreo: El monitoreo se realizaba desde las 8:00 am hasta las 5:00 pm diario durante la duración del estudio, el objetivo de este proceso se centraba en observar, que el funcionamiento del motor fuera correcto, las mangueras estuviesen limpias, que el nivel de agua de los frascos se mantuviera a niveles establecidos previamente en la etapa 1, los cuales se ven disminuidos por evaporación y al momento de realizar la limpieza de los frascos.

La limpieza de los frascos se debe realizar semanalmente para evitar acumulación de residuos alimenticios en el frasco, puesto que esto podría llegar a afectar al crustáceo en observación.

A las 10 de la mañana y 4 de la tarde, se realizaban la toma de datos esto para mantener un registro de la temperatura y el pH esto con el objetivo de tener una media de temperatura y pH a la que se dio la eclosión de los huevos de *Artemia franciscana*.

Etapa 3, recolección de datos: en esta etapa es donde se hacen conteos de la cantidad de huevos de Artemia eclosionados y la cantidad de huevos no eclosionados, es en esta etapa cuando se realizan los cálculos de sobrevivencia por tratamiento y estudio en general.

Durante los 30 días que duro el ensayo, diariamente se tomaba la temperatura y pH registrándolos en formatos establecidos para luego ser procesados en programas estadísticos que se desee utilizar. En este ensayo para procesar los datos se utilizó el INFOSTAT, y programa Excel, utilizando metodologías de Duncan y correlación de Pearson.

4.4.1 Manejo para tratamiento en eclosión.

De los cuatro tratamientos colocados a eclosionar el tratamiento que dio mejores resultados con respecto a los otros fue el tratamiento D. Este tratamiento se encontraba en un recipiente con capacidad de almacenamiento de agua de 4 litros, lo que permitió se diera un mayor número de eclosión, al existir mayor número de huevos eclosionados con un **65.40 %** lo que ha dejado en evidencia que a mayor tamaño del recipiente mayor número de eclosiones habrá.

A este tratamiento se le dio un manejo regulado que consistió en retirar el residuo de alimento que se almacenaba al fondo del recipiente con ayuda de una jeringa para evitar causar un posible estrés al crustáceo en eclosión, este procedimiento se hacía cada viernes de cada semana.

Durante 48 horas se colocó una bujía de 25 watts para generar calor e influir en la eclosión de los huevos.

Se le coloco un motor HP 200 para propiciar la producción de oxígeno en el recipiente para oxigenar los huevos durante el periodo de eclosión, la alimentación se les daba en dos

periodos de tiempo siendo este a las 10 de la mañana y 4 de la tarde dándoles una pastilla de alga spirulina triturada.

4.5 Recomendaciones para futuros cultivos de *Artemia* en laboratorio.

Para evitar la evaporación del agua de los frascos y mantener el nivel de agua establecido y mantener control del pH, es necesario mantener un recipiente alterno con agua desclorada y con un porcentaje de sal sin yodo e ir rellenando los tratamientos en estudios.

Para lograr una temperatura ambiente en el área donde se colocara el ensayo, es necesario apagar el aire acondicionado, abrir puertas y ventanas para que la sala tome la temperatura ambiente que haya en el día.

A la hora de alimentar al crustáceo es necesario triturar la pastilla hasta convertirla en polvo y dar la cantidad en gramos establecidos antes del ensayo.

A la hora de eliminar residuos de la alimentación del fondo de los frascos es necesario hacerlo con una jeringa para evitar golpear o estresar al crustáceo ya que podría provocarle la muerte.

V. CONCLUSIONES

Los tratamientos llevados a cabo fueron satisfactorios ya que se logró eclosionar el crustáceo *A. franciscana* logrando ser el tratamiento D, el cual concluyo con un porcentaje de sobrevivencia arriba del 60% lo que hace visible que el tratamiento D fue un poco mas factibles para la eclosión del crustáceo.

El rendimiento de sobrevivencia de *A. franciscana* da pautas para seguir trabajando la eclosión de este crustáceo a nivel de laboratorio esto debido a que las condiciones ambientales que brinda la UNA en sus laboratorios son positivos para llevar a cabo trabajos investigativos.

Para que la eclosión del crustáceo *A. franciscana* se lleve a cabo, es necesario mantener una regulación del pH y que el local donde se ubique el ensayo permanezca la temperatura ambiente para no alterar el ciclo reproductivo de este.

VI. RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta que el tratamiento D obtuvo mayor rendimiento y fue el más satisfactorio en la eclosión del crustáceo *Artemia franciscana* a nivel de laboratorio se recomienda realizar la eclosión de dicho crustáceo en recipientes con mayor capacidad de almacenamiento de agua debido, que según las observaciones realizadas durante el periodo de tiempo que duro el ensayo demuestra que en espacios con mayor capacidad de almacenamiento de agua el crustáceo *Artemia franciscana* se reproduce (si desea seguir después de la eclosión) con mayor facilidad debido a que necesita mayor espacio para continuar su ciclo reproductivo.

A la culminación del periodo de tiempo que tenía previsto el ensayo se obtuvo un buen rendimiento del crustáceo *A. franciscana* lo que da como positivo, el ensayo que se sometió a estudio validándose para su continuación en futuros ensayos con objetivos más amplios.

VII. LITERATURA CITADA

- APROMAR.** 2004. La acuicultura en el mundo. Cádiz. España. 9p
- Castro, G. 2005.** Importancia de los pros bióticos en la acuicultura, utilizando *Artemia franciscana* como bioencapsulante. México DF. Me. 5p.
- Crecimiento de *Artemia* sp a diferentes salinidades en condiciones de laboratorio.** (En línea). Consultado 12 mar. 2015. Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos69/crecimiento-artemia-sp-diferentes-salinidades/crecimiento-artemia-sp-diferentes-salinidades2.shtml>
- FAO. 1989.** Descripción general de la especie *Artemia franciscana*. Managua, Nicaragua.8p.
- Ortega, J. 1991.** Evaluación de una mezcla de bacterias y alimento inerte como alternativa para el cultivo de *Artemia*. México DF. Me. 101p.
- Producción artificial de *Artemia*.** (En línea). Consultado 12 oct. 2013. Disponible en <http://www.buenastareas.com/ensayos/Artemia-Salina/424899.html>
- Ríos, E. 2001.** Crecimiento en poblaciones de *Artemia franciscana* A. *Persimilis* (Crustácea, Anostraca) en condiciones controladas. San José. Cr 10p.
- Ruiz, O. 2008.** Caracterización de diversas poblaciones de *Artemia* desde el punto de vista de su composición en ácidos grasos y de sus patrones moleculares. Cataluña. ES 285p.
- Sorgeloos, N. 1986.** La salinidad y su efecto en la reproducción del crustáceo *Artemia* sp. México DF. Me. 11p.
- Universidad de Colombia. 2003.** Diseños de unidades experimentales. Colombia. 7p.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Toma de datos de pH para la eclosión de *A. franciscana*.

Ensayo	Día y Fecha	pH

Anexo2. Toma de datos de temperatura para la eclosión de *A. franciscana*.

Ensayo	Día y fecha	Temperatura

Anexo 3. Control de alimentación de *A. franciscana* para su eclosión.

Ensayo	Día y fecha	Alimento (gr)

Anexo 4. Toma de estadio de *A. franciscana* para control de eclosión.

Ensayo	Día y fecha	Estadios <i>Artemia</i>
A		
B		
C		
D		

Anexo 5. Toma de datos sobrevivencia de *A. franciscana* para su eclosion.

Ensayo	Día y fecha	sobrevivencia
A		
B		
C		
D		