

Tesis defendida por
Edson Panana Villalobos
y aprobada por el siguiente comité

Dr. Manuel Alberto Segovia Quintero
Director del Comité

Dr. Eugenio Díaz Iglesias
Director del Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua
Chávez
Miembro del Comité

Dra. Bertha Eugenia Lavaniegos
Espejo
Miembro del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

*Coordinador del programa de posgrado
en Acuicultura*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

*Director de la Dirección de Estudios
de Posgrado*

24 de agosto de 2012

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ACUICULTURA**

**Maduración y tasa metabólica del ostión Kumamoto *Crassostrea sikamea*
(Amemiya, 1928) en un sistema de recirculación acuícola**

Tesis

que para cubrir los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en ciencias

Presenta:

Edson Panana Villalobos

Ensenada, Baja California, México

2012

Resumen de la tesis de Edson Panana Villalobos, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura. Ensenada, Baja California. Agosto del 2012

Maduración y tasa metabólica del ostión Kumamoto *Crassostrea sikamea* (Amemiya, 1928) en un sistema de recirculación acuícola

Resumen aprobado por:

Dr. Manuel Segovia Quintero

Dr. Eugenio Díaz Iglesias

Co –Director de Tesis

Co –Director de Tesis

Los sistemas de recirculación acuícola (SRA) permiten la manipulación de las variables físico-químicas así como de la alimentación, teniendo como ventaja el control sobre la maduración de los moluscos bivalvos y sus periodos de desove. Hasta el momento, la maduración del ostión Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) en SRA, y los efectos del proceso sobre la tasa metabólica de los organismos no se ha estudiado. En esta investigación se realizaron 3 experimentos, en los cuales las variables físico-químicas fueron monitoreadas. En el experimento 1 se analizaron los perfiles de temperatura en los SRA y se realizó una curva de calibración para determinar la concentración de microalgas (células/ml) en los SRA. En el experimento 2 se realizó un protocolo de maduración en el cual se incrementó la temperatura del agua durante 10 semanas de 18°C (semana 0) a 24 °C (semana 10). El índice de condición (IC), el consumo de oxígeno, la excreción amoniacal, la relación O:N así como cortes histológicos de la gónada se realizaron a diferentes temperaturas (18°C, 22°C y 24°C). En el experimento 3 se indujo la maduración de los ostiones por medio de la temperatura acumulada efectiva (TAE), el IC así como cortes histológicos de la gónada se realizaron a 18°C, 20°C, 22°C y 24°C. Durante los 3 experimentos las variables fisicoquímicas NH₄, NO₂, NO₃, alcalinidad, pH, O₂, y salinidad se mantuvieron dentro de los rangos óptimos. Se tuvo un control adecuado de la temperatura durante las 10 semanas de maduración. El IC en el experimento 2 y 3 presentó una disminución significativa ($P \leq 0.05$). En el experimento 2 los cortes histológicos demostraron un desarrollo gonadal, en la semana 0 se presentaron gónadas indiferenciadas y en la semana 10 se presentaron gónadas maduras. Los organismos control en los cuales la temperatura del agua no fue manipulada, no presentaron desarrollo gonádico. El consumo de oxígeno y la excreción amoniacal presentaron los valores mayores a 24°C ($P \leq 0.05$). La relación O:N indicó, a 18°C y 22°C, como sustrato metabólico el uso de carbohidratos y lípidos, mientras que a 24°C para la obtención de energía se utilizó una mezcla de lípidos y proteínas. En el experimento 3 la maduración por medio de TAE presentó un valor de 571°C durante las 10

semanas de maduración. Los cortes histológicos demostraron un estadio indiferenciado de la semana 0 a la 9. En la semana 10 se presentó un estadio en desarrollo. Los resultados en este experimento difieren con los reportados por otros autores para la maduración de ostiones por medio de TAE en un rango de 300 a 500°C. Las conclusiones de este trabajo indican que es posible la maduración gonádica del ostión Kumamoto en SRA y el incremento de la tasa metabólica durante este proceso.

Palabras claves: **ostión, *Crassostrea sikamea*, sistema de recirculación acuícola, tasa metabólica, inducción a la maduración.**

Abstract of the thesis presented by Edson Panana Villalobos as a partial requirement for obtaining the degree of Master of Science in Aquaculture. Ensenada, Baja California, Mexico. August 2012.

Maturation and metabolic rate of Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* in a recirculating aquaculture system

Recirculating aquaculture systems (RAS) are design to manipulate physical-chemical parameters and feed, giving better control over the conditioning and maturation process in bivalve mollusks. Up to date, the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* maturation and their effects in the metabolic rate in a RAS has not been yet reported. In this study, three experiments were performed. In each experiment the water quality was closely monitored. In experiment 1, the temperature profile and the microalgae (cells/ml) concentration were determined. In experiment 2, a maturation protocol, where the temperature increased gradually in a 10-week period was performed (18°C, week 0 to 24°C, week 10). Condition index (CI), oxygen consumption, ammonia excretion, atomic ratio O:N and histological analysis were determined in 18 oysters at each temperature of the maturation protocol (18°C, 22°C and 24°C). The effective accumulative temperature was used in experiment 3 to obtain gonad maturation, CI and histological analysis were determined on 18 oysters at each temperature of the maturation protocol (18°C, 20°C, 22°C and 24°C). On the 3 experiments; ammonia, nitrite, nitrate, alkalinity, dissolved oxygen and salinity were at optimal level. The CI decreased significantly ($P \leq 0.05$) in experiment 2 and 3 as the temperature increase. The histological analysis showed gonad development after the 10 weeks period in experiment 2. In week 0, oysters were undifferentiated, and in week 10 oysters were mature. The oysters in the control group, where water temperature was not controlled, remained undifferentiated. The oxygen consumption and ammonia excretion were higher at 24°C ($P \leq 0.001$). The atomic ratio O:N indicated the use of carbohydrates and lipids as metabolic substrate at 18°C and 22°C. A mixture of lipids and proteins were used as metabolic substrate at 24°C. The effective accumulative temperature in experiment 3 was 571°C for all the conditioning process. In the first nine weeks of the experiment, oysters remained undifferentiated. In the last week, the gonad analysis showed that oysters' gonads were in development. The results in this research differ from those reported for oysters (300 to 500°C) to achieve the maturation. We conclude that it is possible to condition and mature Kumamoto oyster in a RAS and the metabolic rate increases throughout this process.

Key words: **oyster, *Crassostrea sikamea*, recirculating aquaculture system, metabolic rate, conditioning process.**

DEDICATORIA

A mi madre Maribel por su apoyo
incondicional durante toda mi vida,
por siempre creer en mí y
por todo su amor.

A mi padre Argimiro por sus enseñanzas,
motivación para ser una mejor persona
y por qué gracias a él conocí esta hermosa
vocación

A mis hermanas Agaricia y Michelle
por todos los momentos con ellas
y su cariño

A la familia Villalobos
por todo su amor

A mi gran compañera, amiga
y mi amor Marieke ya que
sin ella nada hubiera sido igual durante
esta gran etapa de mi vida y por
siempre apoyarme y motivarme

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo económico para poder realizar mi Maestría

Al Dr. Manuel Segovia Quintero, por todo su apoyo y motivación durante estos dos años, por enseñarme una manera diferente de trabajar y formarme como una persona más responsable, pero sobre todo por el lazo de amistad y confianza que me brindo durante todo este periodo. Gracias Doctor!!!

Al Dr. Eugenio Díaz Iglesias, por todos sus consejos y su apoyo, por enseñarme el fascinante mundo de la fisiología y compartir parte de su gran experiencia conmigo. Por esas platicas tan interesantes en su oficina en las cuales siempre aprendía algo nuevo. Muchas gracias!!!

A la Dra. Carmen Paniagua Chávez, por su gran apoyo durante toda mi estancia en el CICESE, aun cuando su agenda de trabajo fuera tan ocupada siempre tenía tiempo para resolver mis dudas. Muchas gracias por siempre hacernos ver lo importante que era nuestro trabajo y por habernos motivado y apoyado en nuestra primera gran experiencia en el congreso de Las Vegas.

A la Dra. Bertha E. Lavaniegos Espejo, por haber aceptado ser mi sinodal externo sin pensarlo dos veces, y la motivación que siempre me dio reconociendo mi trabajo y esfuerzo todas las veces que nos vimos.

A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel y el Dr. Benjamín Barón Sevilla por las facilidades que me dieron al utilizar sus laboratorios durante el periodo experimental la investigación.

A todos los investigadores del área de Acuicultura que en su momento me impartieron clases, gracias por todo lo aprendido. A los investigadores que siempre tuvieron la puerta abierta cuando tenía alguna duda (que fueron muchas).

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, por su gran ayuda en la elaboración de las laminas histológicas de las gónadas de los ostiones.

A la M. en C. Gabriela del Valle y Marisol Díaz por su apoyo técnico durante el periodo experimental.

Al M. en C. Roger J. Frías por la donación de los ostiones para poder realizar esta investigación.

A mis compañeros de generación Diana, Yasel, Víctor, Tyrone, Isaías, José María, José Ángel, mis compañeros de doctorado Diana López, Juan Pablo, Samuel y mis compañeros de laboratorio y departamento de Acuicultura ya que fueron como una familia durante estos dos años, siempre conté con su apoyo y por todas esas experiencias que vivimos juntos y todos los momentos de diversión. Gracias!!!

CONTENIDO

	Páginas
Resumen español.....	2
Resumen en inglés.....	4
Dedicatoria.....	5
Agradecimientos	6
Contenido	8
Lista de figuras.....	11
Lista de tablas.....	14
1. Introducción	17
1.01 Generalidades del ostión Kumamoto.....	19
1.02 Antecedentes.....	20
1.03 Hipótesis.....	25
1.04 Objetivos.....	25
2. Materiales y métodos.....	26
2.01 Obtención de organismos.....	26
2.02 Transporte de organismos y aclimatación	27
2.03 Marcación de organismos.....	28
2.04 Descripción del sistema de recirculación acuícola para la maduración de reproductores	28
2.05 Calidad del agua.....	30
2.06 Control de temperatura en los sistemas de maduración.....	31
2.1 Experimento 1.....	31
2.11 <i>Evaluación del perfil de temperatura en los sistemas de maduración y la calidad del agua</i>	31
2.12 <i>Alimentación</i>	32
2.13 <i>Análisis estadístico</i>	33
2.2 Experimento 2	34
2.21 <i>Biometría de organismos y mortalidad</i>	34
2.23 <i>Calidad del agua</i>	34

2.24. Alimentación.....	34
2.25 Índice de condición.....	34
2.26 Determinación de la tasa metabólica por el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada a diferentes temperaturas	36
2.27 Análisis histológico del desarrollo gonádico del ostión Kumamoto durante la maduración en SRA	38
2.28 Análisis estadístico.....	40
2.3 Experimento 3	41
2.31 Alimentación.....	41
2.32 Calidad del agua	41
2.33 Índice de condición.....	41
2.34 Maduración de ostiones por medio de la temperatura acumulada efectiva	41
2.35 Análisis histológico del desarrollo gonádico del ostión Kumamoto durante la maduración en SRA por medio de la temperatura acumulada efectiva.....	43
2.36 Análisis estadístico.....	43
3. Resultados.....	44
3.0 Experimento 1	44
3.01. Evaluación del perfil de temperatura en los sistemas de maduración y la calidad del agua	44
3.02 Conteo de microalgas en los sistemas de maduración	46
3.1 Experimento 2	47
3.11 Biometría de organismos y mortalidad.....	47
3.12 Calidad del agua	48
3.13 Índice de condición.....	51
3.14 Determinación de la tasa metabólica por el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada a diferentes temperaturas	51
3.15 Análisis histológico del desarrollo gonádico del ostión Kumamoto durante la maduración en SRA	56
3.2 Experimento 3	60
3.21 Calidad del agua	60

3.22	<i>Índice de condición</i>	61
3.23	<i>Maduración de ostiones por medio de la temperatura acumulada efectiva</i>	62
3.24	<i>Análisis histológico del desarrollo gonádico del ostión Kumamoto durante la maduración en SRA por medio de la temperatura acumulativa efectiva</i>	63
4.	<i>Discusión</i>	67
4.01	<i>Evaluación del perfil de temperatura en los sistemas de maduración y la calidad del agua</i>	67
4.02	<i>Conteo de microalgas en los sistemas de maduración</i>	71
4.03	<i>Biometría de organismos y mortalidad</i>	73
4.04	<i>Índice de condición</i>	74
4.05	<i>Determinación de la tasa metabólica por el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada a diferentes temperaturas</i>	76
4.06	<i>Análisis histológico del desarrollo gonádico del ostión Kumamoto durante la maduración en SRA</i>	79
4.07	<i>Maduración de ostiones por medio de la temperatura acumulada efectiva</i>	81
5.-	<i>Conclusiones</i>	83
5.01	<i>Recomendaciones</i>	84
	<i>Referencias bibliográficas</i>	85

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Producción acuícola mundial de los principales grupos de especies en el 2008. Expresada en cantidad de producción (A) y valor económico (B) datos de (FAO, 2008).	18
2.	Entidades Federativas que participan en la producción de moluscos bivalvos en México. Participación anual en toneladas de producción por litoral del Pacífico (A), litoral del Golfo de México y Caribe (B), (SAGARPA 2008).	19
3.	Características morfológicas de la concha del género <i>Crassostrea</i> (Castillo-Rodríguez y García-Cubas, 1984).	21
4.	Ubicación de la compañía Bivalva S.A de C.V en la Bahía Todos Santos, Ensenada, Baja California, México	27
5.	Limpieza de las valvas del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> para eliminar epibiontes (A). Inducción a la liberación de gametos por medio de shock térmico (B).	28
6.	Ubicación de los 12 sistemas de recirculación acuícola para la maduración del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> . Se presenta la numeración de los sistemas (S-) y la numeración de los ostiones en cada unidad. Sistema S- 4 y S-12 destinados como control durante el periodo experimental.	29
7.	Sistema de recirculación acuícola para maduración de ostión <i>Crassostrea sikamea</i> , se presenta el filtro biológico de cuentas plásticas y tanque de maduración para los organismos.	30
8.	Perfil de temperatura planteado para el experimento 1 durante las 10 semanas de maduración del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> en un sistema de recirculación acuícola.	32
9.	Medición de valvas del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> durante la biometría, largo de la valva (A), ancho de la valva (B), alto de la valva (C).	35

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- | | | |
|-----|--|----|
| 10. | Diagrama del período de maduración y perfil de temperaturas usadas en la maduración del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> . Las estrellas indican los tiempos en los cuales se determinó el índice de condición. Las flechas indican los tiempos en que se determinó la tasa metabólica a 3 diferentes temperaturas (18 °C, 22 °C y 24 °C). | 37 |
| 11. | Perfil de temperatura planteado para el experimento 3 durante las 10 semanas de maduración del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> en un sistema de recirculación acuícola, utilizando la temperatura acumulada efectiva. Se presenta el aumento gradual de la temperatura de 18°C hasta 24°C. | 42 |
| 12. | Perfil de temperatura (media \pm desviación estándar) durante las 10 semanas del experimento 1. Líneas punteadas (----) representan la temperatura planteada durante el experimento, línea continua (—) presenta la temperatura registrada en los sistemas de recirculación acuícola a lo largo del experimento. | 44 |
| 13. | Curva de calibración para determinar la concentración de microalgas en los sistemas de recirculación acuícola por medio de absorbancia a una longitud de onda de 550 nm. Se presenta la ecuación lineal y el coeficiente de terminación. | 46 |
| 14. | Mortalidad del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> reportada durante los 70 días (10 semanas) de maduración en los sistemas de recirculación acuícola. Las flechas indican el día en que se presentó mortalidad y los números la cantidad de organismos muertos registrados. | 48 |
| 15. | 15. Perfil de temperatura semanal (media \pm desviación estándar) reportado en el experimento 2 durante la maduración del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> en sistemas de recirculación acuícola. | 50 |
| 16. | Índice de condición (media \pm desviación estándar) del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> durante la maduración en sistemas de recirculación acuícola a diferentes temperaturas. CI, índice de condición de los organismos utilizados como control al inicio del experimento, CF es el índice de condición de los organismos utilizados como control al final del experimento. | 52 |

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

17. Consumo de oxígeno del ostión *Crassostrea sikamea* (mgO₂/g p.s/h) con respecto al peso seco de tejido (g) en tres diferentes temperaturas, 18°C (A), 22°C (B) y 24°C (C). Se presenta la ecuación lineal así como el r² del consumo de oxígeno en cada temperatura. 53
18. Excreción amoniacal del ostión *Crassostrea sikamea* (mgNH₄/g p.s/h) con respecto al peso seco de tejido (g) en tres diferentes temperaturas. 18°C (A), 22°C (B) y 24°C (C). Se presenta la ecuación lineal así como el r² de la excreción amoniacal en cada temperatura. 55
19. Descripción histológica de la gónada del ostión *Crassostrea sikamea* durante la maduración en sistemas de recirculación acuícola por 10 semanas. Fotografía: semana 0 a 18°C (A-B indiferenciado), semana 3 a 18°C (C-D indiferenciado), semana 6 a 22°C (E-F desarrollo), semana 10 a 24°C (G-H maduro), sin manipulación de la temperatura (I-J testigo). Tc: tejido conectivo, Ac: ácido, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatoцитos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Fg: fagocitos. Fotografía 200X. 59
20. Índice de condición (media ± desviación estándar) del ostión *Crassostrea sikamea* durante la maduración en sistemas de recirculación acuícola a diferentes temperaturas. CI, índice de condición de los organismos utilizados como control al inicio del experimento, CF es el índice de condición de los organismos utilizados como control al final del experimento. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas. 62
21. Descripción histológica de la gónada del ostión *Crassostrea sikamea* durante la maduración en sistemas de recirculación acuícola por 10 semanas por medio de la temperatura acumulada efectiva. Tc: tejido conectivo, Ac: ácido, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Fg: fagocitos. Fotografía 200X. 66

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Composición total de las diferentes microalgas que conforman la pasta comercial Shellfish Diet 1800 y su concentración porcentual de lípidos.	33
2.	Valores de la relación atómica O:N para los diferentes sustratos metabólicos descritos por Mayzaud y Conover (1988).	38
3.	Clasificación de los estadios utilizados para determinar el desarrollo gonádico de las hembras de ostión <i>Crassostrea sikamea</i> .	39
4.	Clasificación de los estadios utilizados para determinar el desarrollo gonádico de los machos de ostión <i>Crassostrea sikamea</i> .	40
5.	Temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad (media \pm desviación estándar) registradas en los sistemas de recirculación acuícola durante las 10 semanas del experimento 1. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas.	45
6.	Peso húmedo total (g), largo, ancho y alto de las valvas (cm) (media \pm desviación estándar) de los ostiones <i>Crassostrea sikamea</i> durante las semanas 0, 3, 7 y 10 en los sistemas de recirculación acuícola. Letras diferentes indican diferencias a>b>c> significativas.	47
7.	Temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad (media \pm desviación estándar), registradas en los sistemas de recirculación acuícola durante el experimento 2. La primera columna presenta la temperatura planteada para el experimento. Letras diferentes a>b>c>d representan diferencias significativas.	49
8.	Nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos (NO ₂), nitratos (NO ₃) y alcalinidad (CaCO ₃), (media \pm desviación estándar), registrados durante el experimento 2. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas.	51

LISTA DE TABLAS (Continuación)

- | | | |
|-----|--|----|
| 9. | Consumo de oxígeno ($\text{mgO}_2/\text{g p.s/h}$) del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> a tres diferentes temperaturas 18°C, 22°C y 24°C durante la maduración en sistemas de recirculación acuícola. Se presentan los valores medio, el mínimo, el máximo y la desviación estándar (D.E). Letras diferentes a>b>c indican diferencias significativas | 54 |
| 10. | Excreción amoniacal $\text{mgNH}_4/\text{g p.s/h}$ de los reproductores del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> a 18°C, 22°C y 24°C durante el periodo de maduración en sistemas de recirculación acuícola. Se presentan los valores promedio, el mínimo, el máximo y la desviación estándar (D.E). Letras diferentes a>b>c indican diferencias significativas. | 54 |
| 11. | Relación oxígeno – nitrógeno del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> a 18°C, 22°C y 24°C durante la maduración en sistemas de recirculación acuícola. Se presentan los valores promedio, el mínimo, el máximo y la desviación estándar (D.E). Letras diferentes a>b indican diferencias significativas. | 56 |
| 12. | Desarrollo gonádico del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> durante las 10 semanas de maduración en los sistemas de recirculación acuícola a diferentes temperaturas así como de los organismos testigo (sin manipulación de la temperatura del agua). Se presenta la semana de acondicionamiento, temperatura del agua y el porcentaje de ostiones en los estadio de desarrollo gonádico. | 57 |
| 13. | Temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad (media \pm desviación estándar) registrada en los sistemas de recirculación acuícola durante las 10 semanas del experimento 1. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas. | 60 |
| 14. | Nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos (NO_2) y alcalinidad (CaCO_3), (media \pm desviación estándar), registrados durante el experimento 2. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas. | 61 |
| 15. | Temperatura acumulada efectiva durante las 10 semanas de maduración del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> en sistemas de recirculación acuícola. Se presenta la temperatura (media \pm | 63 |

desviación estándar) durante cada semana de maduración. $C 1 - 10$ = temperatura acumulada en los organismos control durante las 10 semanas.

16. Maduración del ostión *Crassostrea sikamea* en sistemas de recirculación acuícola por medio de la temperatura acumulada efectiva. Se presenta la letra que indica la fotografía histológica, la semana y temperatura en los sistemas de recirculación acuícola, la temperatura acumulada efectiva reportada en cada semana, el estadio gonádico y porcentaje de ostiones que lo presentó. 64

1. Introducción

La acuicultura es el sector productivo de alimentos con mayor crecimiento en las últimas tres décadas (FAO, 2010). La producción acuícola mundial de organismos comestibles incluyendo a los peces, los crustáceos, los moluscos y otros animales acuáticos destinados al consumo, alcanzó los 52.5 millones de toneladas en el 2008 (FAO, 2010). La contribución de la acuicultura a la producción total de la pesca de captura y acuicultura mundial aumentó de 34,5% en 2006 a 36,9% en 2008 (FAO, 2010, p. 20).

La producción acuícola mundial está constituida por diferentes especies de peces y crustáceos (Figura 1), y diversos moluscos tales como: los ostiones, los mejillones, las almejas y los pectínidos, los cuales tienen un importante valor comercial (FAO, 2008). La producción acuícola de moluscos en su conjunto, aumentó a un ritmo anual del 3.7% en el período 2000-2008, superando la producción de captura. En dicho periodo, el 75% de la producción total de moluscos provino de cultivo, siendo los principales componentes los ostiones (31.8%), las almejas (24.6%), los mejillones (12.4%) y los pectínidos (10.7%), (FAO, 2010).

El interés por cultivar una gran variedad de especies de moluscos de importancia comercial ha aumentado en países latinoamericanos ya que al alimentarse del primer eslabón de la cadena trófica su cultivo es relativamente económico comparado con los peces y los crustáceos (FAO, 2007). América Latina ha tenido un crecimiento continuo en la acuicultura desde hace más de dos décadas. Los moluscos y en particular los bivalvos son actualmente uno de los organismos marinos más importantes en la producción acuícola de Latinoamérica (FAO, 2007). México cuenta con 2,769 km de costal en el Golfo de México y el Caribe y 7,775 km en el Pacífico (Ortiz-Pérez y De la Lanza-Espino, 2006). En México la industria acuícola productora de bivalvos se ha desarrollado casi

exclusivamente en las costas del Pacífico de Baja California y en el Golfo de California y ocupa el cuarto lugar en producción en América Latina después de Chile, Brasil y Perú (FAO, 2007).

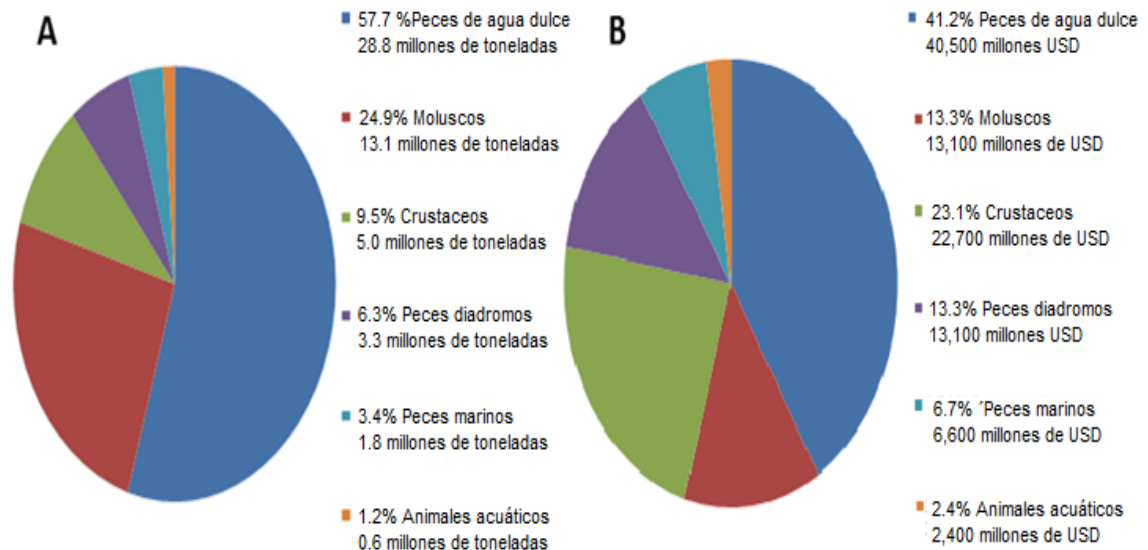


Figura.1. Producción acuícola mundial de los principales grupos de especies en el 2008. Expresada en cantidad de producción (A) y valor económico (B) datos de (FAO, 2010, p. 25).

La acuicultura de bivalvos en México inicia a finales del siglo XIX con el cultivo de ostras perleras en Baja California Sur (Cariño y Monteforte, 1995). Posteriormente, se desarrolló una técnica de pesquería acuicultura para el ostión *Crassostrea virginica* en el Golfo de México, con una producción de alrededor de 40,000 toneladas de peso vivo (Figura 2), (Maeda-Martínez, 2008).

En las costas del Pacífico mexicano se explotan más de 54 especies de moluscos (Baqueiro, 1984). Cuenta con cuerpos de agua apropiados para el desarrollo de cultivos de bivalvos. El cultivo de bivalvos en México se ha centrado en el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*, el cual fue introducido en los años setentas, pero su producción se inició hasta la década de los ochentas (Maeda-Martínez, 2008).

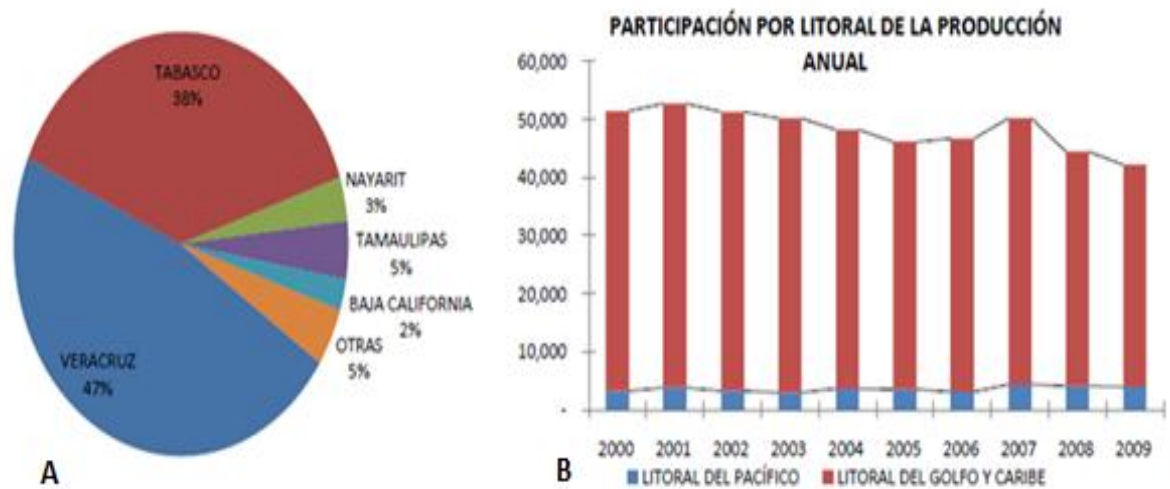


Figura.2. Entidades Federativas que participan en la producción de moluscos bivalvos en México. Participación anual en toneladas de producción por litoral del Pacífico (A), y litoral del Golfo de México y Caribe (B), (SAGARPA 2008).

1.01 Generalidades del ostión Kumamoto

Los ostiones son organismos pertenecientes al filo Mollusca y a la clase de los lamelibranquios o bivalvos. En las especies del género *Crassostrea* las conchas están compuestas por carbonatos de calcio y sílice, que son producidas por el mismo organismo a través del manto y están formadas por dos valvas que presentan forma irregular y asimétrica (Figura 3), (CONAPESCA, 2008). El ostión *Crassostrea sikamea*, conocido a nivel mundial como ostión Kumamoto tiene su origen en el mar de Ariake ubicado en Kyushu, Japón. Es una especie con hermafroditismo protándrico. Los juveniles son machos funcionales durante su primer desove, mientras que solo la mitad de ellos permanecen como machos para su segundo desove. Los adultos funcionan como machos y hembras por separado en cualquier estación reproductiva, pero puede presentarse un cambio de sexo de macho a hembra en un cierto punto de su ciclo de vida (Baghurst y Mitchell, 2002; Vásquez –Yeomans, 2006).

El ostión Kumamoto fue introducido al continente Americano en la década de los cuarenta procedente de Japón hacia la costa oeste de Estados Unidos de

América (Woelke, 1955). La introducción del ostión Kumamoto en México ocurrió en 1975 para su cultivo a pequeña escala en los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa con semilla proveniente de Estados Unidos de América (SAGARPA, 2010). El ostión Kumamoto se distingue por su relación cercana con el ostión del Pacífico *C. gigas* y durante mucho tiempo fue considerado como una sub-especie (Hedgecock *et al.*, 1999). Sin embargo existen algunas diferencias importantes entre estas dos especies tales como: su baja tasa de crecimiento comparado con *C. gigas* y otras especies de ostiones. Las valvas del ostión Kumamoto son pequeñas, la valva izquierda es más profunda que la derecha y la superficie es de textura ondulada. Su periodo de maduración comienza en invierno y prefiere salinidades menores a las seleccionadas por el ostión del Pacífico (Sekina, 2009). A nivel molecular, el ostión Kumamoto presenta la aloenzima rDNA 16 la cual es diferente a la que posee el ostión del Pacífico y manifiesta una incompatibilidad gamética de un solo sentido, ya que el ostión Kumamoto no tiene la capacidad de fertilizar ovocitos del ostión del Pacífico, mientras que este último si posee la capacidad de fertilizar ovocitos del ostión Kumamoto (Hedgecock *et al.*, 1999).

1.02 Antecedentes

El acondicionamiento de reproductores de ostión para su maduración gonádica ha sido ampliamente estudiado (Utting, 1993; Utting y Millican, 1997; Robison, 1992a). Sin embargo, estas investigaciones se han llevado a cabo en sistemas de flujo continuo, donde el manejo de organismos y operación de las instalaciones es diferente a las requeridas en un sistema de recirculación acuícola (SRA). Los SRA son un conjunto de procesos y componentes donde el agua se limpia continuamente y se re-utiliza, para el cultivo de organismos acuáticos (Libey, 1993). Una de las características principales de SRA o sistemas cerrados es el uso racional del agua, ya que el volumen de recambio es menor a un 10% diario del volumen total del sistema (Timmons y Ebeling, 2010).

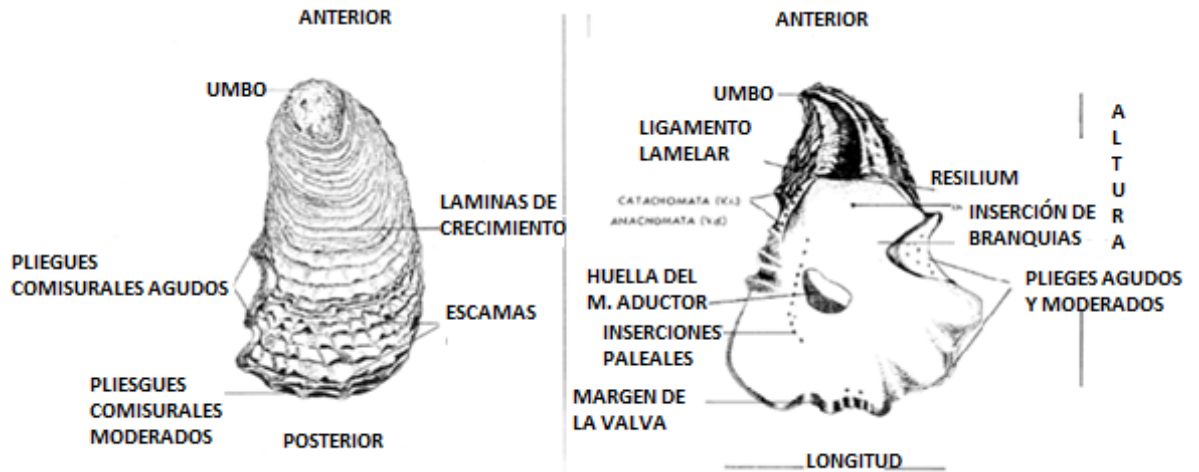


Figura.3. Características morfológicas de la concha del género *Crassostrea* (Castillo-Rodríguez y García-Cubas, 1984).

El uso de SRA permite el monitoreo y control de las variables físico-químicas tales como: la temperatura, la salinidad, el oxígeno disuelto, el dióxido de carbono, el potencial de hidrógeno (pH), la alcalinidad y los metabolitos como el nitrógeno amoniacal total, los nitritos y los nitratos. El control de las variables físico-químicas permite la producción continua a lo largo del año (Timmons *et al.*, 1996). Los SRA presentan también otras importantes ventajas como el control de la alimentación en términos de cantidad y calidad, así como reducir considerablemente problemas con agentes patógenos.

El objetivo de la maduración de reproductores de ostión en SRA es maximizar la fecundidad de los progenitores por medio de la alimentación a fin de obtener gametos de buena calidad y por consiguiente una alta viabilidad de larvas (Utting y Millican, 1997). El acondicionamiento de reproductores de ostión para la maduración es un procedimiento por el cual los laboratorios pueden ampliar su ciclo productivo sin tener que depender del período reproductivo, relativamente corto, durante el cual los adultos de la especie de interés portan gametos maduros en su hábitat natural (Helm *et al.*, 2006). Durante este proceso los factores

ambientales y nutricionales son manipulados para iniciar el desarrollo gonádico y la gametogénesis (Utting y Millican, 1997). Los estudios acerca de las respuestas fisiológicas y energéticas de algunas especies de bivalvos marinos comerciales, mantenidos bajo diferentes regímenes térmicos, han recibido considerable atención, especialmente aquellos llevados a cabo para la producción de semilla en laboratorios con sistemas controlados de flujo continuo (Saucedo *et al.*, 2004). A la fecha existen pocos reportes sobre la maduración de moluscos bivalvos en SRA y los cambios fisiológicos que ocurren durante este proceso para estimar la energía metabólica requerida durante diferentes condiciones de maduración (Perera *et al.*, 2007).

Los factores ambientales así como la condición fisiológica influyen en la tasa metabólica de los moluscos (Helm *et al.*, 2006; Tran *et al.*, 2008). En los moluscos bivalvos marinos la temperatura es uno de los principales factores exógenos que influencia en los procesos biológicos extrínsecos tales como la alimentación, la respiración, el crecimiento y la reproducción (Cáceres-Puig *et al.*, 2007). Estos cambios traen como resultado modificaciones en la actividad metabólica, y en general en el gasto de energía de los moluscos (Saucedo *et al.*, 2004). Los estudios acerca del consumo de oxígeno han sido utilizados como indicadores del estado fisiológico del organismo. Permiten determinar la cantidad de energía disponible para el trabajo biológico, así como para evaluar el metabolismo de rutina, el metabolismo post-alimenticio y el destino de la energía asimilada a través del alimento en organismos que están expuestos a diferentes condiciones ambientales (Díaz-Iglesias *et al.*, 2004; Villareal y Rivera, 1993).

El amoniaco es el principal componente nitrogenado excretado por los organismos acuáticos y está relacionado directamente con la temperatura, la calidad de la dieta (proteína: carbohidrato) y la salinidad (Colt y Armstrong, 1981; Quarmby, 1983). Las concentraciones elevadas de amoniaco incrementan el consumo de oxígeno limitando la producción acuícola. Los estudios de consumo de oxígeno y excreción amoniaca son importantes para determinar los límites térmicos óptimos de las diferentes especies de bivalvos (Saucedo *et al.*, 2004). La

relación atómica O:N (oxígeno consumido/amoniaco excretado) es usada como un indicador de la naturaleza del sustrato metabólico que está siendo oxidado preferentemente por los organismos para la obtención de energía (Harris, 1959; Dall y Smith, 1986).

Otra herramienta utilizada para evaluar el estado fisiológico de los moluscos bivalvos es el índice de condición, el cual se pueden dividir en estático y dinámico (Byane, 1973). Los índices de condición estáticos son determinados en un punto en el tiempo y dan información sobre el estado fisiológico del animal (Lucas y Beninger, 1985). Los índices de condición dinámicos evalúan los cambios fisiológicos de un individuo o una población en un periodo del tiempo (Lucas y Beninger, 1985). Para los moluscos bivalvos el índice de condición mas recomendado es el estático debido a su menor rango de variación en los resultados y consiste en determinar la razón entre el peso seco de la carne y el peso seco de la concha (Del Río-Portilla, 1991).

La alimentación es un factor importante a considerar para el éxito en la maduración de los reproductores y como resultado en la calidad de sus gametos. Esta se lleva a cabo generalmente con una mezcla de diferentes microalgas (Robison, 1992b). Las especies de microalgas más utilizadas durante el periodo de maduración de los reproductores son: *Tetraselmis* (varias especies, incluyendo *T. chuii*, *T. tetrahele* y *T. suecica*), *Isochrysis* spp. *Pavlova* spp, *Chaetoceros* spp, *Thalassiosira weissflogii*, debido a que estas microalgas contienen ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) de importancia estructural para los ovocitos como lo son el ácido eicosapentaenoico, 20:5 n-3 (EPA) y el ácido docosahexaenoico, 20:6 n-3 (DHA), (Helm *et al.*, 2006).

El ostión Kumamoto tiene un mercado pequeño comparado con el mercado de otros moluscos bivalvos (SAGARPA, 2010). Sin embargo los productores han aumentado su interés en el cultivo de este organismo por el alto precio que alcanza en el mercado internacional, lo que se ha reflejado en un aumento de la producción del ostión Kumamoto en la Península de Baja California (Conapesca, 2008).

En la actualidad hay insuficiente información acerca de la maduración del ostión Kumamoto y cómo influye la manipulación de los factores exógenos como las variables físico químicas y la alimentación en la tasa metabólica de los reproductores. Por lo cual, el objetivo de este trabajo es analizar la maduración del ostión Kumamoto y determinar los cambios en la tasa metabólica en términos de oxígeno consumido, excreción amoniacal y sustrato metabólico utilizado durante el acondicionamiento para la maduración en un sistema de recirculación acuícola.

1.03 Hipótesis

Es factible lograr la maduración del ostión Kumamoto *Crassostrea sikamea* en sistemas de recirculación acuícola por medio de la manipulación de la calidad del agua y la alimentación.

1.04 Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de la calidad del agua y la alimentación en la maduración y la tasa metabólica del ostión Kumamoto *Crassostrea sikamea*, acondicionado en un sistemas de recirculación acuícola.

Objetivos específicos

1. Evaluar los efectos de la calidad del agua en la maduración del ostión Kumamoto.
2. Determinar el consumo de oxígeno, la excreción amoniacal y el sustrato metabólico utilizado por el ostión Kumamoto utilizando un protocolo de maduración con diferentes temperaturas.
3. Determinar el índice de condición presentado por el ostión Kumamoto utilizando un protocolo con diferentes temperaturas.
4. Describir el desarrollo gonádico del ostión Kumamoto por medio de histología durante el periodo de maduración.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo este trabajo se realizaron tres experimentos en diferentes periodos con una duración de 10 semanas cada uno. En el primer experimento se analizaron los perfiles de temperatura en el agua de los SRA y se determinó la tasa de alimentación. En el segundo experimento se determinó el índice de condición y la tasa metabólica de los reproductores a diferentes temperaturas (18°C, 22°C y 24°C). Se realizaron cortes histológicos de la gónada en organismos a las diferentes temperaturas antes mencionadas a fin de analizar el desarrollo gonádico. En el tercer experimento se determinó el índice de condición, se indujo el desarrollo gonádico por medio de la temperatura acumulada efectiva y se realizaron cortes histológicos de la gónada.

En cada experimento se utilizaron 12 SRA, 10 sistemas se utilizaron como unidades de maduración (200 organismos) y 2 sistemas como control (40 organismos). En los sistemas utilizados como control la temperatura del agua no fue manipulada durante las 10 semanas de experimento. Cada sistema de recirculación acuícola constó de un tanque con una densidad de 20 ostiones, un filtro biológico y un fraccionador de espuma.

2.01 Obtención de organismos

Para llevar a cabo los 3 experimentos se utilizó un total de 720 ostiones Kumamoto, *Crassostrea sikamea*, (240 ostiones por experimento), con un peso húmedo individual de 34.8 ± 12.2 g. Los organismos fueron donados por la empresa acuícola Bivalva S. A. de C. V., localizada en la Bahía Todos Santos, Ensenada, Baja California, México (Figura 4).



Figura.4. Ubicación de la compañía Bivalva S.A de C.V en la Bahía Todos Santos, Ensenada, Baja California, México (Google Map, 2011).

2.02 Transporte de organismos y aclimatación

Los organismos se transportaron en seco en una hielera a una temperatura de 19°C al Laboratorio de Diseño y Desarrollo de Tecnología Acuícola, ubicado en el Departamento de Acuicultura del CICESE. En el laboratorio se limpiaron las valvas de los organismos para eliminar epibiontes (Figura 5). Posteriormente los organismos limpios se aclimataron colocándolos en un tanque plástico de 500 l en donde se mantuvieron por 2 semanas a una temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, con agua marina a 35 g/Kg de salinidad. En las 2 semanas de aclimatación, los ostiones se alimentaron con una dieta de microalgas concentradas en pasta, Shellfish Diet 1800 (Reed Mariculture), a una concentración de 2×10^6 células por organismo por día. Previo al inicio de los experimentos, todos los organismos se indujeron a la liberación de gametos por medio de shock térmico, realizando cambios de temperatura $\pm 5^\circ\text{C}$ durante periodos de 20 minutos (Hellm *et al.*, 2006). Esto con el fin de contar con organismos no maduros sexualmente para el inicio de los experimentos (Figura 5).

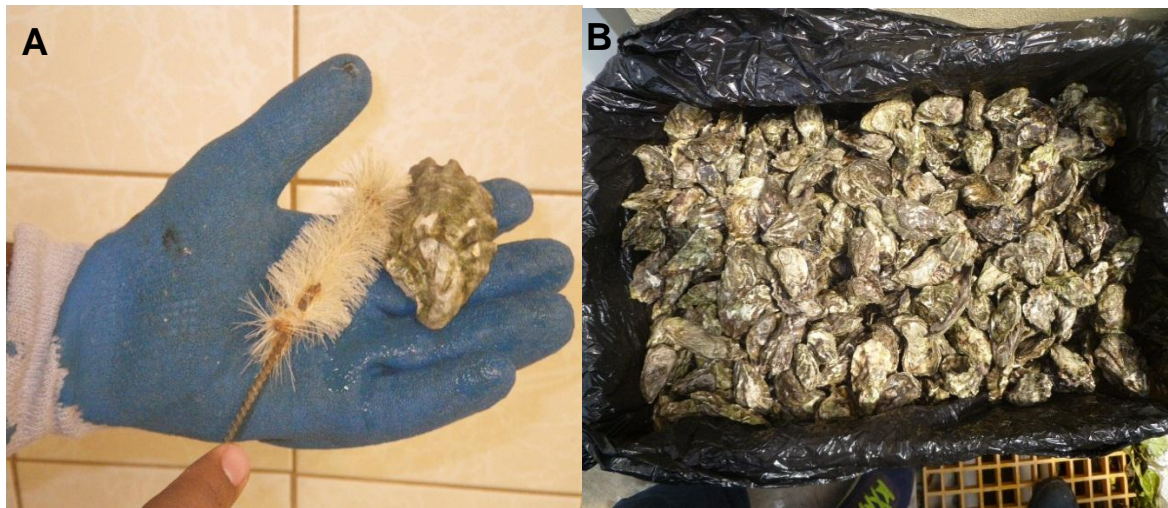


Figura.5. Limpieza de las valvas del ostión *Crassostrea sikamea* para eliminar epibiontes (A). Inducción a la liberación de gametos por medio de shock térmico (B).

2.03 Marcación de organismos

Previo a cada experimento se procedió a marcar a cada uno de los ostiones, para ello se utilizaron etiquetas plásticas de diferentes colores pegadas con acrílico para facilitar la identificación. La numeración de los ostiones por experimento fue en forma continua del 1 al 240, donde el total de ostiones se repartió en 12 sistemas de maduración, los cuales fueron enumerados del 1 al 12 (Figura 6). Durante los experimentos el sistema 4 y sistema 12 fueron destinados como control.

2.04 Descripción del sistema de recirculación acuícola para la maduración de reproductores

Cada sistema de maduración constó de un tanque de color transparente de fondo plano de 0.30 m de diámetro x 0.38 m de alto, con una capacidad máxima de 22 l, revestido con material aislante para mantener la temperatura del agua. El tanque fue conectado a un filtro biológico de 0.38 m de diámetro x 0.60 m de alto,

con una capacidad máxima de 40 l, forrado con material aislante para mantener la temperatura del agua.

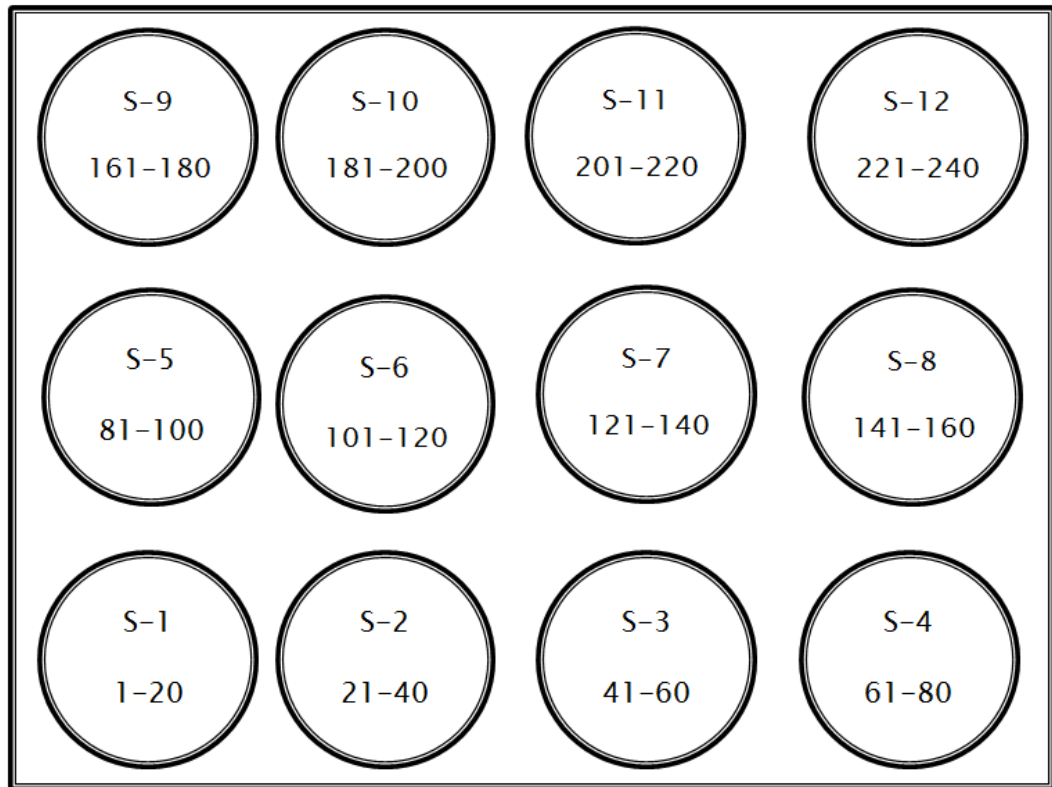


Figura.6. Ubicación de los 12 sistemas de recirculación acuícola para la maduración del ostión *Crassostrea sikamea*. Se presenta la numeración de los sistemas (S-) y la numeración de los ostiones en cada unidad. Sistema S- 4 y S-12 destinados como control durante el periodo experimental.

El filtro biológico contó con un medio de cuentas plásticas de 2-3 mm de diámetro con una densidad específica de 1.022 g/cm^3 , y una relación área-volumen de $1150\text{-}1475 \text{ m}^2/\text{m}^3$. En el filtro biológico para la remoción de sólidos suspendidos, se contó con un fraccionador de espuma. El sistema contó con 2 válvulas de 0.0325 m de diámetro, con las cuales se controló el flujo del agua al momento de la alimentación de los organismos (Figura 7). Para promover el crecimiento de bacterias nitrificantes cada SRA fue aclimatado por 5 semanas

antes de iniciar el primer experimento (Simmonel *et al.* 2002). El flujo de agua en todos los sistemas se llevo a cabo por medio de bombeo con aire, el cual se abasteció por medio de una tubería principal de 0.075 m de diámetro la cual estaba conectada a un aireador regenerativo eléctrico de 1HP (S43, Aquatic Eco-systems).

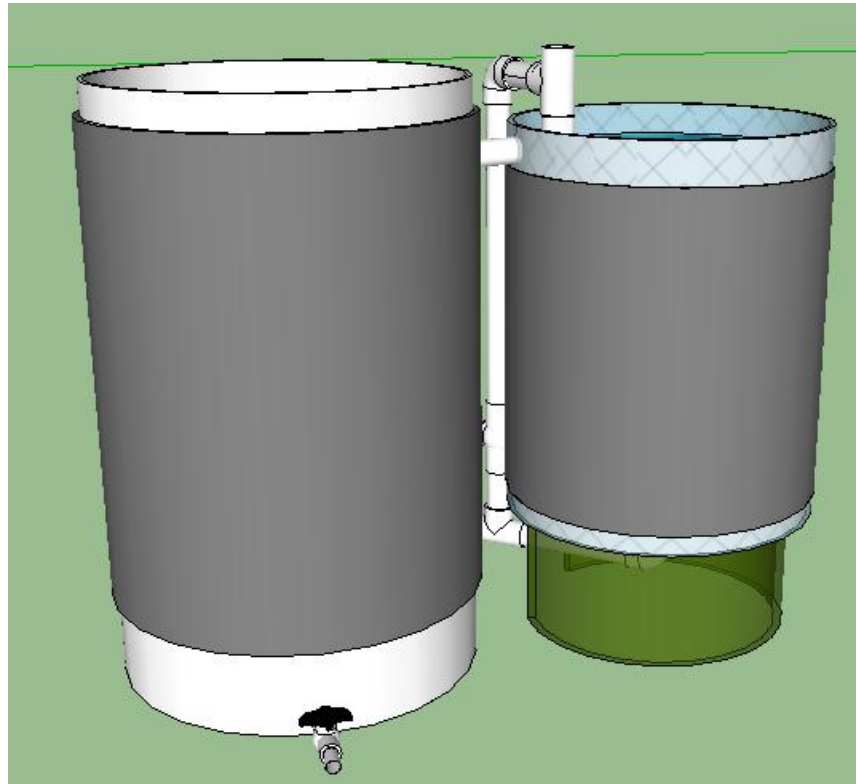


Figura.7. Sistema de recirculación acuícola para maduración de ostión *Crassostrea sikamea*, se presenta el filtro biológico de cuentas plásticas, y tanque de maduración para los organismos.

2.05 Calidad del agua

Las variables de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), la salinidad (g/kg), el oxígeno disuelto (mg/l) y el potencial de hidrógeno (pH) se monitorearon diariamente en todos los sistemas. Para medir la temperatura y el oxígeno disuelto, se utilizó un oxímetro portátil (55-12 YSI). El pH se midió con un potenciómetro manual (pH10 YSI). La salinidad se midió con un refractómetro de campo (SR-6 VITALSINE).

Las variables físico-químicas como el nitrógeno amoniacal total (NAT), los nitritos (NO_2), los nitratos (NO_3) y la alcalinidad (CaCO_3) se midieron semanalmente con un kit portátil para acuarios marino (Marine Lab - Red Sea) y cada quince días con un equipo para calidad de agua marina HATCH utilizando los métodos 8039, 8507 y 8155 respectivamente.

2.06 Control de temperatura en los sistemas de maduración

Para mantener la temperatura del agua en el primer experimento se utilizaron calentadores eléctricos de 250 watts. Para el experimento 2 y 3 se utilizaron calentadores de titanio de 500 watts (JH500, Aquatic Eco-systems), controlados con un termostato de $\pm 0.5^\circ\text{C}$ de precisión. Cada SRA contó con un calentador eléctrico y un termostato para poder manipular la temperatura del agua a lo largo de los experimentos.

2.1 Experimento 1

2.11 Evaluación del perfil de temperatura en los sistemas de maduración y la calidad del agua

Este experimento se realizó para evaluar la efectividad en el control de la temperatura en los SRA durante las 10 semanas de experimentación y determinar si el equipo utilizado para el incremento de temperatura era el adecuado. En forma paralela se realizó un protocolo de manejo para optimizar el funcionamiento de los SRA para los posteriores experimentos. La temperatura se aumentó gradualmente de 18°C al inicio del experimento hasta alcanzar 26°C de la semana 8 a la semana 10 (Figura 9). Este rango de temperatura fue utilizado para ver la capacidad máxima de calentadores así como la capacidad de los SRA para mantener constante la temperatura del agua. Para aumentar la temperatura en los SRA se utilizó el equipo descrito en la capítulo 2.06. Para determinar la calidad del agua durante el experimento se utilizó la metodología descrita en el capítulo 2.05.

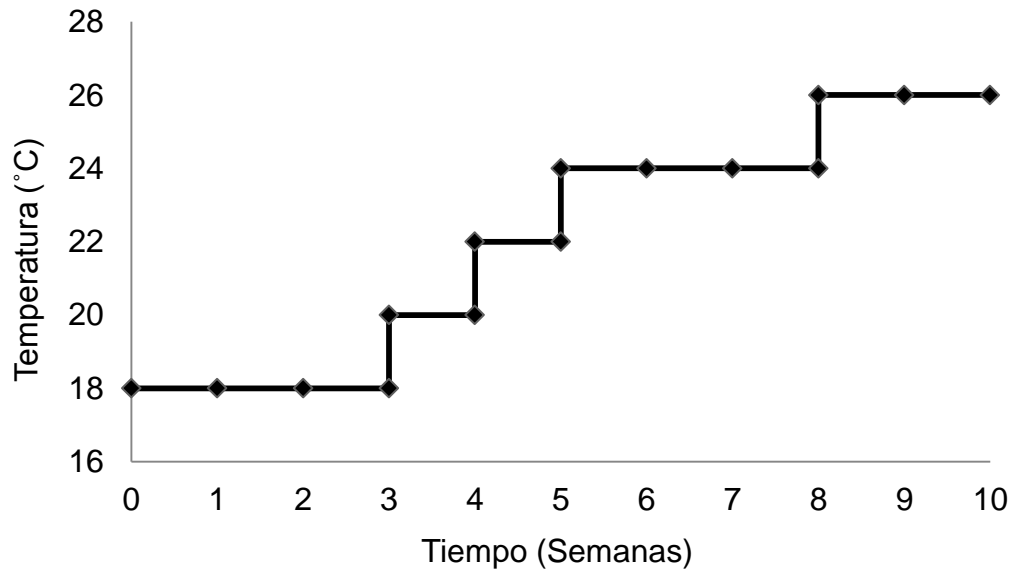


Figura. 8. Perfil de temperatura planteado para el experimento 1 durante las 10 semanas de maduración del ostión *Crassostrea sikamea* en un sistema de recirculación acuícola.

2.12 Alimentación

Los ostiones se alimentaron con una dieta comercial de microalgas concentradas en pasta, Shellfish Diet 1800 (Reed Mariculture), la cual es una mezcla de *Isochrysis* spp, *Pavlova* spp, *Thalassiosira weissflogii* y *Tetraselmis* spp (Tabla 1) en una concentración de 2×10^9 células/ml. La cantidad de alimento por organismos al día fue de 2×10^8 células, la cual se dividió al día en dos raciones para su mejor asimilación. La concentración de microalgas en los SRA no excedió las 100,000 cel/ml a fin de evitar la producción de pseudoheces (Muranaka y Lannan, 1984). A fin de determinar la concentración de microalgas en los SRA y verificar el consumo del alimento se realizó una curva de calibración. Utilizando diluciones al 2%, 1.5%, 1% y 0.5% del concentrado original de microalgas. Las diluciones se leyeron por triplicado utilizando un espectrofotómetro (DR/2400 HACH) a 550 nm de longitud de onda.

Posteriormente se llevó a cabo el conteo de células por triplicado de cada dilución en un hematocitómetro para determinar el número de células por mililitro. Con los resultados obtenidos del conteo de células y la absorbancia se realizó una regresión lineal para determinar la densidad de microalgas en los sistemas por medio de la sustitución de los productos en dicha ecuación.

Tabla 1. Composición total de las diferentes microalgas que conforman la pasta comercial Shellfish Diet 1800 y su concentración porcentual de lípidos.

Microalgas	% de microalgas en la mezcla	Lípidos %
<i>Isochrysis</i> spp	30	20-24
<i>Pavlova</i> spp	20	20-24
<i>Thalassiosira weissflogii</i> spp	20	6
<i>Tetraselmis</i> spp	30	24

2.13 Análisis estadístico

Para todos los datos se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas. Para la comparación de medias de la temperatura, del oxígeno disuelto, el pH y la salinidad se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Cuando se encontraron diferencias significativas se utilizó una prueba tipo Tukey con un nivel de significancia de $P < 0.05$. Todos los datos fueron evaluados con el software Statistica versión 7.

2.2 Experimento 2

2.21 *Biometría de organismos y mortalidad*

Al inicio y durante el experimento se midió el peso (0.01g) y la longitud (0.1mm). El peso se determinó con una balanza electrónica (Scout PRO 200g). El largo, el ancho y el alto de los organismos fueron determinados con un vernier. Las biometrías se registraron en la semana 0, 3, 7 y 10 (Figura 8).

La mortalidad se determinó como el número total de muertes en la población durante el periodo de maduración. Todos los días se revisaron los SRA para la extracción de organismos muertos.

2.23 *Calidad del agua*

Para determinar la calidad del agua durante el experimento se utilizó la metodología descrita en el capítulo 2.05 y 2.06.

2.24. *Alimentación*

Los organismos se alimentaron durante el experimento 2 siguiendo las modificaciones y la metodología descrita en el capítulo 2.12

2.25 *Índice de condición*

El índice de condición (IC) se determinó tomando una muestra aleatoria de 18 organismos en los SRA en cuatro diferentes tiempos: al inicio en la semana 0 y 3 (18°C). En la semana 7 (22°C) y al final del experimento en la semana 10 (24°C), (Figura 10). El IC de los organismos mantenidos en los sistemas control se determinó en la semana 0 control inicial (CI) y en la semana 10 control final (CF).

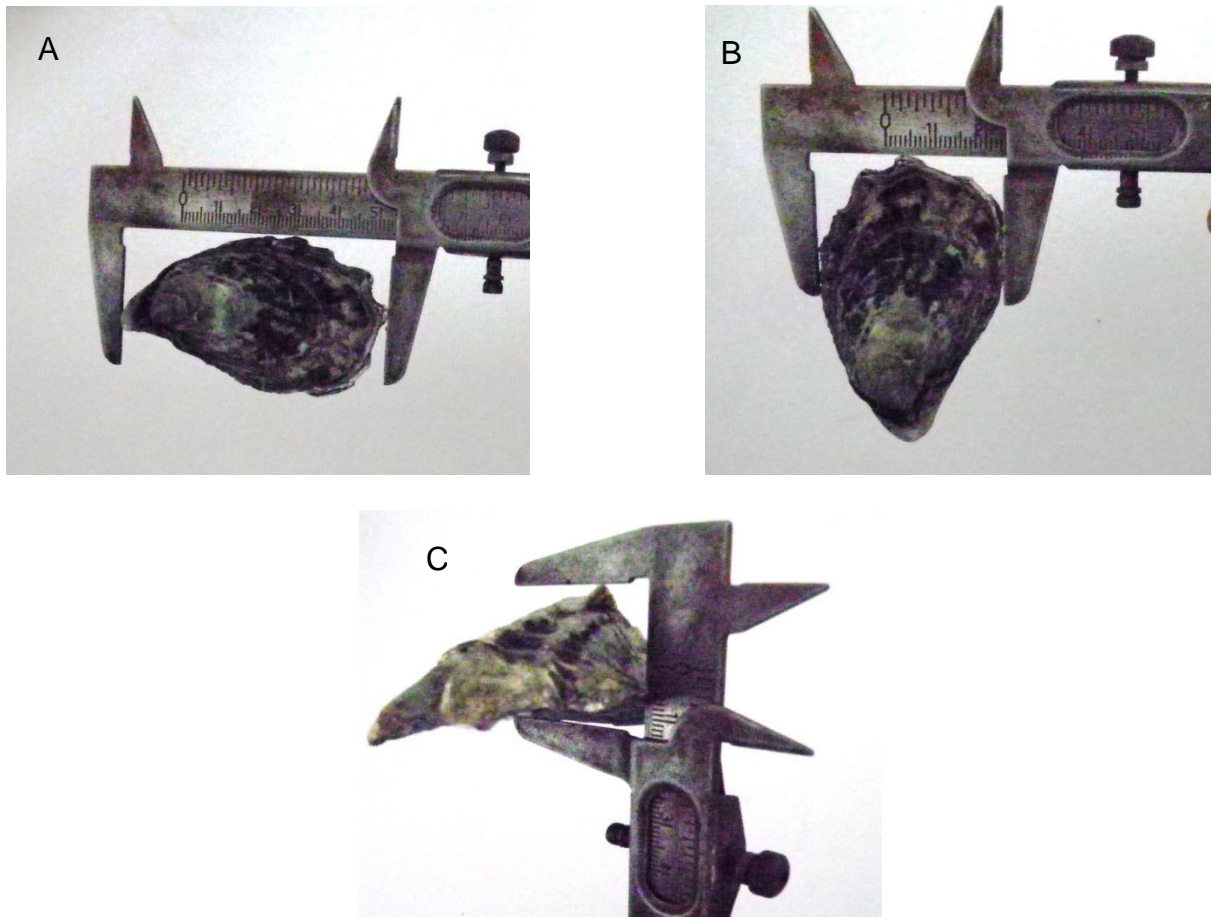


Figura.9. Medición de valvas del ostión *Crassostrea sikamea* durante la biometría, largo de la valva (A), ancho de la valva (B), alto de la valva (C).

Las valvas y cuerpo de cada ostión se colocaron por separado en navecillas, previamente marcadas y secadas hasta obtener un peso constante. El peso seco de los ostiones se determinó introduciéndolos en una estufa a 60°C por 48 horas para su posterior pesado en una balanza electrónica con una precisión de 0.01 mg (182 A AND). Con los datos obtenidos se calculó el índice de condición con la fórmula establecida por Lucas y Beninger (1985, p. 192):

$$IC = \frac{\text{Peso seco de la carne (g)}}{\text{Peso seco de la concha (g)}} \times 100 \quad (1)$$

2.26 Determinación de la tasa metabólica por el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada a diferentes temperaturas

El consumo de oxígeno y la excreción amoniacal en los ostiones se determinaron para tres diferentes temperaturas 18°C, 22°C y 24°C (Fig. 10). Los organismos que se utilizaron para determinar el índice de condición fueron los mismos utilizados previamente para la determinación de la tasa metabólica (18 ostiones por temperatura). Los ostiones utilizados en este experimento se tuvieron en ayuno por 24 horas para llevarlos a un estado post-absortivo. El agua de mar de las pruebas metabólicas se filtró a 10, 5 y 1 micras y lámparas UV (25 W) antes de las mediciones para disminuir los errores causados por la calidad del agua.

Para determinar el consumo de oxígeno (VO_2/W) se utilizó la técnica de respirometría descrita por Díaz-Iglesias *et al.* (2010). Para ello se utilizaron 4 cámaras metabólicas de acrílico de una capacidad individual de 500 ml cada una. Cada cámara se encontraba conectada a un electrodo polarográfico (928, Strathkelvin Instruments) que determinó la concentración de oxígeno disuelto (0.01 mg/l), controladas por un software Oxígeno interface (928, Strathkelvin Instruments). La temperatura en las cámaras metabólicas se reguló por medio de un controlador de temperatura programable. Tres de las cámaras metabólicas contenían 6 ostiones cada una y una cámara control no contenía ostiones. Las mediciones de consumo de oxígeno se llevaron a cabo por un periodo menor a 30 minutos para evitar un consumo de oxígeno mayor al 30% de la concentración al inicio del experimento. La diferencia entre la concentración de oxígeno inicial y la concentración final en las cámaras metabólicas se determinó como el consumo de oxígeno de los organismos expresado en mgO_2/g peso seco/h.

La excreción amoniacal (U/W) producida por los ostiones en las cámaras metabólicas se determinó por medio de la técnica de Azul de Indofenol en microplaca a una longitud de onda de 640 nm (Rodier, 1981). La determinación de excreción amoniacal se llevó a cabo en forma paralela a la de consumo de oxígeno.

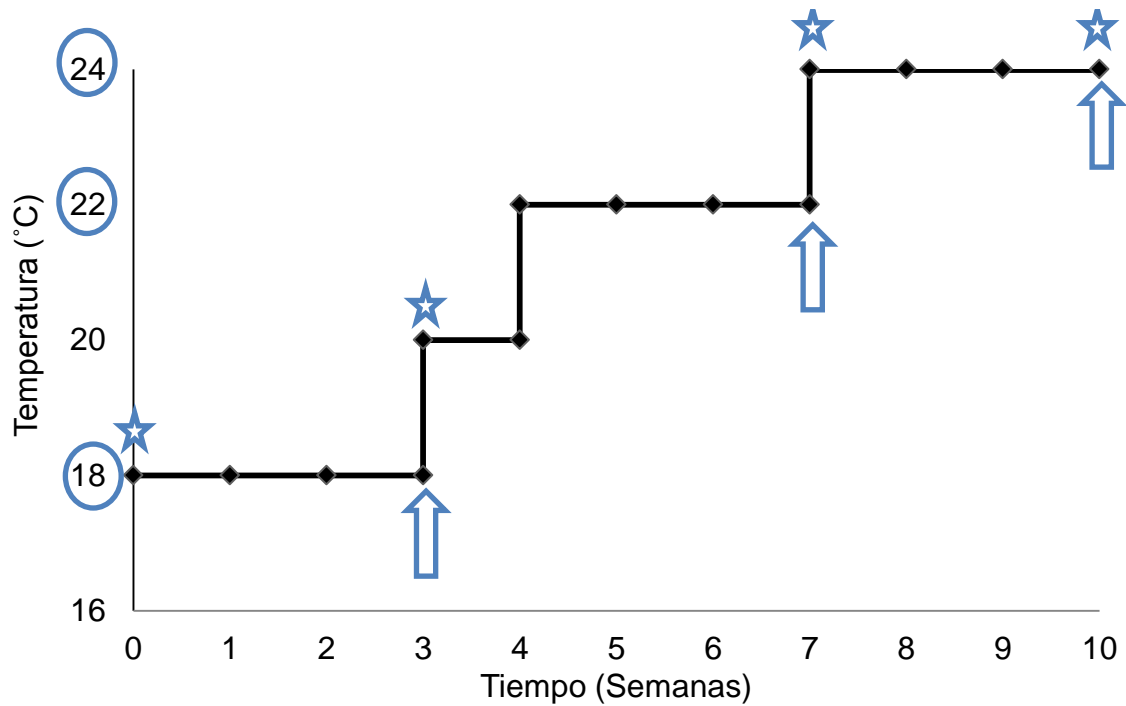


Figura. 10. Diagrama del período de maduración y perfil de temperaturas usado para la maduración del ostión *Crassostrea sikamea*. Las estrellas indican los tiempos en los cuales se determinó el índice de condición. Las flechas indican los tiempos en que se determinó la tasa metabólica a 3 diferentes temperaturas (18 °C, 22 °C y 24 °C).

Para ello se tomó una muestra de 2 ml de cada cámara metabólica al inicio y al final del experimento de consumo de oxígeno. La diferencia entre la concentración de amoníaco inicial y la concentración final en las cámaras metabólicas se determinó como la excreción amoniacal de los organismos expresado en mgNH_4/g peso seco/h. Para determinar el sustrato metabólico utilizado durante las diferentes temperaturas del periodo de maduración del ostión Kumamoto se utilizó la relación atómica Oxígeno-Nitrógeno (Mayzaud y Conover, 1988, p. 298) (Tabla 2). Los datos de consumo de oxígeno y excreción amoniacal se convirtieron a microátomos-gramos:

$$\text{Relación O:N} = \frac{V_{O_2} \times 62.5}{U \times 48.5} \quad (2)$$

Donde:

VO_2 / W = Consumo de oxígeno (mgO₂/g peso seco/h)

62.5 = Equivalente calórico del oxígeno

U/W = Excreción amoniaca (mgNH₄/g peso seco/h)

48.5 = Equivalente calórico del nitrógeno

Los resultados obtenidos se compararon con la tabla 2 para determinar el sustrato metabólico utilizado por los ostiones.

Tabla 2. Valores de la relación atómica O:N para los diferentes sustratos metabólicos descritos por Mayzaud y Conover (1988).

SUSTRATO METABÓLICO	O:N
Catabolismo de proteínas puras	3-16
Oxidación de cantidades equivalentes proteínas y lípidos	50-60
Oxidación de carbohidratos y lípidos	>60

2.27 Análisis histológico del desarrollo gonádico del ostión Kumamoto durante la maduración en SRA

Para determinar el desarrollo gonádico de los ostiones durante el período de maduración se realizaron cortes histológicos a diferentes tiempos y temperaturas: al inicio semana 0 y 3 (18°C), en la semana 7 a 22°C y al final del experimento en la semana 10 (24°C). El número de organismos analizados por semana fue de 10. Así mismo se realizaron cortes histológicos a los organismos utilizados como control al inicio (CI) y final del experimento (CF). Para realizar el análisis histológico se tomó una fracción del tejido blando de cada organismo haciendo un

corte transversal oblicuo centrado en la región media de la glándula digestiva, seguido de un segundo corte transversal a ~5 mm posterior al primer corte. El tejido obtenido de cada organismo se colocó en un casete histológico, previamente rotulado y se fijó en solución Davison. Posteriormente la muestra se deshidrató con etanol (70% hasta alcohol absoluto) y finalmente se incluyó en parafina (Vásquez-Yeomans, 2006).

Los cortes histológicos se hicieron con un micrótopo (American Optical) a 5 μm de espesor. Las muestras se colocaron en portaobjetos y se tiñeron utilizando la técnica de hematoxilina-eosina-floxina (Shaw y Battle, 1957). Las laminillas histológicas se examinaron con un microscopio óptico (80i eclipse Nikon) con un aumento de 200X para determinar el estado de madurez en los ostiones. Posteriormente las laminillas fueron fotografiadas con una cámara digital (VF Evolution) conectada al microscopio óptico. La clasificación utilizada para determinar el grado de madurez de los reproductores de ostión fue aquella descrita por Steele y Mucahy (1999) (Tabla 3 y 4).

Tabla 3. Clasificación de los estadios utilizados para determinar el desarrollo gonádico de las hembras de ostión *Crassostrea sikamea*.

Estadio	Descripción
Indiferenciado	Ácinos pequeños y contraídos. Presencia de algunas células sexuales tempranas, probablemente poco visibles.
Desarrollo	Ovogonias presentes, no hay ovocitos libres. Mucho tejido conectivo.
Maduro	Los ácinos están llenos de ovocitos, los ovocitos libres con núcleo y nucléolo visibles.
Desovado	Los ovocitos libres pero poco compactados. Las paredes de los ácinos aparentemente rotas, ácinos vacíos y presencia de fagocitos.
Reabsorción	El tejido conectivo es aparente en los ácinos, los ovocitos pueden ser vistos en proceso de citólisis. Presencia de fagocitos en los ácinos.

Tabla 4. Clasificación de los estadios utilizados para determinar el desarrollo gonádico de los machos de ostión *Crassostrea sikamea*.

Estadio	Descripción
Indiferenciado	Ácinos pequeños y contraídos. Presencia de algunas células sexuales tempranas, probablemente poco visibles.
Desarrollo	Muchos ácinos pequeño. Espermatogonias y espermatocitos numerosos, puede o no haber espermatozoides, si hay presencia de espermatozoides las colas están en dirección del lumen del ácino, en el centro del ácino, presencia de tejido conectivo.
Maduro	El tejido ínter folicular y epitelio germinal no son evidentes. Los ácinos están llenos de espermatozoides con las colas orientadas hacia el lumen del ácino
Desovado	Los ácinos vacíos o parcialmente vacíos, si hay presencia de espermatozoides están un poco compactados en los ácinos o en los conductos de espermas. El tejido conectivo crece rápidamente entre los ácinos, citolisis de las células germinales presentes y grandes cantidades de fagocitos.
Reabsorción	El tejido conectivo es aparente en los ácinos, infiltración de fagocitos en los ácinos.

2.28 Análisis estadístico

Para todos los datos se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas. Para la comparación de medias en la calidad de agua e índice de condición se utilizó respectivamente un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Cuando se presentaron diferencias significativas se utilizó una prueba Tukey con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

Para el análisis de la tasa metabólica: el consumo de oxígeno, la excreción amoniacal y la relación atómica O:N se utilizó una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de $P < 0.05$. Para llevar a cabo todos los análisis estadísticos se utilizó el software Statistica versión 7.

2.3 Experimento 3

2.31 Alimentación

Los organismos se alimentaron durante el experimento 3 siguiendo las modificaciones y la metodología descrita en el capítulo 2.12

2.32 Calidad del agua

Para determinar la calidad del agua durante el experimento se utilizó la metodología descrita en el capítulo 2.05 y 2.06.

2.33 Índice de condición

El índice de condición de los ostiones durante el experimento 3 se determinó en la semana 0 y 3 (18°C), semana 6 (20°C), semana 9 (22°C) y semana 10 (24°C), así como a los organismos control al inicio (CI) y al final (CF) del experimento utilizando la metodología descrita en el capítulo 2.25.

2.34 Maduración de ostiones por medio de la temperatura acumulada efectiva

Para realizar este experimento se utilizó la técnica de temperatura acumulada efectiva (TAE) descrita por Man (1979), donde la acumulación de temperatura por un periodo determinado promueve el desarrollo gonádico de los moluscos. El cero biológico, el cual es la temperatura donde los organismos no tienen la capacidad de iniciar la gametogénesis fue 12°C. Como se recomienda para los ostiones del género *Crassostrea*, (Helm *et al*, 2006, p. 72).

$$Y = \sum t_i - \Theta \quad (3)$$

Donde:

Y = Temperatura acumulada efectiva (TAE)

Ti = Temperatura diaria a la que está expuesta el organismos ($t > \Theta$)

Θ = Punto cero biológico para el desarrollo gónada.

Se mantuvieron los ostiones por un periodo de 10 semanas en los SRA aumentando la temperatura gradualmente de 18°C a 24°C (Figura 11). La temperatura del agua se midió diariamente durante todo el periodo de maduración en los SRA.

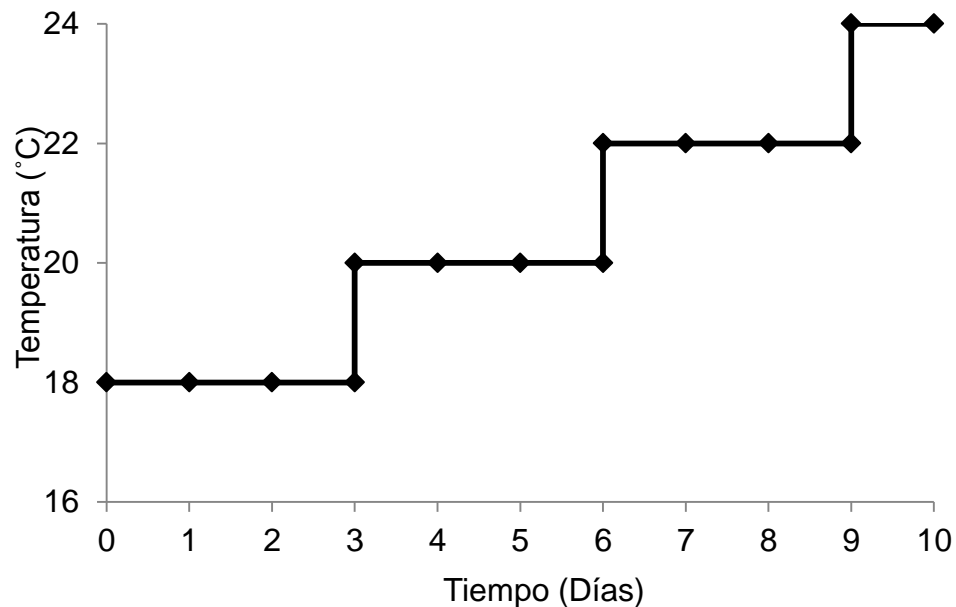


Figura.11. Perfil de temperatura planteado para el experimento 3 durante las 10 semanas de maduración del ostión *Crassostrea sikamea* en un sistema de recirculación acuícola, utilizando la temperatura acumulada efectiva. Se presenta el aumento gradual de la temperatura de 18°C hasta 24°C.

2.35 Análisis histológico del desarrollo gonádico del ostión Kumamoto durante la maduración en SRA por medio de la temperatura acumulada efectiva

Para determinar el desarrollo gonádico de los ostiones durante el periodo de maduración en el experimento 3, se realizaron cortes histológicos a diferentes tiempos y temperaturas: semana 0 y 3 (18°C), en la semana 6 (20°C), semana 9 (22 °C) y semana 10 (24 °C). Se realizaron cortes histológicos de los organismos control al inicio (CI) y final del experimento (CF). Para realizar la histología de los ostiones se utilizó la metodología descrita en el capítulo 2.27.

2.36 Análisis estadístico

Para todos los datos se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas. Para la comparación de medias en la calidad de agua e índice de condición se utilizó respectivamente un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Cuando se presentaron diferencias significativas se utilizó una prueba Tukey con un nivel de significancia de $P < 0.05$. Para llevar a cabo todos los análisis estadísticos se utilizó un el software Statistica versión 7.

3. Resultados

3.0 Experimento 1

3.01. Evaluación del perfil de temperatura en los sistemas de maduración y la calidad del agua

La temperatura medida en los SRA a lo largo de las 10 semanas presentó una tendencia de incremento. Sin embargo después de la semana 4 no se pudo mantener la temperatura en los SRA con respecto a la temperatura planteada para el experimento (Figura 11). Se encontraron diferencias altamente significativas en la temperatura medida ($P = 0.0001$) en los SRA durante las 10 semanas de experimento. La temperatura más baja se reportó en primeras 3 semanas (18°C), la temperatura más alta (23°C) se presentó en la semana 10 (Figura 12 y Tabla V).

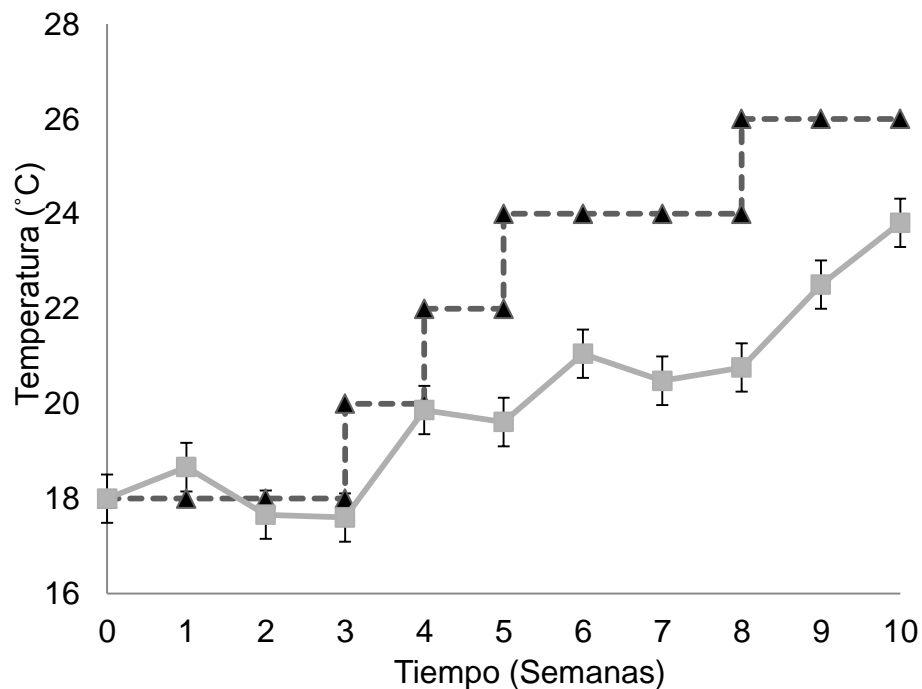


Figura.12. Perfil de temperatura (media \pm desviación estándar) durante las 10 semanas del experimento 1. Líneas punteadas (---) representan la temperatura planteada durante el experimento, línea continua (—) presenta la temperatura registrada en los sistemas de recirculación acuícola a lo largo del experimento.

Se encontraron diferencias altamente significativas ($P = 0.001$) en la concentración de oxígeno disuelto (O_2 mg/l) a lo largo del periodo experimental. La concentración de oxígeno más elevada (6.73 mg/l) se presentó a 18°C. A 20°C se presentó la concentración de oxígeno más baja (5.13 mg/l) (Tabla 5).

No se encontraron diferencias significativas en el pH a lo largo de las 10 semanas ($P = 0.438$), (Tabla 5). Se encontraron diferencias altamente significativas ($P = 0.001$) en la salinidad (g/Kg) a lo largo del periodo experimental. En las temperaturas de 18°C y 20°C se presentaron las menores concentraciones de salinidad (34 g/Kg). A 22°C se presentó un aumento en la salinidad (36 g/Kg) que se mantuvo constante hasta que el agua alcanzó los 26°C al finalizar el experimento (Tabla 5).

Tabla 5. Temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad (media \pm desviación estándar) medida en los sistemas de recirculación acuícola durante las 10 semanas del experimento 1. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas.

Temperatura planteada °C	Temperatura registrada °C	O_2 (mg/l)	pH	Salinidad (g/Kg)
18	17.98 \pm 1.30 ^c	6.73 \pm 0.87 ^a	7.93 \pm 0.18 ^a	34.45 \pm 1.51 ^b
20	19.87 \pm 1.21 ^b	5.13 \pm 0.74 ^c	7.97 \pm 0.11 ^a	34.67 \pm 1.81 ^b
22	19.62 \pm 1.56 ^{bc}	5.35 \pm 0.77 ^{bc}	8.01 \pm 0.08 ^a	36.07 \pm 1.74 ^a
24	20.77 \pm 2.27 ^b	5.49 \pm 0.76 ^b	8.03 \pm 0.11 ^a	36.01 \pm 1.77 ^a
26	23.16 \pm 2.28 ^a	5.59 \pm 0.77 ^b	8.15 \pm 0.09 ^a	35.69 \pm 2.75 ^a

3.02 Conteo de microalgas en los sistemas de maduración

La ecuación lineal obtenida del análisis de regresión ($y = 0.0184x + 0.0088$) para relacionar la absorbancia con la concentración de microalgas se utilizó para determinar el número de microalgas por mililitro en los SRA el cual presentó un $r^2 = 0.9982$ (Figura 13).

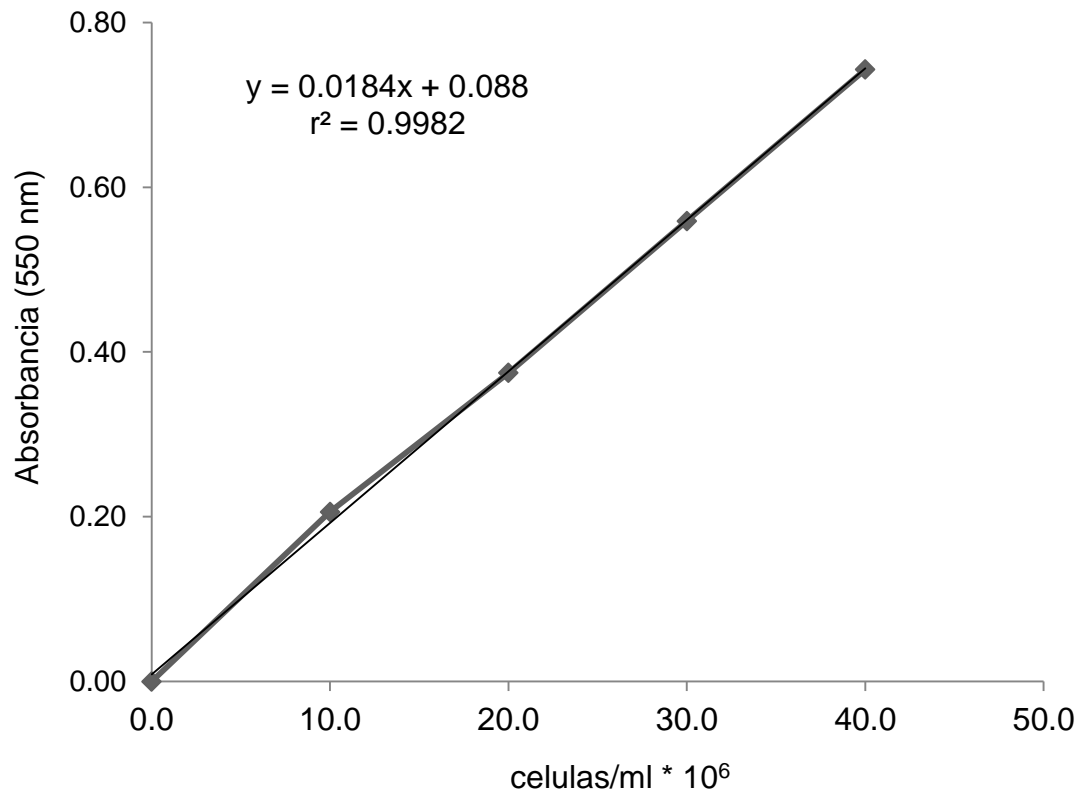


Figura.13. Curva de calibración para determinar la concentración de microalgas en los sistemas de recirculación acuícola por medio de absorbancia a una longitud de onda de 550 nm. Se presenta la ecuación lineal y el coeficiente de terminación.

3.1 Experimento 2

3.11 *Biometría de organismos y mortalidad*

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.108$) en el peso húmedo total de los ostiones durante el periodo de maduración (Tabla VI). Tampoco se encontraron diferencias significativas ($P = 0.395$) en el largo, el ancho y el alto de la concha de los ostiones durante el periodo de maduración (Tabla 6).

Tabla 6. Peso húmedo total (g), largo, ancho y alto de las valvas (cm) (media \pm desviación estándar) de los ostión *Crassostrea sikamea* durante la semana 0, 3, 7 y 10 en los sistemas de recirculación acuícola. Letras diferentes indican diferencias a>b>c> significativas.

Semana	T °C	Peso (g)	Largo (cm)	Ancho (cm)	Alto (cm)
0	18	34.8 \pm 12.2 ^a	6.6 \pm 1.2 ^a	4.1 \pm 0.5 ^a	2.2 \pm 0.4 ^a
3	18	28.5 \pm 9.5 ^a	5.1 \pm 1.1 ^a	3.2 \pm 0.4 ^a	2.1 \pm 0.3 ^a
7	22	29.8 \pm 7.1 ^a	8.9 \pm 1.5 ^a	4.9 \pm 0.4 ^a	2.1 \pm 0.3 ^a
10	24	29.9 \pm 6.6 ^a	5.9 \pm 0.7 ^a	3.9 \pm 0.5 ^a	2.1 \pm 0.3 ^a

Durante el periodo de maduración del ostión Kumamoto se presentó una mortalidad total de 23 ostiones (9.8% de la población). El mayor número de organismos muertos, el 5% de la población se reportó en la semana 4 (día 26) con una temperatura del agua de 20°C (Figura 14).

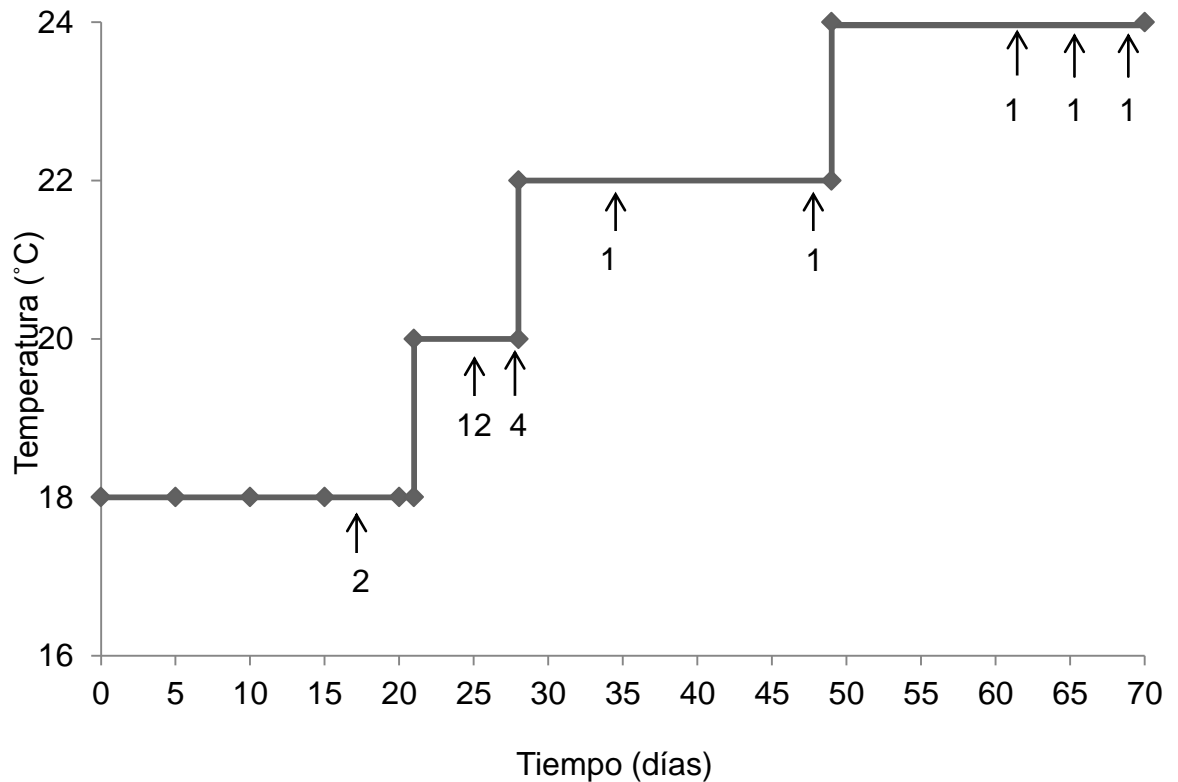


Figura. 14. Mortalidad del ostión *Crassostrea sikamea* reportada durante los 70 días (10 semanas) de maduración en los sistemas de recirculación acuícola. Las flechas indican el día en que se presentó mortalidad y los números la cantidad de organismos muertos registrados.

3.12 Calidad del agua

Se encontraron diferencias significativas en todas las variables que influyeron en la calidad de agua a lo largo del experimento. En la temperatura del agua se encontraron diferencias altamente significativas ($P = 0.001$) con aumentos graduales durante las 10 semanas de experimento (Figura 15). El perfil de temperatura planteado para el experimento 2 y la temperatura medida en los SRA fueron similares a lo largo del periodo experimental (Tabla 7). Se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0034$) en la concentración del oxígeno disuelto.

La mayor concentración de oxígeno disuelto (5.78 mg/l) se reportó a los 18°C mientras que la menor concentración (5.5 mg/l) se reportó a 20°C. Esta concentración se mantuvo hasta finalizar el experimento (Tabla 7). Se encontraron diferencias altamente significativas ($P = 0.001$) en el pH. El valor más alto de pH (8.46) se reportó cuando la temperatura del agua alcanzó los 24°C, el menor valor (8.26) se reportó a los 18°C. Se encontraron diferencias altamente significativas ($P = 0.001$) en la salinidad. La mayor concentración (34.31 g/kg) fue reportada a 24°C la menor concentración (32.67 g/Kg) se registró en las primeras semanas a 18 ° (Tabla 7).

Tabla 7. Temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad (media \pm desviación estándar), registradas en los sistemas de recirculación acuícola durante el experimento 2. La primera columna presenta la temperatura planteada para el experimento. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas.

Temperatura planteada °C	Temperatura registrada °C	O ₂ (mg/l)	pH	Salinidad (g/Kg)
18	17.92 \pm 0.69 ^d	5.78 \pm 0.42 ^a	8.26 \pm 0.11 ^c	32.67 \pm 2.22 ^c
20	19.94 \pm 0.53 ^c	5.57 \pm 0.34 ^b	8.46 \pm 0.07 ^{ab}	33.78 \pm 0.95 ^b
22	22.04 \pm 0.51 ^b	5.50 \pm 0.46 ^b	8.42 \pm 0.05 ^b	33.55 \pm 0.90 ^b
24	23.96 \pm 0.55 ^a	5.52 \pm 0.51 ^b	8.46 \pm 0.05 ^a	34.31 \pm 0.71 ^a

Se encontraron diferencias altamente significativas ($P = 0.0001$) en la concentración del nitrógeno amoniacal total (NAT). Los valores más altos (0.72 mg/l) fueron reportados a 20°C, la menor concentración (0.31 mg/l) de NAT se reportó a 24°C (Tabla 8).

Se encontraron diferencias altamente significativas ($P = 0.001$) en la concentración de nitritos (NO_2) con la concentración más alta (0.91 mg/l) a los 20°C y la menor concentración (0.05 mg/l) a 24°C (Tabla 8) Se encontraron diferencias altamente significativas ($P = 0.0001$) en la concentración de los nitratos (NO_3), con la mayor concentración (27.50 mg/l) a 20°C. La menor concentración (4.94 mg/l) de NO_2 se reportó cuando la temperatura del agua alcanzó los 24°C (Tabla 8).

La alcalinidad presentó un rango de 75 - 100 mg/l de CaCO_3 durante las 10 semanas de experimento (Tabla 8).

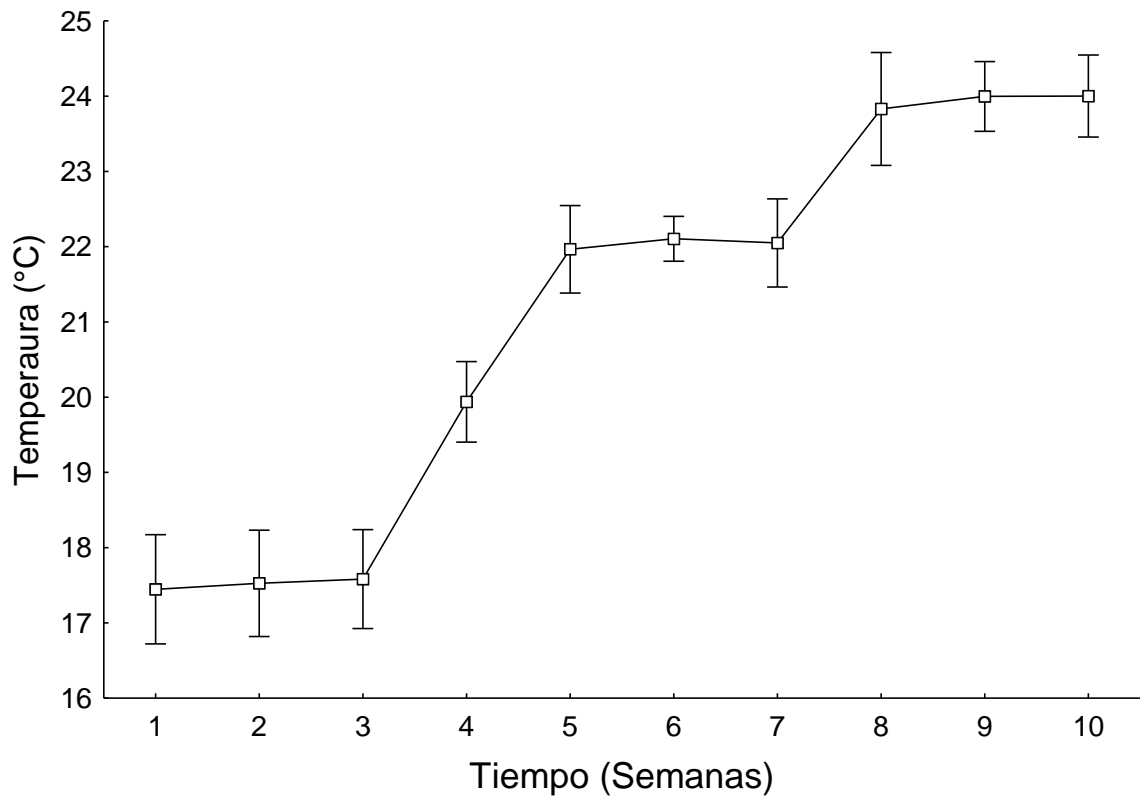


Figura. 15. Perfil de temperatura semanal (media \pm desviación estándar) reportado en el experimento 2 durante la maduración del ostión *Crassostrea sikamea* en sistemas de recirculación acuícola.

Tabla 8. Nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos (NO_2), nitratos (NO_3) y alcalinidad (CaCO_3), (media \pm desviación estándar), registrados durante el experimento 2. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas.

T °C	NAT (mg/l)	NO_2 (mg/l)	NO_3 (mg/l)	Alcalinidad CaCO_3
18	0.58 \pm 0.24 ^{ab}	0.77 \pm 0.30 ^a	17.18 \pm 10.0 ^b	75 – 110
20	0.72 \pm 0.62 ^a	0.91 \pm 0.19 ^a	27.50 \pm 11.3 ^a	75 -110
22	0.45 \pm 0.24 ^{bc}	0.24 \pm 0.30 ^b	10.58 \pm 12.0 ^a	75 – 110
24	0.31 \pm 0.16 ^c	0.05 \pm 0.90 ^c	4.94 \pm 4.50 ^c	75 – 110

3.13 Índice de condición

Se encontraron diferencias altamente significativas ($P = 0.0001$) en el índice de condición (IC) durante las 10 semanas del período de maduración. El mayor IC (60.7 ± 15.0) se registró de la semana 0 a la 3 (18°C). El menor IC (39.1 ± 18.4) se registró al finalizar el experimento (24°C). Los organismos utilizados como control presentaron un decremento significativo en el índice de condición final (45.75) con respecto al índice de condición inicial (64.78), (Figura 16).

3.14 Determinación de la tasa metabólica por el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada a diferentes temperaturas

El consumo de oxígeno durante las tres temperaturas del período de maduración siguió un patrón de disminución ontogénica. A menor peso seco de tejido se presentó un mayor consumo de oxígeno y conforme aumentó el peso seco de tejido hubo un decremento del consumo de oxígeno (Figura 17).

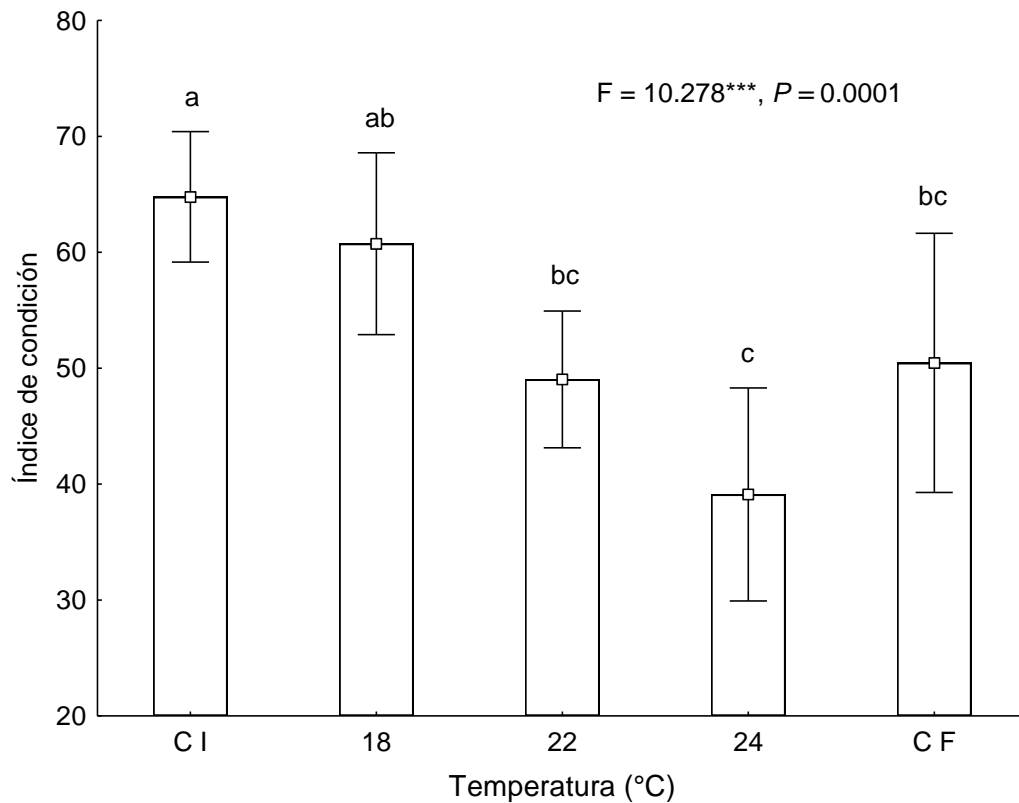


Figura. 16. Índice de condición (media \pm desviación estándar) del ostión *Crassostrea sikamea* durante la maduración en sistemas de recirculación acuícola a diferentes temperaturas. CI, índice de condición de los organismos utilizados como control al inicio del experimento, CF es el índice de condición de los organismos utilizados como control al final del experimento. Letras diferentes $a > b > c > d$ indican diferencias significativas.

Se encontraron diferencias altamente significativas ($P = 0.001$) en el consumo de oxígeno. El mayor consumo de oxígeno se presentó a 24°C (0.92 ± 0.52 $\text{mgO}_2/\text{g p.s/h}$). A 18°C y 22°C no se encontraron diferencias significativas (Tabla 9).

La excreción amoniacal también presentó un patrón de disminución ontogénica, en donde una mayor producción amoniacal ocurrió en los ostiones con menor peso seco del tejido mientras que los de mayor peso seco de tejido presentaron una menor excreción amoniacal (Figura 18).

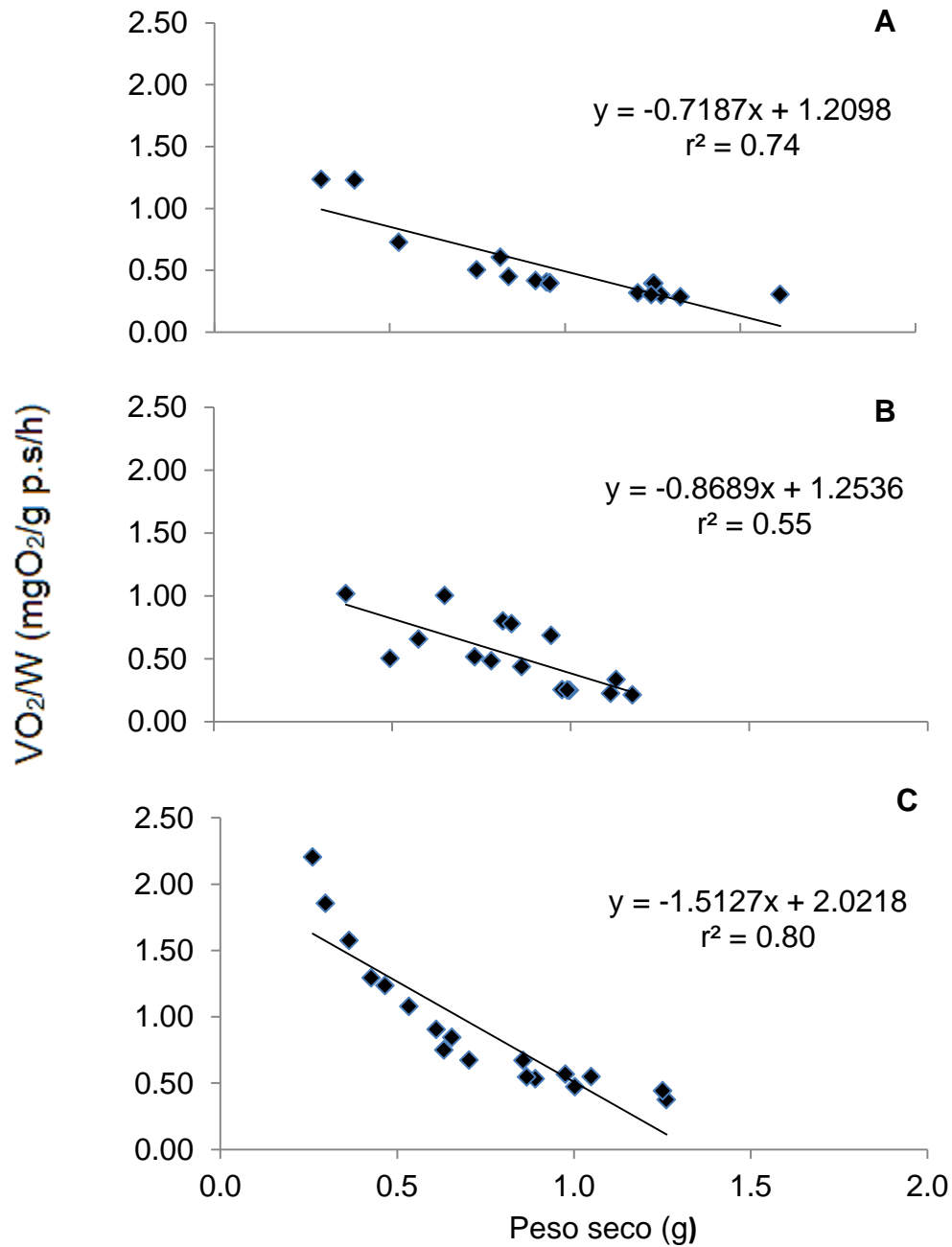


Figura.17. Consumo de oxígeno del ostión *Crassostrea sikamea* (mgO₂/g p.s/h) con respecto al peso seco de tejido (g) en tres diferentes temperaturas, 18° C (A), 22° C (B) y 24° C (C). Se presenta la ecuación lineal así como el r² del consumo de oxígeno en cada temperatura.

Tabla 9. Consumo de oxígeno ($\text{mgO}_2/\text{g p.s/h}$) del ostión *Crassostrea sikamea* a tres diferentes temperaturas 18°C, 22°C y 24°C durante la maduración en sistemas de recirculación acuícola. Se presentan los valores medio, el mínimo, el máximo y la desviación estándar (D.E). Letras diferentes indican diferencias significativas $a>b>c$.

T °C	Media	Min	Max	D.E
18	0.49 ^b	0.22	1.23	0.29
22	0.52 ^b	0.21	1.02	0.27
24	0.92 ^a	0.38	2.20	0.52

Se encontraron diferencias altamente significativas ($P = 0.0001$) en la excreción amoniacal de los reproductores de ostiones donde la mayor concentración se reportó a los 24°C (0.025 $\text{mgNH}_4/\text{g p.s/h}$). No se encontraron diferencia en la excreción amoniacal a los 18°C y 22°C (Tabla 10).

Tabla 10. Excreción amoniacal $\text{mgNH}_4/\text{g p.s/h}$ de los reproductores del ostión *Crassostrea sikamea* a 18°C, 22°C y 24°C durante el periodo de maduración en sistemas de recirculación acuícola. Se presentan los valores promedio, el mínimo, el máximo y la desviación estándar (D.E). Letras diferentes $a>b>c$ representan diferencias significativas.

T °C	Media	Min	Max	D.E
18	0.010 ^b	0.005	0.021	0.005
22	0.007 ^b	0.004	0.016	0.003
24	0.025 ^a	0.012	0.060	0.014

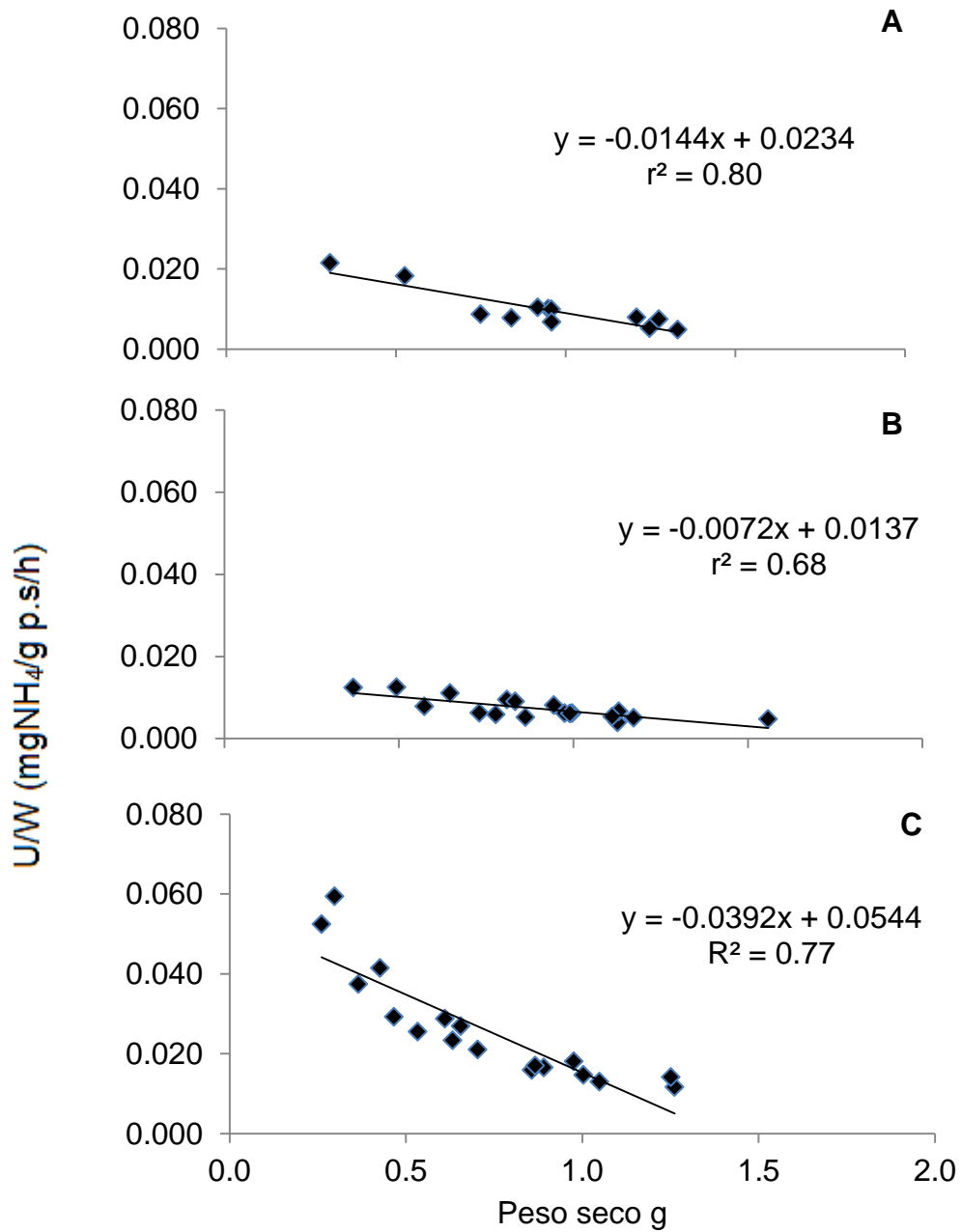


Figura.18. Excreción amoniaca del ostión *Crassostrea sikamea* (mgNH₄/g p.s/h) con respecto al peso seco de tejido (g) en tres diferentes temperaturas. 18°C (A), 22°C (B) y 24°C (C). Se presenta la ecuación lineal así como el r^2 de la excreción amoniaca en cada temperatura.

Los resultados de la relación oxígeno – nitrógeno con las temperaturas de 18°C y 22°C fueron mayores a 60 lo cual indica el uso de una mezcla de carbohidratos y lípidos como sustrato metabólico. A 24°C los resultados fueron menores de 50, lo que indica un uso de cantidades equivalentes de lípidos y proteínas como sustrato metabólico (Tabla 11).

Tabla 11. Relación oxígeno – nitrógeno del ostión *Crassostrea sikamea* a 18°C, 22°C y 24°C durante la maduración en sistemas de recirculación acuícola. Se presentan los valores promedio, el mínimo, el máximo y la desviación estándar (D.E). Letras diferentes representan diferencias significativas a>b.

T °C	Media	Min	Max	D.E.
18	63.29 ^b	51.24	75.60	12.12
22	75.35 ^b	45.83	99.03	19.77
24	45.43 ^a	40.23	54.61	6.56

3.15 Análisis histológico del desarrollo gonádico del ostión Kumamoto durante la maduración en SRA

Las muestras histológicas analizadas de los reproductores de ostión en las semanas 0, 3, 7 y 10, así como los organismos testigo presentaron diferentes estadios de desarrollo gonádico (Tabla 12) La descripción y presentación de las muestras analizadas se presenta en la Figura 19.

Tabla 12. Desarrollo gonádico del ostión *Crassostrea sikamea* durante las 10 semanas de maduración en los sistemas de recirculación acuícola a diferentes temperaturas, así como de los organismos testigo (sin manipulación de la temperatura del agua). Se presenta la semana de acondicionamiento, temperatura del agua y el porcentaje de ostiones en los estadios de desarrollo gonadal.

Semana	Temperatura °C en SRA	Estadio de desarrollo gonádico (%)				
		Indiferenciado	Desarrollo	Maduro	Desovado	Reabsorción
0	18	100	0	0	0	0
3	18	100	0	0	0	0
7	22	0	100	0	0	0
10	24	0	20	80	0	0
Testigo	18	80	20	0	0	0

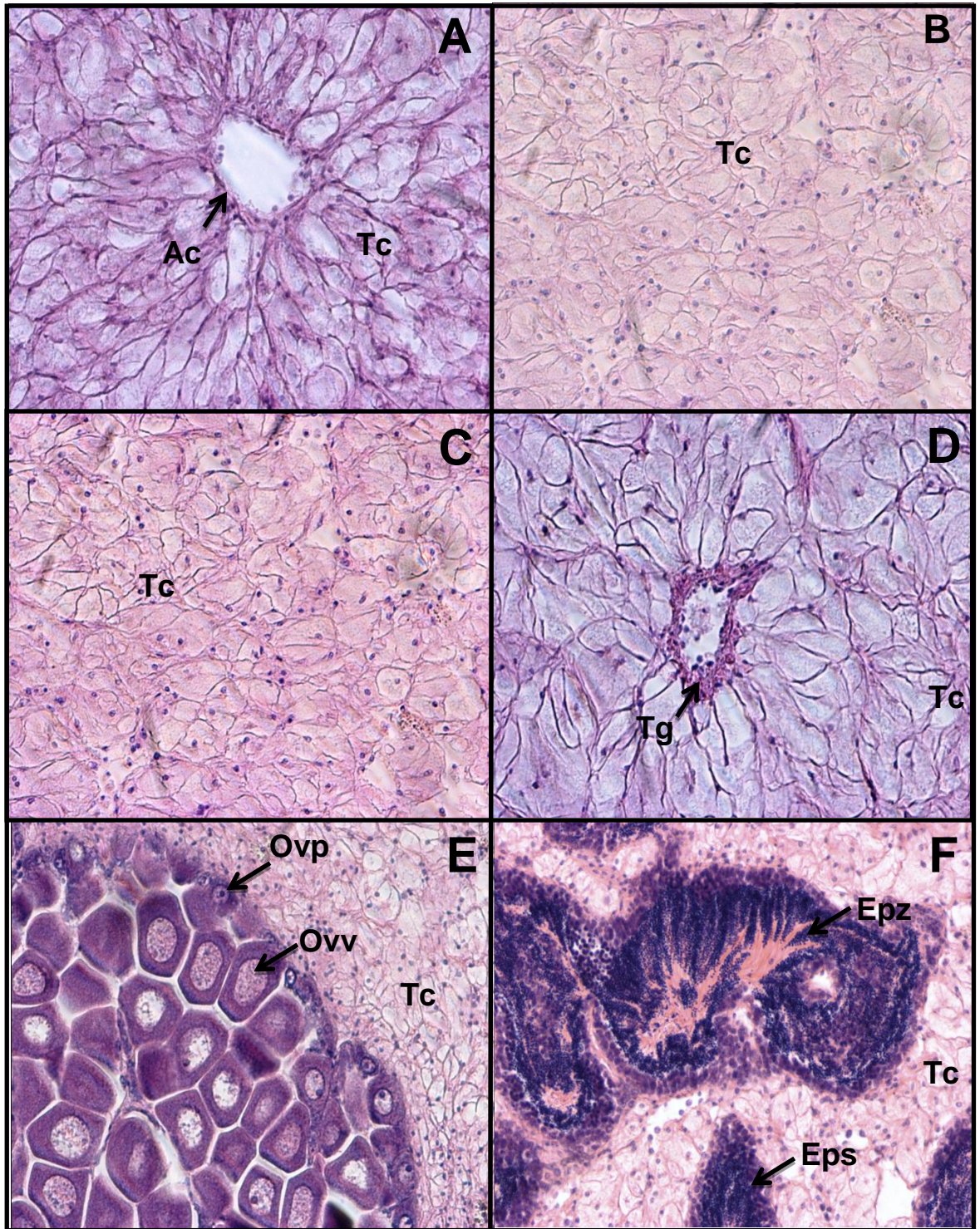
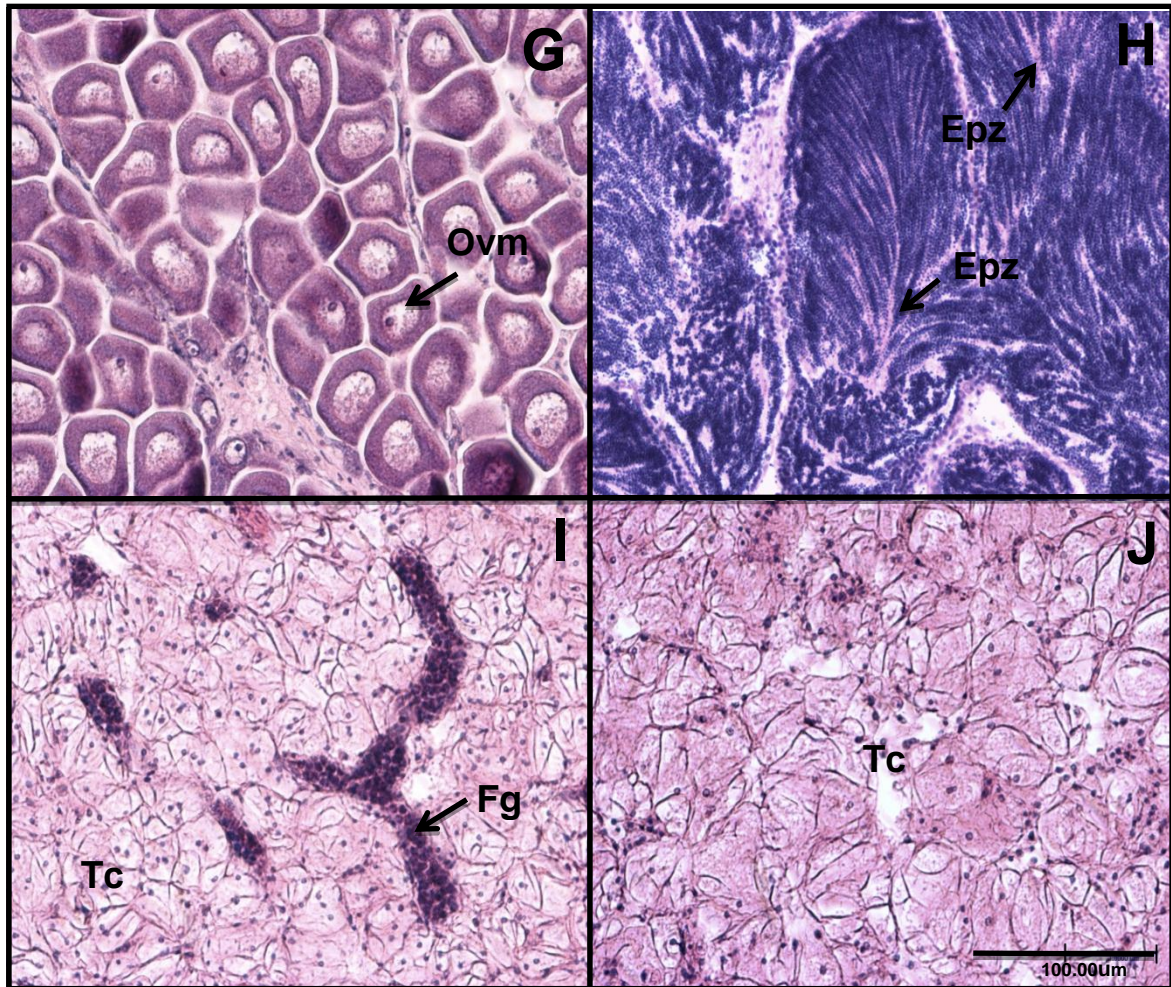


Figura 19.



(Continuación Figura 19). Descripción histológica de la gónada del ostión *Crassostrea sikamea* durante la maduración en sistemas de recirculación acuícola por 10 semanas. Fotografía: semana 0 a 18°C (A-B indiferenciado), semana 3 a 18°C (C-D indiferenciado), semana 6 a 22°C (E-F desarrollo), semana 10 a 24°C (G-H maduro), sin manipulación de la temperatura (I-J testigo). Tc: tejido conectivo, Ac: ácido, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatocitos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Fg: fagocitos. Fotografía 200X.

3.2 Experimento 3

3.21 Calidad del agua

Se encontraron diferencias significativas en la calidad de agua a lo largo del experimento. En la temperatura del agua se encontraron diferencias altamente significativas ($P = 0.0001$) con aumentos graduales durante las 10 semanas de experimento (Tabla 13). Se encontraron diferencias altamente significativas en el oxígeno disuelto ($P = 0.0001$). La mayor concentración de oxígeno disuelto (5.80 mg/l) se reportó a los 18°C mientras que la menor concentración (5.28 mg/l) se reportó a 24°C (Tabla13). Se encontraron diferencias altamente significativas en el pH ($P = 0.001$). El valor más alto de pH (8.75) se reportó cuando la temperatura del agua alcanzó los 20°C, el menor valor (8.40) se reportó a los 22°C. El pH no se reportó cuando la temperatura del agua alcanzo los 24°C. Se encontraron diferencias altamente significativas ($P = 0.001$) en la salinidad. La mayor concentración (35.22 g/kg) fue reportada a 24°C la menor concentración (34.4 g/Kg) se registró en las primeras semanas a 18 ° (Tabla 13).

Tabla 13. Temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad (media \pm desviación estándar) medida en los sistemas de recirculación acuícola durante las 10 semanas del experimento 1. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas.

Temperatura planteada (°C)	Temperatura registrada °C	O2 (mg/l)	pH	Salinidad (mg/l)
18	15.7 \pm 0.12 ^d	5.80 \pm 0.58 ^a	8.50 \pm 0.09 ^b	34.40 \pm 1.17 ^c
20	19.80 \pm 1.04 ^c	5.29 \pm 0.41 ^b	8.75 \pm 0.05 ^a	34.86 \pm 0.67 ^b
22	21.7 \pm 0.89 ^b	5.35 \pm 0.30 ^b	8.40 \pm 0.26 ^c	35.08 \pm 0.62 ^a
24	23.90 \pm 0.75 ^a	5.28 \pm 0.40 ^b	-	35.22 \pm 0.65 ^a

Nota: pH no fue reportado a 24°C

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.6870$) en la concentración de NAT durante las 10 semanas en los SRA (Tabla 14). En los NO_2 no se encontraron diferencias significativas ($P = 0.7347$) durante el periodo de maduración (Tabla 14). Los NO_3 no se reportaron durante el experimento 3.

La alcalinidad presentó un rango de 100 - 120 mg/l de CaCO_3 durante las 10 semanas de experimento (Tabla 14).

Tabla 14. Nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos (NO_2) y alcalinidad (CaCO_3), (media \pm desviación estándar), registrados durante el experimento 2. Letras diferentes a>b>c>d representan diferencias significativas.

Temperatura planteada (°C)	NAT (mg/l)	NO_2 (mg/l)	Alcalinidad CaCO_3 mg/l
18	0.27 ± 0.15^a	0.36 ± 0.25^a	100 - 120
20	0.46 ± 0.21^a	0.29 ± 0.18^a	100 - 120
22	0.28 ± 0.17^a	0.41 ± 0.23^a	100 - 120
24	0.25 ± 0.14^a	0.27 ± 0.16^a	100 - 120

3.22 Índice de condición

Se encontraron diferencias altamente significativas ($P = 0.0001$) en el índice de condición (IC) durante las 10 semanas del periodo de maduración. Las primeras 6 semanas cuando la temperatura del agua osciló de 18°C a 20°C el IC se mantuvo con valores mayores a 60. De la semana 7 a la 10 se presentó un decremento significativo en el IC (42.1) reportando el menor valor a 24 °C.

Los organismos utilizados como control presentaron un decremento significativo en el índice de condición final (43.9) con respecto al índice de condición inicial (69.5), (Figura 20).

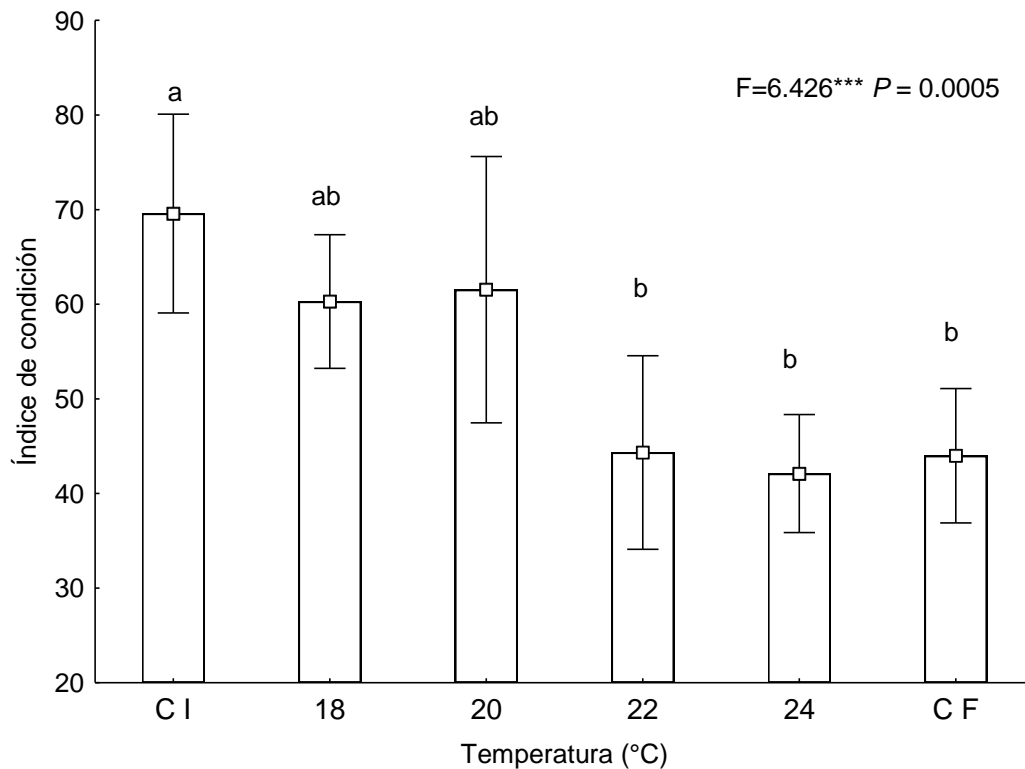


Figura 20. Índice de condición (media \pm desviación estándar) del ostión *Crassostrea sikamea* durante la maduración en sistemas de recirculación acuícola a diferentes temperaturas. CI, índice de condición de los organismos utilizados como control al inicio del experimento, CF es el índice de condición de los organismos utilizados como control al final del experimento. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas.

3.23 Maduración de ostiones por medio de la temperatura acumulada efectiva

La temperatura acumulada efectiva durante el periodo de maduración fue de 571.50 grados centígrados. El menor valor de TAE fue reportado en la primera semana (9.80°C) cuando la temperatura del agua fue de 13.4°C. El mayor TAE (83.30) se presentó en la semana 10 cuando la temperatura del agua en los SRA fue de 23.90°C (Tabla 15).

Tabla 15. Temperatura acumulada efectiva durante las 10 semanas de maduración del ostión *Crassostrea sikamea* en sistemas de recirculación acuícola. Se presenta la temperatura (media \pm desviación estándar) durante cada semana de maduración. C 1 - 10 = temperatura acumulada en los organismos control durante las 10 semanas.

Semana	Temperatura (°C)	TAE	Σ TAE
1	13.4 \pm 0.74	9.80	9.80
2	15.5 \pm 1.15	24.50	34.50
3	18.13 \pm 0.93	42.91	77.40
4	19.61 \pm 1.01	53.27	130.67
5	20.18 \pm 0.62	57.26	187.93
6	20.08 \pm 0.45	56.56	244.49
7	21.60 \pm 0.64	67.20	311.69
8	21.80 \pm 0.58	68.60	380.29
9	21.79 \pm 1.15	68.53	488.82
10	23.90 \pm 0.75	83.30	571.50
C 1 -10	15.66 \pm 1.20	259.00	259.00

NOTA: Σ TAE es la sumatoria de los grados acumulados de la semana 1 a la 10 en los SRA y en los organismos control.

3.24 Análisis histológico del desarrollo gonádico del ostión Kumamoto durante la maduración en SRA por medio de la temperatura acumulativa efectiva

Las muestras histológicas analizadas de los reproductores de ostión en las semanas 0, 3, 6, 9 así como los organismos testigo presentaron un estado gonadal indiferenciado. Las muestras en la semana 10 presentaron un estadio en desarrollo (Tabla 16). La descripción y presentación de las muestras analizadas se presenta en la Figura 21.

Tabla 16. Maduración del ostión *Crassostrea sikamea* en sistemas de recirculación acuícola por medio de la temperatura acumulada efectiva. Se presenta la letra que indica la fotografía histológica, la semana y temperatura en los sistemas de recirculación acuícola, la temperatura acumulada efectiva reportada en cada semana, el estadio gonádico y porcentaje de ostiones que lo presentó.

Fotografía	Semana	Temperatura °C en SRA	TAE	Estadio gonádico	% de ostiones
A –B	0	13.5	0	Indiferenciado	100
C- D	3	18	77.4	Indiferenciado	100
E – F	6	20	244.49	Indiferenciado	100
G –H	9	22	488.82	Indiferenciado	100
I – J	10	24	571.5	Desarrollo	80
K - L (control)	1 - 10	15.7	259	Indiferenciado	100

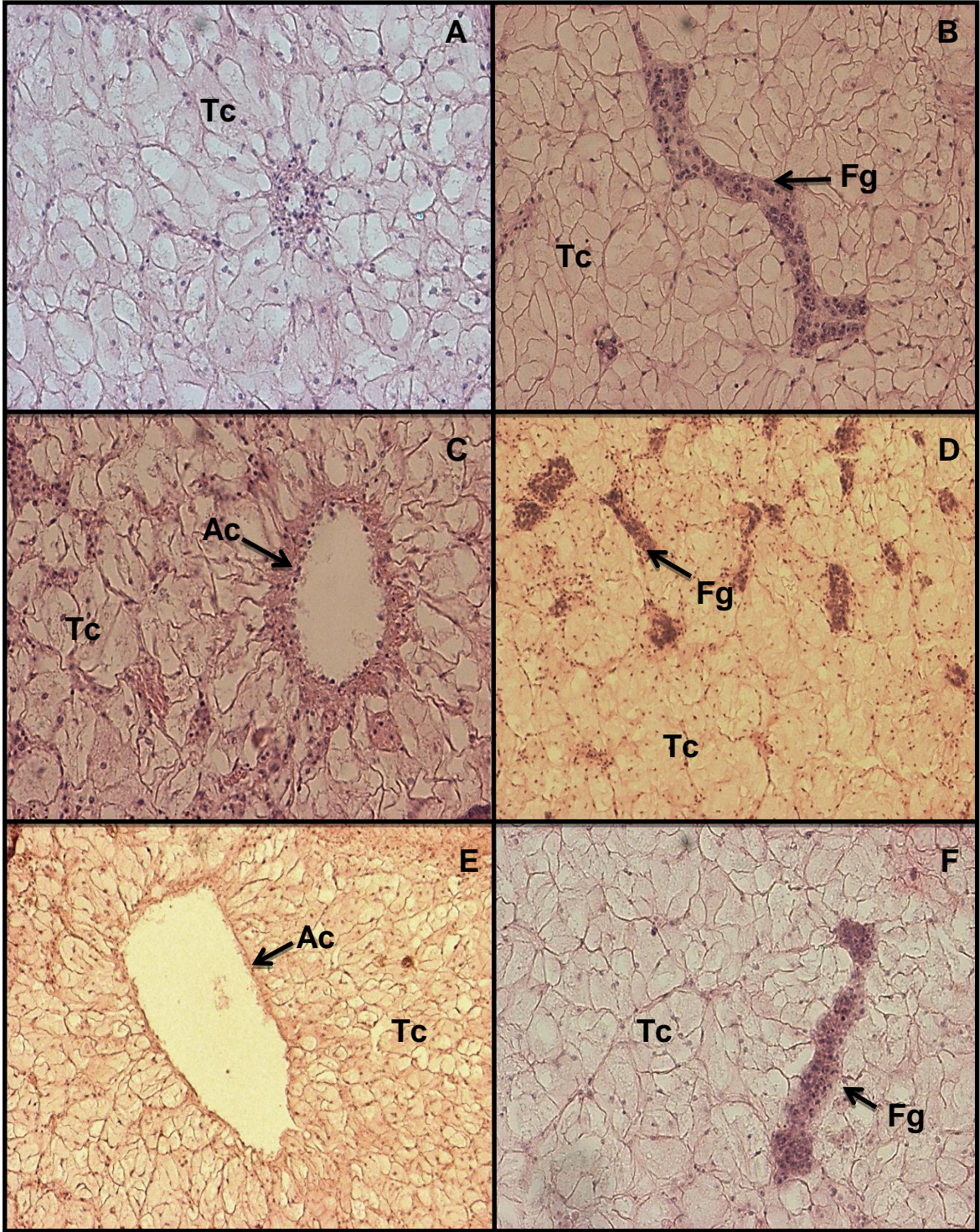
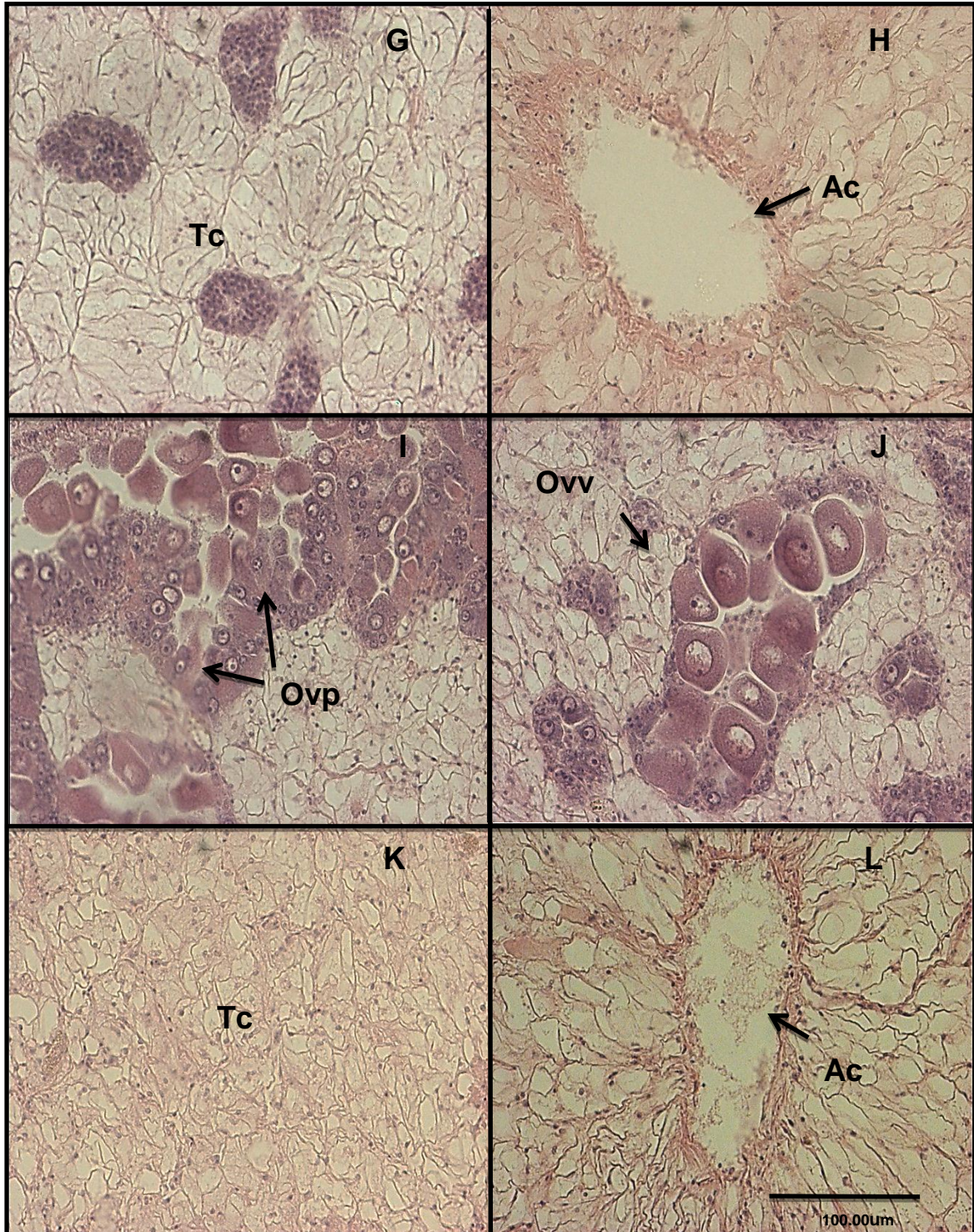


Figura 21.



(Continuación Figura 21). Descripción histológica de la gónada del ostión *Crassostrea sikamea* durante la maduración en sistemas de recirculación acuícola por medio de la temperatura acumulada efectiva. Tc: tejido conectivo, Ac: ácino, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Fg: fagocitos. Fotografía 200X.

4. Discusión

4.01 Evaluación del perfil de temperatura en los sistemas de maduración y la calidad del agua

Los SRA tienen la ventaja de poder manipular las variables físico-químicas del agua y así poder reproducir condiciones específicas para el cultivo de cada especie y estadio de organismo acuático (Masser *et al.*, 1998; Timmons y Ebeling, 2010). Sin embargo, el criterio del diseño de un SRA depende fuertemente de los objetivos del mismo (Timmons y Ebeling, 2010).

En este trabajo se utilizó un prototipo de SRA diseñado especialmente para el acondicionamiento de moluscos bivalvos. Al ser un sistema prototipo, el paso previo fue conocer el adecuado funcionamiento del mismo en términos de tasas de flujo, tiempos de retención hidráulica y eficiencias de nitrificación y remoción de sólidos. En el acondicionamiento de bivalvos, el control de la temperatura es uno de los factores exógenos más importantes para el éxito del proceso de maduración (Saucedo *et al.*, 2004; Helm *et al.*, 2006). En el experimento 1 se evaluó la efectividad de los calentadores (250-watts) para manipular el incremento gradual de la temperatura del agua (18°C - 26°C) de los SRA durante las 10 semanas que duró el experimento. Solo durante las primeras 3 semanas del experimento se pudo controlar la temperatura (18°C) del agua. La máxima temperatura reportada fue de 23.16°C (semana 9 y 10), 3°C menor a la temperatura planteada para el experimento 1. Lo cual indica que los calentadores no tuvieron la capacidad de mantener una temperatura constante en los SRA mayor a 23 °C.

Buchanan *et al.* (1998) trabajó con el acondicionamiento de reproductores de *C. virginica* en SRA en el cual elevaron la temperatura de 14°C a 25°C utilizando un calentador de 760 watts, reportando un control de la temperatura de $\pm 1^\circ\text{C}$. En el acondicionamiento del ostión *C. gigas* en SRA Frías y Segovia (2010) realizaron

estudios de diferentes perfiles de temperatura y dietas para estimular el desarrollo gonádico, utilizando calentadores de titanio de 250-watts. Frías y Segovia (2010) utilizaron perfiles de temperatura de 20°C y 24°C sin realizar incrementos graduales y presentaron variaciones de temperatura mayores a $\pm 1^\circ\text{C}$. Una vez finalizado el experimento, todos los SRA se recubrieron con material aislante para poder mantener la temperatura del agua constante a lo largo del periodo de acondicionamiento y maduración. Los calentadores de 250 watts se cambiaron a calentadores de 500 watts para el control de temperatura. Estos cambios en los SRA fueron aplicados en los experimentos posteriores.

En el experimento 2 y 3 se tuvo un completo control de la temperatura en los SRA a lo largo de las 10 semanas que duro cada experimento, aumentando gradualmente la temperatura de 18°C a 24 °C con una variación menor de $\pm 0.5^\circ\text{C}$. Al no haber variaciones constantes en la temperatura se tuvo un mejor control sobre el proceso de maduración de los ostiones (Robinson, 1992a; Utting y Millican, 1997).

Durante todos los experimentos las variables físico-químicas se mantuvieron en los rangos óptimos establecidos para el acondicionamiento y maduración del ostiones en SRA. El oxígeno disuelto es de todas las variables físico-químicas el parámetro más importante y requiere de un continuo monitoreo constante (Timmons y Ebeling, 2010). En los SRA para que los organismos tengan un adecuado crecimiento y alimentación el oxígeno disuelto tiene que estar en concentraciones $\geq 5\text{mg/l}$ (Huguening y Colt 2002; Timmons y Ebeling, 2010). Bajas concentraciones de oxígeno disuelto por un tiempo prolongando en el agua hacen que los ostiones activan su metabolismo anaeróbico utilizando diferentes rutas metabólicas como la fermentación, lo cual representa un alto gasto energético que puede influir de forma negativa en el proceso de maduración. (Akberali y Trueman, 1985; Larade y Storey 2009). Durante esta investigación, el oxígeno disuelto nunca presentó una concentración menor de 5mg/l. La temperatura del agua así como la salinidad tienen una relación directa con la concentración a saturación del oxígeno disuelto en el agua (Timmons y Ebeling,

2010). En los 3 experimentos realizados la mayor concentración de oxígeno (> 5.5 mg/l) se presentó a 18°C y la menor a 24°C. En este experimento el agua se movió por bombeo con aire. Este tipo de bombeo tiene dos ventajas ya que el agua se oxigena y al mismo tiempo se desgasifica de manera continua (Wurts *et al.*, 1994; Timmons y Ebeling, 2010). Otra de las ventajas de utilizar bombeo de agua por aire en los SRA ayuda a reducir costos de operación ya que se elimina la necesidad de utilizar bombas eléctricas para mover el agua en los sistemas (Wurts *et al.*, 1994; Lekang, 2007; Timmons y Ebeling, 2010).

En los SRA, el pH es una variable físico-química importante ya que es uno de los factores que influencia la eficiencia del filtro biológico (Lekang, 2007). Los cambios rápidos de pH (0.5 - 1.0 unidades) disminuyen la eficiencia de nitrificación dentro del filtro biológico (Timmons y Ebeling, 2010). Para el correcto funcionamiento de un sistema de recirculación acuícola marino el pH debe mantenerse entre 7.8 - 8.3 (Lekang, 2007). En *C. virginica* se reportó un mejor desarrollo embrionario y supervivencia de las larvas a un pH de 6.25 a 8.75 en comparación con las larvas expuestas a un pH de 6 (Calabrese y Davis, 1966). En el acondicionamiento del ostión del Pacífico en SRA, se reportó un pH de 7.8 (Frías y Segovia, 2010). Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con los reportados por Buchanan *et al.* (1998) durante el acondicionamiento del ostión *C. virginica* en SRA, donde el pH fluctuó entre 7.8 y 8.5. El pH del agua durante el experimento 1 presentando valores entre 7.93 y 8.15. En el experimento 2 y 3 el pH en los SRA fue > 8 durante todo el proceso de maduración. En el experimento 3, el pH en el rango de los 18°C - 22°C se mantuvo entre 8.40 - 8.75. Sin embargo durante este experimento se presentaron problemas con el equipo de medición desde la semana 5 (20 °C). Lo cual pudo afectar las mediciones ya que el equipo presentó fallas técnicas interrumpiendo las mediciones en la última semana cuando la temperatura del agua alcanzó los 24°C.

La salinidad del agua durante los 3 experimentos siempre fue >30 g/Kg. Durante el acondicionamiento del ostión *C. gigas* en diferentes niveles de salinidad Muranaka y Lanna (1984) reportaron un retraso en el desarrollo gonádico a

salinidades menores a 30 g/Kg. En la maduración gonádica de moluscos bivalvos marinos, la salinidad del agua en los sistemas de acondicionamiento se trata de mantener en un rango de 34 a 36 g/kg para evitar factores de estrés que alteren la actividad metabólica provocando así mayor gasto energético durante el periodo de acondicionamiento (Schleiper y Kowalsky, 1957; Utting, 1997; Helm *et al.*, 2006). La mayor salinidad reportada en los tres experimentos se presentó cuando la temperatura del agua alcanzó los 24°C. El incremento en la salinidad está directamente relacionado con la temperatura: al aumentar la temperatura aumentó la evaporación del agua. Para que no se presentara un cambio considerable en la salinidad, durante los retrolavados de los SRA también se adicionó agua dulce para compensar la pérdida por evaporación.

La alcalinidad se puede definir como la capacidad que tiene el agua para neutralizar ácidos (Huguening y Colt, 2002; Timmons y Ebeling, 2010). En los SRA, el pH y la alcalinidad influyen de manera directa en la eficacia de nitrificación. En el filtro biológico, por cada gramo de NH_3 que se nitrifica, se consumen 4.18g de alcalinidad por las bacterias nitrificantes como sustrato de carbono inorgánico. Si no se controla la alcalinidad el pH disminuirá constantemente hasta el fallo del filtro biológico (Timmons *et al.*, 2002; Lekang, 2007). En SRA se recomienda que la alcalinidad sea mayor de 80mg/l de CaCO_3 , mientras que la alcalinidad optima para un SRA es entre 100 – 200 mg/l CaCO_3 ya que aumenta la capacidad buffer para evadir fluctuaciones en pH y sirve como un constante recurso para el funcionamiento del filtro biológico (Losordo *et al.*, 1992; Lekang, 2007; Timmons y Ebeling, 2010). En el experimento 1 la alcalinidad no fue monitoreada. En el experimento 2 la alcalinidad se mantuvo entre 75 – 110 mg/l CaCO_3 , el cual se encontró en los rangos adecuados para un SRA. Durante el experimento 3 la alcalinidad en los SRA también se mantuvo entre los rangos óptimos (100 -120 mg/l CaCO_3).

El manejo correcto de los compuestos nitrogenados es un aspecto importante para acondicionar y madurar a los ostiones en SRA. Los moluscos bivalvos expuestos a altas concentraciones de NH_4 por periodos prolongados presentó

efectos negativos tales como cambios en la estructura de tejido blando, disminución de la tasa de crecimiento, menor resistencia a enfermedades y capacidad de reproducción (Colt y Armstrong, 1981). A lo largo del periodo de maduración de los ostiones, la concentración de nitrógeno amoniacal total (NAT) así como los nitritos (NO_2) fue $< 1\text{mg/l}$. En los SRA se recomiendan concentración $< 1\text{mg/l}$ de estos compuestos nitrogenados para el óptimo desempeño de los organismos (Timmons y Ebeling, 2010). Buchanan *et al.* (1998) reportaron valores de NAT de 4.2 mg/l en los SRA durante el acondicionamiento de *C. virginica* en SRA. La alta concentración de NAT se atribuyó a la falta de capacidad de las bacterias nitrificantes en el filtro biológico para copar con el aumento de la cantidad de productos metabólicos producidos por los ostiones, lo cual se reflejó en una pérdida de condición y alta mortalidad. Durante nuestra investigación, la baja concentración de compuestos nitrogenados se puede atribuir al adecuado periodo de maduración del filtro biológico y al manejo de los sólidos y la calidad del agua. Los recambios de agua en los SRA ayudan a remover sólidos provenientes del alimento no digerido, heces y organismos muertos los cuales impactan de manera negativa el funcionamiento de los SRA influenciando en la calidad del agua (Timmons y Ebeling, 2010). Resultados similares fueron reportados por Frías y Segovia (2010) con concentraciones $< 1\text{mg/l}$ de NAT y NO_2 en la maduración de *C. gigas* en SRA atribuyendo estos resultados al previo acondicionamiento del filtro biológico.

4.02 Conteo de microalgas en los sistemas de maduración

La alimentación es uno de los principales factores a considerar en el éxito en la maduración de los moluscos bivalvos (Utting y Millican, 1997; Helm *et al.*, 2006). La composición de las dietas para reproductores así como la cantidad de alimento por organismo ó ración de alimento al día durante el periodo de acondicionamiento tiene un importante efecto en la reproducción y calidad de gametos (Robison, 1992a; Samain *et al.*, 1992). Se han realizado diversos estudios para estimar la

ración óptima de alimento para reproductores de moluscos, la cual se determina por medio de la relación entre el peso seco corporal del organismo y el peso de la microalgas utilizadas en la dieta. Gabbott y Walker (1971) utilizaron una ración del 0.2% y 1%, Helm *et al.* (1973) usaron 3% y 9%. Utting (1993) utilizó una ración de 3% y 7% del peso corporal. Los mejores resultados obtenidos en estos estudios fueron con una ración entre el 3% y 6% del peso corporal (Utting, 1993). Las raciones al 9% del peso corporal demostraron un excesivo crecimiento de la concha acompañado de un retraso en el desarrollo gonádico y baja viabilidad de las larvas (Utting y Millican, 1997). Es importante señalar que los resultados descritos anteriormente han sido para sistemas de acondicionamiento y maduración en flujo continuo, los cuales son completamente diferentes al usado en este experimento.

En este experimento se trabajó con la tasa de alimentación durante el periodo de maduración en los SRA. Al inicio del experimento se probaron raciones del 6% del peso seco corporal, sin embargo las microalgas permanecían en los SRA por periodos largos de tiempo ya que los organismos no eran capaces de asimilar esta cantidad de alimento. A fin de determinar en forma más precisa el consumo de la ración, se realizó una curva de calibración para determinar la tasa de consumo de los ostiones. Para aumentar la eficiencia de asimilación la ración diaria de microalgas se dividió en dos porciones (9:00 y 14:00). En los SRA, la dinámica de la calidad del agua y las estrategias de manejo del sistema son considerablemente diferentes a los presentados en los sistemas de flujo continuo. Frías y Segovia (2010) presentaron resultados similares en la tasa de alimentación para el acondicionamiento en SRA del ostión japonés donde usaron el 2% de peso seco corporal debido a que los ostiones no tenían la capacidad de asimilar mayores concentraciones de alimento.

En este experimento debido a la baja tasa de asimilación del alimento se decidió utilizar una ración de 4×10^8 células de microalgas por ostión por día. Esta ración de alimento fue similar a la utilizada por Muranaka y Lanna (1983) durante el acondicionamiento del ostión *C. gigas*. Muranaka y Lanna (1983) reportaron que

la concentración máxima células de microalgas en los sistemas de acondicionamiento no debe sobrepasar las 100 000 cel/ml para minimizar la producción de pseudoheces. Esta estrategia fue utilizada durante la alimentación de los organismos durante el periodo experimental con el objetivo de evitar una alta concentración de sólidos en los SRA. Debido a que el alimento utilizado fue una pasta comercial con una combinación de cuatro diferentes especies de microalgas el conteo de células con hematocitómetro era un proceso largo y poco eficiente en cuestión de manejo. Al utilizar la curva estándar se llevo a cabo en forma indirecta un conteo rápido de células.

4.03 *Biometría de organismos y mortalidad*

La biometría que se realizó durante la maduración del ostión Kumamoto durante las 10 semanas del experimento 2 no presento diferencias. En moluscos bivalvos, el uso del peso húmedo total para determinar el crecimiento de los organismos no es el más adecuado debido a la variación en la cantidad de agua presente dentro de cada ostión (Akberali y Trueman, 1985; Crosby y Laurenced, 1990). En este experimento se utilizó el índice de condición en peso seco para poder determinar el estado nutricional de los ostiones durante el periodo de maduración en los SRA. Las biometrías sirvieron para monitorear a los organismos a lo largo del periodo de maduración y para conocer el peso y la longitud media de la población antes de iniciar el experimento.

En el experimento 2 se presentó una supervivencia >90% durante el periodo de maduración. Al inicio de la semana 5 cuando la temperatura del agua se elevó en los SRA a 20°C se presentó la mayor tasa de mortalidad (5%). Este evento de mortalidad se atribuyó a un incremento en la concentración de NAT durante esta semana. Al disminuir las altas concentraciones de NAT, la mortalidad se redujo de manera significativa. Durante el acondicionamiento del ostión japonés *C. gigas* Frías-Díaz (2009) reportó una mortalidad del 15% al 28% en los diferentes tratamientos. Se atribuyó esta mortalidad al estrés ocasionado por la manipulación

diaria de los ostiones. En nuestro experimento la manipulación de los ostiones no se llevo a cabo en forma diaria para evitar un constante estrés en la población experimental.

4.04 Índice de condición

El índice de condición (IC) en bivalvos ha sido utilizado para conocer el estado fisiológico y nutricional en el que se encuentran los organismos (Byane, 1973; Crosby y Laurence, 1990). El IC es utilizado para medir cambios estacionales en las reservas de nutrientes y es un indicador del rendimiento en peso entre diferentes poblaciones (Crosby and Laurence, 1990). En los moluscos bivalvos el IC estático que más se recomienda es la razón entre el peso seco de la carne y el peso seco de la concha (Crosby and Laurence, 1990). Este índice elimina las variaciones producidas por el contenido de agua en los tejidos, lo cual ocurre al utilizar los índices con pesos húmedos (Lucas y Beninger, 1985; Del Río-Portilla, 1991). Durante el experimento 2 y 3, se utilizó este IC estático para evaluar el estado fisiológico y nutricional de los ostiones y determinar el efecto de la temperatura en el proceso de maduración en reproductores del ostión Kumamoto.

Durante el análisis del crecimiento de un cultivo de *C. gigas* durante un ciclo en la laguna costera La Cruz en el Estado de Sinaloa, Chávez-Villalba *et al.* (2010) reportaron IC menores de 65 con un decremento significativos en los meses de invierno. Los organismos utilizados en el experimento 2 y 3 procedentes del sitio de cultivo, al ingresarlos en los SRA presentaron un IC > 65. Se han reportado en diversas investigaciones el uso de índices volumétricos o gravimétricos o modificaciones de los mismos, los cuales son índices relativos. Estos IC no pueden compararse con el utilizado en este trabajo ya que este es un índice absoluto. Este IC compara el metabolismo que se dirige directamente hacia procesos de calcificación, las reservas de glicógeno la síntesis de proteínas y la vitelogénesis. En contraste los IC relativos comparan la capacidad interna de la concha que puede ser utilizada por el tejido corporal de los bivalvos (Crosby and Laurence, 1990).

El IC de los ostiones en los dos experimentos no disminuyó durante las primeras cuatro semanas cuando la temperatura del agua osciló en los 18°C y 20°C. Después de este periodo, el IC presentó una relación inversa con la temperatura. Conforme aumentó la temperatura el IC fue disminuyendo de manera significativa. El IC bajó más de 25 unidades de la semana 0 hasta la semana 10 en ambos experimentos. En los organismos que se utilizaron como testigo también se observó un decremento significativo en el IC con una temperatura promedio de 18°C a lo largo de los experimentos. Los organismos control perdieron 19 unidades de IC del inicio hasta el final del experimento, este decremento fue menor que el que se presentó en los organismos que estuvieron sometidos a cambios graduales de temperatura. Buchanan *et al.* (1998) acondicionaron durante 8 semanas a reproductores de *C. virginica* en SRA, presentando resultados similares debido a que el IC de los organismos disminuyó significativamente durante el periodo de acondicionamiento desde la primera semana. Estudios del crecimiento de *Pteria sterna* llevados a cabo en diferentes condiciones de temperatura y alimento demostraron que el IC está fuertemente influenciado por el alimento y que a bajas concentraciones de alimento y altas temperaturas el IC disminuye (Del Río-Portilla, 1991).

En los organismos que se usaron como control la concentración de alimento fue el principal factor que disminuyó el IC debido a que la temperatura no fluctuó de manera significativa. Durante el acondicionamiento de *C. virginica* en SRA Buchanan *et al.* (1998) mantuvieron a los organismos control en un cuerpo de agua natural, estos organismos presentaron un IC significativamente mayor al de los organismos en los SRA atribuyendo este incremento a que los organismos control se alimentaron en aguas naturales obteniendo un mayor aporte nutricional. En nuestra investigación los organismos control se alimentaron con la misma pasta comercial y concentración de alimento (4×10^8 cel/org/día) que los organismos que se expusieron a cambio de temperatura. Esta ración representó < 2% del peso seco corporal de los organismos.

La baja tasa de alimentación y el aumento gradual de la temperatura influenciaron el decremento en el IC de los organismos durante las 10 semanas del periodo de maduración. Sin embargo, en el experimento 1 de esta investigación se demostró que los ostiones alimentados con una ración entre 6% y 3% no fueron capaces de asimilar la dieta, por lo cual es de gran importancia trabajar en la tasa y estrategias de alimentación para ostiones en la maduración en SRA.

4.05 Determinación de la tasa metabólica por el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada a diferentes temperaturas

Este es el primer experimento en el cual se reporta el consumo de oxígeno y la excreción amoniacal en *C. sikamea* durante el proceso de maduración en SRA. La temperatura es uno de los factores más importantes que controlan la actividad y el metabolismo en los bivalvos incrementando directamente la tasa metabólica con respecto a la temperatura hasta un límite máximo (Bayne y Newell 1983; Muranaka y Lannan 1984). En este experimento durante las primeras 7 semanas en los SRA y entre un intervalo de temperatura de 5°C (18°C - 22°C), el consumo de oxígeno de los organismos se mantuvo constante. Al aumentar la temperatura a 24°C, se presentó un incremento del 50% en el consumo de oxígeno en los ostiones. Los resultados de esta investigación siguen el mismo patrón que los encontrados en *Pinctada mazatlanica*, donde el consumo de oxígeno de los organismos aumentó significativamente conforme se incrementó la temperatura (Saucedo *et al.*, 2004).

Estudios llevados a cabo con el mejillón *Mytilus edulis* durante un ciclo anual en el medio natural demostraron que la mayor demanda de oxígeno se presentó en los meses con mayor temperatura en el agua (Bayne y Thompson, 1970). En los organismos acuáticos hay un intervalo de temperatura en el cual el metabolismo de rutina trabaja a su nivel óptimo (Saucedo *et al.*, 2004), sin embargo cuando este intervalo es rebasado o hay una desviación del régimen de temperatura

natural se presenta un incremento en el nivel de estrés el cual se verá reflejado en un incremento en el metabolismo y pérdida de condición (Bayne y Thompson, 1970). Con los resultados obtenidos en nuestro estudio se pueden sugerir que a un intervalo de 18°C a 22°C, los organismos se encontraban en un rango térmico adecuado para el desarrollo del metabolismo de rutina. A 24°C se presentó un estrés crónico debido a que los organismos se mantuvieron durante 3 semanas en esta temperatura reflejándose en un mayor consumo de oxígeno y una pérdida significativa del IC.

La excreción amoniacal de los ostiones siguió el mismo patrón que el consumo de oxígeno, a 24°C los valores de excreción fueron 40% más elevados en comparación con las otras temperaturas. Estudios llevados a cabo con *C. gigas* durante las diferentes estaciones del año indican que los menores valores de excreción amoniacal se presentaron en invierno, mientras que los valores más altos fueron reportados en verano (Mao *et al.*, 2006). El incremento en la excreción amoniacal de los ostiones se debe a que durante este periodo hubo un exceso en la utilización de proteínas (Mao *et al.*, 2006). Los organismos que producen concentraciones elevadas de amoniaco durante periodos prolongados son sujetos a condiciones de estrés en que no pueden ser compensadas por mecanismos fisiológicos (Saucedo *et al.*, 2004).

El comportamiento metabólico de los organismos durante la maduración en los SRA puede explicarse por medio de la relación atómica O:N. La relación atómica O:N es un indicador del sustrato metabólico que fue oxidado por los organismos (Corner y Cowey, 1968). Durante las primeras 7 semanas (18°C a 22°C), los ostiones utilizaron como fuente de energía una mezcla de carbohidratos y lípidos. Los lípidos son de suma importancia en la dieta de los reproductores de bivalvos ya que tienen un efecto directo en la calidad de los gametos (Robinson 1992b). En *C. gigas* se investigó durante un ciclo anual el sustrato metabólico utilizado por los organismos el cual varió de 9.2 a 59.7, sin embargo este análisis se llevó a cabo en un cuerpo de agua natural atribuyendo estos altos cambios en la relación O:N a la sucesión de las diferentes especies de microalgas a lo largo del ciclo

(Mao *et al.*, 2006). Bayne y Thompson (1970) encontraron que los carbohidratos eran el sustrato metabólico que el mejillón *Mytilus edulis* utilizaba en condiciones normales para la obtención de energía. Nuestros resultados siguen el mismo patrón ya que en el rango de temperatura de 18°C a 22 °C los ostiones en los SRA se encontraban en condiciones adecuadas, reflejándose en los bajos valores de consumo de oxígeno y excreción amoniacal así como el uso de carbohidratos y lípidos como fuente de energía. Al aumentar la temperatura a 24°C en los SRA, las proteínas comenzaron a usarse como sustrato metabólico. El aumento de temperatura en conjunto con otros factores (la alimentación, la salinidad y el fotoperiodo) son necesarios durante el acondicionamiento de ostiones ya que estimula el desarrollo gonádico (Muranaka y Lannan, 1984). Sin embargo este aumento de temperatura por periodos prolongados implica un estrés en los organismos (Bayne y Thompson, 1970). Las 3 semanas donde la temperatura del agua se mantuvo a 24°C, causaron una mayor demanda fisiológica en los ostiones, aumentando el consumo de oxígeno y la excreción amoniacal.

Bayne y Thompson (1970) reportaron que después de 40 días (5.7 semanas) de acondicionamiento del mejillón *M. edulis* y en respuesta al incremento temperatura del agua, los organismos hicieron uso de proteínas como sustrato metabólico. Esta respuesta implica que las reservas de carbohidratos fueron totalmente utilizadas debido al estrés ocasionado por las condiciones de alimentación y de temperatura reflejándose en un decremento de la relación O:N. En nuestra investigación la principal fuente de energía para los organismos por un largo periodo de tiempo fueron lípidos y carbohidratos. Cuando se presentó un aumento de la temperatura las reservas de carbohidratos fueron utilizadas totalmente y como respuesta al estrés los ostiones catabolizaron lípidos y proteínas en cantidades iguales para obtener energía. Sin embargo los organismos mantuvieron sus reservas de lípidos aun en condiciones de estrés y nunca catabolizaron proteínas puras para la obtención de energía. Esto indica que el alimento utilizado para la alimentación de los ostiones tuvo la calidad adecuada en términos nutricionales ya que las proteínas fueron canalizadas para el

anabolismo de los organismos durante el proceso de maduración (Díaz-Iglesias et al 2010).

4.06 Análisis histológico del desarrollo gonádico del ostión Kumamoto durante la maduración en SRA

El éxito en el acondicionamiento tradicional de los reproductores de ostión para su óptima maduración depende del estadio gonádico en que los organismos se encuentran a su llegada al laboratorio (Muranaka y Lannan, 1984). Esto limita que el periodo de acondicionamiento se realice cuando la temporada de maduración en el medio natural este cercana, lo cual ocurre solo una o dos veces al año dependiendo la zona de cultivo (Robinson, 1992b).

En laboratorios de producción de larvas de moluscos bivalvos, la temperatura así como la calidad y cantidad de alimento son los principales factores que se manipulan para el éxito en la maduración de los reproductores de bivalvos (Buchanan *et al.*, 1998; Martínez y Pérez 2003). Los ostiones durante el experimento 2 y 3, antes de iniciar el periodo de acondicionamiento (semana 0) se encontraban en un estadio de desarrollo gonadal indiferenciado. En los moluscos bivalvos del genero *Crassostrea* la gónada es un órgano difuso que consiste de numerosos túbulos invaginados en un tejido conectivo (Franco *et al.*, 2008). Una de las características del estado indiferenciado es la gran cantidad de tejido conectivo el cual es principalmente formado por el almacenamiento de glucógeno (George-Zamora *et al.*, 2003). En el experimento 2 durante las primeras 3 semanas en los SRA, cuando la temperatura del agua se mantuvo a 18°C se presentó un estadio indiferenciado en todos los organismos analizados. En *C. gigas*, la acumulación de reservas para la gametogénesis ocurre en otoño e invierno cuando las temperaturas en el medio ambiente son bajas (Chávez-Villalba et al 2002).

A partir de la semana 6 cuando la temperatura en los SRA se incrementó a 22°C los ostiones presentaron un estadio de desarrollo. La gónada de las hembras tenia presencia de ovogonias, los ovocitos no se presentan libres y se encontró

una gran cantidad de tejido conectivo. Los machos presentaron espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios y en algunos casos un espermatozoides, pero con gran presencia de tejido conectivo. La tasa de desarrollo gonádico está en función de la intensidad de temperatura y tiempo de exposición (Muranaka y Lannana 1984). Los ostiones (machos y hembras) al estar expuesto a una mayor temperatura (22°C) por un periodo de 6 semanas comenzaron a desarrollar gametos sin llegar a presentar una gónada 100% madura. Durante este experimento, la mayor temperatura alcanzada en el agua fue de 24°C la cual se mantuvo las 3 últimas semanas. Este incremento de temperatura fue necesario para que los ostiones llegaran a un estadio de maduración gonadal. En el mejillón *M. edulis* a pesar de que se presentó una disminución en el IC debido a un estrés por modificaciones en los factores exógenos, el desarrollo gonádico de los organismos se llevo a cabo de manera normal (Bayne y Thompson, 1970). En el experimento 3 durante 9 semanas con una temperatura del agua 18°C a 22°C se presentó en todos los organismos analizados un estadio indiferenciado. En la última semana cuando la temperatura del agua alcanzo los 24°C se presentó en un 75% de las muestras analizadas un estadio de desarrollo.

Los organismos control en el experimento 2 y 3, en los cuales la temperatura del agua en los SRA no fue manipulada (18°C -19°C) durante las 10 semanas de duración del experimento no se presentaron estadios de maduración. En el experimento 2 solo una pequeña parte de las muestras analizadas (20%) presentó un estadio de desarrollo. Sin embargo la presencia de espermatogonias fue poca en relación al alto contenido de tejido conectivo en la gónada (>95%). Durante el experimento 3 todos los organismos control presentaron un estadio indiferenciado. La no manipulación de la temperatura en estos organismos no estimuló el desarrollo gonádico por lo cual los organismos nunca tuvieron la capacidad de realizar el proceso de vitelogénesis.

4.07 Maduración de ostiones por medio de la temperatura acumulada efectiva

El uso de la temperatura acumulada efectiva (TAE) ha sido reportado ampliamente para estimular el desarrollo gonadal en moluscos bivalvos (Mann, 1979; Muranaka y Lannan, 1984; Utting y Spencer 1991).

Los bivalvos de aguas templadas de las zonas costeras y estuarios con un buen aporte de alimento necesitan entre 350 a 600 grados acumulados desde el comienzo del acondicionamiento para poder llegar a desovar (Helm *et al.*, 2006). En el acondicionamiento de bivalvos del género *Ostrea* y *Crassostrea*, Utting y Spencer (1991) reportaron que para lograr la maduración de los organismos se necesita entre 300 y 500 grados acumulados. En un estudio de la maduración del ostión *C. gigas* el desarrollo gonadal de los ostiones comenzó después de 700 grados acumulados desde el inicio del acondicionamiento y a 1100 grados acumulados se presentó un completo desarrollo gonádico (Muranaka y Lannan, 1984). Sin embargo, los autores explican que las técnicas para identificar el desarrollo gonádico de los organismos no fueron las adecuadas por lo cual no se precisó el inicio del desarrollo gonádico (Muranaka y Lannan, 1984). En el experimento 3, hubo un total de 571 grados acumulados desde el comienzo del acondicionamiento hasta el término del experimento 10 semanas después en los SRA. Nuestros resultados difieren de los mencionados por Utting y Spencer (1991) y Helm *et al.* (2006) ya que no se presentó estadios en maduración pasando los 500 grados acumulados. El análisis del desarrollo gonádico en esta investigación se realizó por medio de histología. La histología es un método preciso para determinar la maduración de los organismos en contraste con los métodos cualitativos utilizados por Muranaka y Lannan (1984). La TAE por sí solo no es un indicador confiable para determinar el período de acondicionamiento para la maduración de bivalvos ya depende del estadio gonádico en que se encuentra el organismo al inicio del acondicionamiento, la calidad de agua así como calidad, ración de la dieta y estrategias de alimentación (Millican and Helm, 1994). En el experimento 3, la calidad del agua fue controlada durante las 10 semanas y

variables importantes para el acondicionamiento como la temperatura y salinidad se mantuvieron en valores adecuados. Sin embargo la ración de alimento no fue la adecuada reflejándose en pérdida de condición de los organismos por lo cual este puede ser un factor que influyó en el retraso del desarrollo gonádico. El experimento 2 inicio a finales del mes de mayo, el experimento 3 inicio a mediados del mes de diciembre del 2011. Hasta la fecha no hay reporte del desarrollo gonádico del ostión Kumamoto cultivado en las costas de Baja California. La falta de información hace difícil saber el ciclo gonádico exacto en ambiente natural durante el año. Sin embargo podemos compararlo con el ciclo gonádico del ostión *C. gigas* descrito por Cáceres *et al.* (2004) el cual se cultiva en las costas de Baja California, ya que las zonas de cultivo presentan las mismas condiciones ambientales. Cáceres *et al.* (2004) reportaron organismos maduros sexualmente desde el mes de febrero con su máximo pico en mayo y junio. Mientras que en los meses de septiembre a enero se presentaron organismos inmaduros. Esto sugiere que en el acondicionamiento de ostiones en SRA, se deben tener diferentes protocolos para la maduración dependiendo de la época en la cual los organismos son llevados al laboratorio y del periodo en el cual se quiere empezar la maduración, modificando las estrategias de alimentación así como las especies de microalgas y aumentando o disminuyendo la temperatura acumulada dependiendo de la época del año.

5.- Conclusiones

El sistema de recirculación acuícola tiene la capacidad de mantener la temperatura del agua deseada durante el periodo de maduración de manera constante.

El conteo de microalgas con la curva de calibración por medio de espectrofotometría es una manera práctica de cuantificar la cantidad de alimento en los sistemas de recirculación acuícola.

Las variables físico-químicas del agua (O_2 , Salinidad, pH, NH_4 , NO_2 , NO_3) se mantuvieron en los rangos adecuados para la maduración de los ostiones.

La supervivencia de los ostiones durante el periodo de maduración en los sistemas de recirculación acuícola fue mayor al 90%.

El índice de condición disminuyó durante el periodo de maduración.

El consumo de oxígeno y la excreción amoniacal aumentó cuando la temperatura del agua se incrementó a 24°C.

Los reproductores de ostión utilizan diferentes sustratos metabólicos durante el proceso de maduración en sistemas de recirculación acuícola y está directamente relacionado a la temperatura del agua.

El desarrollo gonádico del ostión Kumamoto en sistemas de recirculación fue posible implementando un protocolo de maduración.

La temperatura acumulada efectiva durante la maduración del ostión Kumamoto en SRA tiene que ser mayor a 500°C para estimular el desarrollo gonádico.

5.01 Recomendaciones

Es necesario trabajar en la tasa y estrategias de alimentación adecuadas para la alimentación de reproductores de ostión durante la maduración en sistemas de recirculación acuícola.

Es necesario analizar por medio del índice de condición el estado fisiológico de los reproductores de ostión durante diferentes periodos y tasas de alimentación durante el periodo de maduración en sistemas de recirculación acuícola.

Realizar investigaciones acerca de cuál es el periodo de retención hidráulica óptimo de los sistemas de recirculación acuícola durante el periodo de maduración del ostión Kumamoto.

Es necesario realizar estudios en los prototipos del sistema de recirculación acuícola para maximizar la remoción de sólidos durante el periodo de maduración.

Es necesario establecer diferentes protocolos dependiendo de la época del año en la cual se desea realizar la maduración, modificando tasas de alimentación, calidad de la dieta dependiendo de la temperatura y el periodo de acondicionamiento, perfiles de temperatura y grados días acumulados.

Referencias bibliográficas

- Akberali, H.B., Trueman, E.R. (1985). Effects of environmental stress on marine bivalve mollusks. *Advances in Marine Biology*. 22, 102- 183 p.
- Baghurst, B. C., Mitchell, J. G. (2002). Sex-specific growth and condition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture Research*. 33. 1253-1263 p.
- Baqueiro, C.E. (1984). Status of molluscan aquaculture on the Pacific coast of Mexico. *Aquaculture*. 39, 83-93 p.
- Bayne, B.L. (1973). Physiological changes in *Mytilus edulis* L. induced by temperature and nutritive stress. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*. 53, 39-58 p.
- Bayne, B.L., Thompson, R.J. (1970). Some physiological consequences of keeping *Mytilus edulis* in the laboratory. *Helgoländer wiss Meeresunters*. 20, 526-552 p.
- Bayne, B.L., Newell, R.C. (1983). Physiological energetics of marine mollusks. In: K.M. Wilbur (editor). *The Mollusca*. Vol 4 London, Academic Press.
- Buchanan, J.T., Roppolo, G.S., Supan, J.E. and Tiersch, T.R. (1998). Conditioning of eastern oyster in a closed, recirculating system. *Journal of Shellfish Research*. 17, 1183-1189 p.
- Cáceres Puig, J.I., Abasolo Pacheco, F., Mazón Suastegui, J.M., Maeda Martínez, A.N. and Saucedo, P. (2007). Effect of temperature on growth and survival of *Crassostrea corteziensis* spat during late-nursery culturing at the hatchery. *Aquaculture*. 272, 417-422 p.
- Calabrese. A., Davis, H. C. (1966). The pH tolerance of embryos and larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Biological Bulletin*. 131., 427–436 p.
- Cariño, M., Monteforte, M. (1995). History of pearling in the Bay of La Paz, South Baja California, México (1533-1914). *Gems and Gemology*. 31, 108-126 p.
- Castillo Rodríguez, Z.G., García Cubas, A. (1984). Taxonomía y anatomía comparada de las ostras en las costas de México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. 13(2), 294-314 p.
- Colt, J.E., Armstrong, D.A. (1981). Nitrogen toxicity to crustacean, fish and mollusks. In: L. J Allen and E.C. Kinney (ed.). *Proceedings of the Bio-engineering*

symposium for fish culture. *Fish culture section of the American Fisheries Cooperative Society Publication*. pp. 34 - 47.

CONAPESCA. (2008). Programa Maestro Sistema Producto Ostión, Baja California. *Ostricultores de Baja California, A.C.* Baja California, México. 265 p.

Crosby, M.P., Gale, L.D. (1990). A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *Journal of Shellfish Research*. 9, 233-237 p.

Corner, E. D. S., Cowey, C. B. (1968). Biochemical studies on the production of marine zooplankton. *Biology Reviews*. 4:3, 393-426.

Chávez Villalba, J.J., Barret, C., Mingant, J.C. and Pennec., C.M.L. (2002). Autumn conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: A new approach. *Aquaculture*. 201, 171-186 p.

Chávez Villalba, J.J., Arreola Lizárraga, A., Burrola Sánchez, S. and Hoyos Chairez, F. (2010). Growth, condition, and survival of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultivated within and outside a subtropical lagoon. *Aquaculture*. 300, 128-136 p.

Dall, W., Smith, D.M. (1986). Oxygen consumption and ammonia-N excretion in fed and starved tiger prawns *Penaeus esculentus* Haswell. *Aquaculture*. 55, 23-33 p.

Del Río Portilla, M.A. (1991). Crecimiento de *Pteria sterna* (Gould, 1851) (Mollusca Bivalvia), bajo diferentes condiciones de temperatura y de concentración de alimento, (Tesis de Maestría). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México.

Díaz Iglesias, E., Galicia, G.F., Bückle Ramírez, L.F., Báez Hidalgo, M. and Perera Bravet, E. (2010). Respiración, excreción y relación oxígeno:nitrógeno de filosomas de la langosta roja *Panulirus interruptus*. *Hidrobiológica*. 20(2), 135-146 p.

Díaz Iglesias, E., Díaz Herrera, F., Re Araujo, A.D., Báez Hidalgo, M., López Zenteno, M., Valdés Sánchez, G. and López Murillo, A.K. (2004). Temperatura preferida y consumo de oxígeno circadiano de la langosta roja, *Panulirus interruptus* (Randall, 1842). *Ciencias Marinas*. 30(1B), 169-178 p.

FAO. (2007). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura y la Alimentación*. 12, 377 p.

FAO. (2008). El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA). *FAO Departamento de Pesca y Acuicultura*. 218 p.

FAO. (2010). El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA). *FAO Departamento de Pesca y Acuicultura*. 170 p.

Franco, A., Heude, C.B., Goux, D., Sourdain, P. and M., Mathieu. (2008). Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue and Cell*. 40, 251-260 p.

Frias Díaz, R.J. (2009). Acondicionamiento y maduración de reproductores de *Crassostrea gigas* en sistemas de recirculación. (Tesis de Maestría). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. México.

Frias, R., Segovia, M. (2010). Gonad development of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* in a recirculating system: first step toward the development of conditioning and maturation protocols. *Journal of Shellfish Research*. 29, 1-6 p.

Gabbott, P.A., Walker, A.J.M. (1971). Changes in the condition index and the biochemical content of adult oysters (*Ostrea edulis* L.) maintained under hatchery conditions. *Journal du conseil* 34, 99-106 p.

George Zamora, A., Sevilla Hernández, M. L. y D. Aldana Aranda. (2003). Ciclo gonádico del ostión americano *Crassostrea virginica* (Lamellibranchia: Ostreidae) en Mecocacán, Tabasco, México. *Revista de Biología Tropical*. 51, 109–117 p.

Harris, E. (1959). Oceanography of Long Island Sound. II. The nitrogen cycle in Long Island Sound. *Bulletin Bingham Oceanographic College*. 17, 31-65 p.

Hedgecock, D., Li, G., Banks, M.A. and Kain, Z. (1999). Occurrence of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* in the Ariake Sea, Japan. *Marine Biology*. 133, 65 - 68 p.

Helm, M., Holland, D.L. and Stephenson, R. (1973). The effect of supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of *Ostrea edulis* L. on larval vigour. *J. Marine Biology Association U.K.* 53, 673-684 p.

Helm, M.M., Bourne, N. y Lovatelli, A. (2006). Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. *FAO, Documento Técnico de Pesca*. 471, 184 p.

Huguenin, J. E., Colt, J. (2002). Design and Operating Guide for Aquaculture Seawater Systems, 2nd ed. Larade, K., Storey, K.B. (2009). Living without oxygen:

Anoxia-responsive gene expression and regulation. *Current Genomics*. 10(2), 76-85 p.

Lekang, O. I. (2007). *Aquaculture engineering*. Singapore, Hong Kong, Blackwell, 340 pp.

Libey, G.S. (1993). Evaluation of a drum filter for removal of solids. In: Wang (eds.) *Aquaculture systems engineering*. American Society of Agricultural Engineering St, Michigan. 519-532 p.

Losordo, T.M; M. Masser and J. Rakocy. (1992). Recirculating Aquaculture Tank Production Systems: an overview of critical considerations principles of biofiltration. *Report, Southern Regional Aquaculture Center*. 451 p.

Lucas, I., Beninger, P.G. (1985). The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*. 44 (3), 187 - 200 p.

Maeda Martínez, A.N. (2008). Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En: A. Lovatelli, A. Farias e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. *FAO. Actas de Pesca y Acuicultura*. No. 12, pp. 91–100.

Mann, R. (1979). Some biochemical and physiological aspects of the growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *Journal of Marine Biology Association*. U. K. 59: 95-110 p.

Mao, Y., Zhou, Y., Yang, H. and Wang, R. (2006). Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. *Aquaculture*. 253, 322-333 p.

Martínez, G., Pérez, H. (2003). Effect of different temperature regimes on reproductive conditioning in the scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture*. 228, 153-167 p.

Masser, M.P., Rakocy, J. and Losordo, T.M. (1998). Recirculating aquaculture tank production systems. *Southern Regional Aquaculture Center*. 452,11 p.

Mayzaud, P., Conover, R.J. (1988). O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Marine Ecology Program*. 45, 289-302 p.

Millican, P.F., Helm, M.M. 1994. Effects of nutrition on larvae production in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 123, 83-94 p.

Muranaka, M.S., Lannan, J.E. (1984). Broodstock management of *Crassostrea gigas*: environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture*. 39, 217-228 p.

Ortíz Pérez, M.A., De la Lanza-Espino, G. (2006). *Diferenciación del espacio costero de México: un inventario regional*. Geografías para el Siglo XXI. . Instituto de Geografía, UNAM. 3 p.

Perera, E., Díaz Iglesias, E., Fraga, I. and Carrillo, O. (2007). Effect of body weight, temperature and feeding on the metabolic rate in the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804). *Aquaculture*. 265, 261-270 p.

Quarmby, N.K. (1983). The influence of environmental factors on the nitrogenous excretion of the spot prawn *Pandalus platyceros*. (Thesis PhD). *The University of British Columbia*.

Robinson, A. (1992a). Dietary supplements for reproductive conditioning of *Crassostrea gigas* kumamoto (Thunberg). I. Effects on gonadal development, quality of ova and larvae through metamorphosis. *Journal of Shellfish Research*. (11), 437-441 p.

Robinson, A. 1992b. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas* kumamoto (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture*. 106, 89-97 p.

Rodier, J. (1981). Análisis de las aguas: aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. *Omega*. 138-140 p.

SAGARPA. (2008). *Anuario estadístico de Pesca*. Gobierno de México. SAGARPA.

SAGARPA. (2010). *Plan rector: Sistema producto ostión. Sistema Producto Ostión, Baja California Sur*. Gobierno de México. SAGARPA.

Samain, J.F., Séguineau, C., Cochard, J.C., F., D., Nicolas, J.L., Marty, Y., Gaolis, R., Mathieu, M. and Moal, J. (1992). What about growth variability for *Pecten maximus* production? *Océanis*. 18, 49-66 p.

Saucedo, P.E., Ocampo, L., Monteforte, M. and Bervera, H. (2004). Effect of temperature on oxygen consumption and ammonia excretion in the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). *Aquaculture*. 229 377-387 p.

Schleiper, C., Kawalski, R., (1957). In: C. L. Prosser., F. A, Brown, 1969. *Comparative animal physiology*, 2nd ed. Philadelphia, Saunders.

- Sekino, M. (2009). In search of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* (Amemiya, 1928) based on molecular markers: is the natural resource at stake? *Fisheries Science* 75, 819-831 p.
- Shaw, B.L., Battle, I.H. (1957). The gross microscopic anatomy of digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology*. 35, 325-346 p.
- Simmonel, I., Boardman, G.D., Waten, B.J. and Brazil, B.L. (2002). Factor influencing the nitrification efficiency of fluidized bed filter with plastic bead medium. *Aquaculture Engineering*. 26, 41-59 p.
- Steele, S. y Mulcahy, M.F. (1999). Gametogenesis of oyster *Crassostrea gigas* in Southern Ireland. *Journal of Marine Biology Association. U.K.* 70, 673-668 p.
- Timmons, M., Ebeling, J. (2010). *Recirculating Aquaculture*. 2nd ed. Cayuga Aqua Ventures.
- Timmons, M.R., Newell, V. and Mann., K. R. (1996). Reproductive processes and early development. *Maryland: Maryland Sea Grand Book*. 335-370 pp.
- Tran, D., Jean Charles, M. and Vercelli, C. (2008). Influence of sex and spawning status on oxygen consumption and blood oxygenation status in oysters *Crassostrea gigas* cultured in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Aquaculture*. 277, 58-65 p.
- Utting, S. D. (1993). Procedures for the maintenance and hatchery conditioning of bivalve broodstock. *World Aquaculture*. 24, 78-82 p.
- Utting, S., B. Spencer. (1991). *The hatchery culture of bivalve mollusk larvae and juveniles*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Directorate of Fisheries Research.
- Utting, S. D., Millican, P.F. (1997). Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstock and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*. 155, 45-54 p.
- Vásquez Yeomans, R. (2006). Agentes patógenos asociados a las mortalidades del ostión japonés *Crassostrea gigas*, cultivado en el noroeste de México. (Tesis de Doctorado). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. México.

Villareal, H., Rivera, R. (1993). Effects of temperature and salinity on the oxygen consumption of laboratory produced *Penaeus californiensis*. *Comparative Biochemical Physiology* 106A, 103-107 p.

Woelke, C.E. (1955). Introduction of the Kumamoto oyster *Ostrea (Crassostrea gigas)* to the Pacific coast. *Fisheries Research* 1(3), 41-50 p.

Wurts, W. A., Mcneill, S. G and D. D. Overhults. (1994). Performance and design characteristics of airlift pumps for field application. *World Aquaculture*. 25(4). 51-55 p.