

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN  
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
EN ACUICULTURA**

---

**Efecto del sistema carbón-carbonatos en el  
acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto  
(*Crassostrea sikamea*) en un sistema de recirculación  
acuícola**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Salvador Villasuso Palomares**

Ensenada, Baja California, México  
2014

Tesis defendida por

## **Salvador Villasuso Palomares**

y aprobada por el siguiente Comité

---

Dr. Manuel Alberto Segovia Quintero  
Director del Comité

---

Eugenio Díaz Iglesias  
Director del Comité

---

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez  
Miembro del Comité

---

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez  
Miembro del Comité

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
Coordinador del Posgrado en Ciencias  
en Acuicultura

---

Dr. Jesús Favela Vara  
Director de Estudios de Posgrado

*Septiembre, 2014*

Resumen de la tesis que presenta Salvador Villasuso Palomares como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

## **Efecto de Sistema carbón-carbonatos en el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) en un sistema de recirculación acuícola**

Resumen elaborado por:

---

Salvador Villasuso Palomares

La acidificación del océano por efecto de la emisión de CO<sub>2</sub> es un factor limitante el cual ha adquirido una mayor importancia en los últimos años para la producción de los moluscos bivalvos. Los principales efectos de altas concentraciones de CO<sub>2</sub> en bivalvos son: la reducción en la tasa de crecimiento, la disminución del éxito reproductivo, la acidificación de los fluidos internos, el incremento en el riesgo de infecciones, la disolución de la concha y la pérdida del índice de condición. Los sistemas de recirculación acuícola (SRA) son una posible solución para la manipulación de los reproductores de bivalvos y solucionar el efecto a la acidificación por el CO<sub>2</sub>. Los SRA son una opción de producción intensiva que permiten el control de la maduración y el crecimiento de los organismos por manipulación de la calidad de agua, el alimento y el fotoperiodo. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la acidificación del agua y su interacción en el sistema carbón-carbonatos en el índice de condición y en el uso del sustrato metabólico del ostión Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) durante el acondicionamiento reproductivo. Para el experimento se tuvieron un total de 12 SRA divididos en 2 tratamientos: los SRA control y los SRA con reactor de calcio. El acondicionamiento reproductivo se realizó con un gradiente de temperatura ascendente de 18 a 24°C en un periodo de 10 semanas. En cada cambio de temperatura se determinó la tasa de consumo de oxígeno, la excreción amoniaca, análisis histológico de las gónadas, el índice gonadosomático, el índice de condición y diariamente se determinó la calidad del agua en los 12 SRA (OD, pH, temperatura, NAT, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, alcalinidad, CO<sub>2</sub>, CO<sub>3</sub><sup>-2</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). La calidad del agua se mantuvo dentro de los parámetros óptimos para los moluscos bivalvos. Sin embargo las concentraciones de los parámetros que componen el sistema carbón-carbonato (pH, alcalinidad, CO<sub>2</sub>, CO<sub>3</sub><sup>-2</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) fueron significativamente mayores en los SRA con reactor de calcio. No se detectaron diferencias significativas en el índice de condición entre los tratamientos, ni entre el tiempo de acondicionamiento reproductivo. En los cortes histológicos de las gónadas se observaron ostiones indiferenciados y en desarrollo en ambos tratamientos durante las 10 semanas de acondicionamiento reproductivo. En el índice gonadosomático se observó diferentes porcentajes de espacio ocupado por la gónada en la glándula digestiva. Estos resultados indican que los ostiones tuvieron desoves parciales durante el acondicionamiento reproductivo, por

lo cual no fue posible determinar una temperatura acumulada efectiva para la maduración de los organismos. Se detectaron diferencias significativas en la concentración espermática y de ovocitos, así como en el largo y ancho de las larvas D entre los tratamientos, siendo significativamente mayores las mediciones con los SRA con rector de calcio. Estos resultados sugieren que no solamente la temperatura, la alimentación y el fotoperiodo tienen una influencia en el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto, también el intercambio iónico tiene una relación directa durante este proceso.

Palabras clave: **ostión Kumamoto, Crassostrea sikamea, acondicionamiento reproductivo, balance iónico, sistemas de recirculación acuícolas.**

Abstract by Salvador Villasuso Palomares as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

**Effect of the system carbon- carbonates in the reproductive conditioning in the Kumamoto oyster (*Crassostrea sikamea*) in a recirculating aquaculture system**

Abstract by:

---

Salvador Villasuso Palomares

The water acidification by effect of CO<sub>2</sub> has become in one of the major factors in recent years for the production of bivalves. The CO<sub>2</sub> higher concentrations main effects are: reduction of growth rate, decrease in fertility, acidification of body fluids, higher risk of infections, shell dissolution, and loss of condition index. The recirculating aquaculture systems (RAS) are a possible solution to counteract the effect of higher concentrations of CO<sub>2</sub> in water. RAS allow us through the manipulation of water quality, feed rate and photoperiod to control the organisms growth rate and conditioning. The aim of this work was to evaluate the effect of water acidification in the conditioning, condition index and use of metabolic substrate of Kumamoto oyster broodstock (*Crassostrea sikamea*) in a RAS. For the experiment, two treatments were used: treatment 1, RAS with calcium reactors, and treatment 2, RAS without calcium reactors. A total of 12 RAS were used, 6 for treatment 1 and 6 for treatment 2. The conditioning was performed increasing the temperature since 18 to 24°C in a 10 weeks period. Every time the temperature changed, oxygen consumption, ammonia excretion, gonad histology analysis, gonadosomatic index, and condition index were performed. The water quality of the 12 RAS was evaluated daily (DO, pH, temperature, TAN, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, alkalinity, CO<sub>2</sub>, CO<sub>3</sub><sup>-2</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) by triplicate. The water quality was in optimal parameters for *C. sikamea*. However significant differences in the various parameters of the carbon-carbonate system (pH, alkalinity, CO<sub>2</sub>, CO<sub>3</sub><sup>-2</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) were detected between the treatments, RAS with the calcium reactor showed higher concentrations. No differences in condition index were detected between treatments and through time. Histology analysis revealed undifferentiated and development gonads throughout the 10 weeks conditioning period. The gonadosomatic index revealed different percentages of space occupied by the gonad in digestive gland at all temperatures. These results indicated that Kumamoto broodstock spawn partially through the conditioning period and it was not possible to determine an effective accumulated temperature for these oysters. Significant differences in sperm and oocytes number and the of D larvae length and width were

detected between the treatments being higher in the RAS with the calcium reactor. These results suggested that not only feed ratio, temperature and photoperiod has a direct influence on the reproductive conditioning of the Kumamoto oyster, the ion balance related to the alkalinity carbon – carbonate system have an effect also.

**Key words: Kumamoto oyster, Crassostrea sikamea, conditioning, ionic balance, recirculating aquaculture system.**

## **Dedicatoria**

Esta tesis se la dedico principalmente a mis padres Salvador Villasuso A. Martínez, María del Rosario Palomares Vázquez y a mi hermana María del Rosario Villasuso Palomares, por su apoyo y amor incondicional durante estos 2 años de intenso trabajo.

A mis abuelos, que han sido una fuente de inspiración muy importante en mi vida (2c).  
A toda mi familia que siempre estuvo al pendiente de mí, durante mi estancia en Ensenada. A mis amigos (pachangos) que siempre me brindaron su apoyo incondicional y estuvieron siempre pendientes de mis logros personales.

## Agradecimientos

Al CONACyT por el apoyo económico durante 2 años, para poder realizar mi Maestría

A mis padres y hermana, por apoyarme y darme consejos. A Melissa Montes Montes y Bernardo Méndez Rodríguez por su apoyo y ayuda durante la maestría. A mis compañeros de laboratorio Juan Pablo González Hermoso, Julio Enrique Ramos Chávez, y Romy Andrea Martínez Peña con los cuales conviví y trabajé todos los días. A Benito Arturo Niebla por ayudarme a desarrollar un protocolo para el experimento de respirometría y a Yanet Guerrero Rentería por su ayuda en la histología. Finalmente quiero agradecer de una manera especial a Candy Elizabeth Armuelles Bernal, que se desveló y sufrió conmigo durante mis extensos experimentos de respirometría y me ayudo siempre que lo necesitaba.

Al Doctor Manuel Segovia, la Doctora Carmen Paniagua y al Doctor Eugenio Díaz por su paciencia, apoyo y guía durante la realización y escritura de esta tesis.



## Contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en ingles.....	iv
Dedicatoria.....	vi
Agradecimientos.....	vii
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas.....	xv
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Generalidades del ostión Kumamoto.....	2
1.2 Antecedentes.....	4
1.3 Hipótesis.....	8
1.4 Objetivos.....	8
1.41 Objetivo general.....	8
1.42 Objetivos específicos.....	8
<b>Capítulo 2. Materiales y métodos.....</b>	<b>10</b>
2.1 Obtención de los organismos.....	10
2.2 Aclimatación.....	10
2.3 Sistemas de recirculación acuícolas (SRA).....	11
2.4 Reactor de calcio.....	12
2.5 Alimentación.....	13
2.6 Diseño experimental.....	12
2.7 Calidad del agua.....	14
2.8 Control de la temperatura acumulada efectiva y fotoperiodo.....	16
2.9 Consumo de oxígeno y excreción amoniacal.....	16
2.10 Índice de condición.....	18
2.11 Histología.....	18
2.12 Índice gonadosomático.....	21
2.13 Fertilización.....	21
2.14 Mortalidad.....	22
2.16 Análisis estadístico.....	22
<b>Capítulo 3. Resultados.....</b>	<b>24</b>
3.1 Alimentación durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto en un SRA.....	24
3.2 Calidad del agua durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto en un SRA.....	25
3.21 Calidad del agua 18°C.....	25
3.22 Calidad del agua 20°C.....	26
3.23 Calidad del agua 22°C.....	26
3.24 Calidad del agua 24°C.....	27

## Tabla de contenido (continuación)

3.25 Comparación de las variables de la calidad del agua en las cuatro diferentes temperaturas del acondicionamiento reproductivo de cada tratamiento.....	28
3.26 pH.....	29
3.27 $\text{CO}_3^{-2}$ .....	30
3.28 $\text{HCO}_3^-$ .....	31
3.29 $\text{CO}_2$ .....	32
3.30 Alcalinidad.....	32
3.31 Consumo de oxígeno y excreción amoniacal del ostión Kumamoto durante su acondicionamiento reproductivo en un SRA.....	34
3.31 Consumo de oxígeno.....	34
3.32 Comparación del consumo de oxígeno durante las diferentes temperaturas.....	34
3.33 Excreción amoniacal del ostión Kumamoto durante su acondicionamiento reproductivo en un SRA a diferentes temperaturas.....	35
3.4 Índice de condición.....	36
3.5 Análisis histológico del desarrollo gonádico del ostión Kumamoto durante el acondicionamiento reproductivo.....	37
3.6 Índice gonadosomático.....	47
3.7 Fertilización.....	47
3.8 Mortalidad.....	49
<b>Capítulo 4. Discusión.....</b>	<b>50</b>
4.1 Alimentación.....	50
4.2 Calidad del agua.....	51
4.21 Sistema carbón- carbonatos.....	55
4.3 Consumo de oxígeno.....	58
4.4 Índice de condición.....	59
4.5 Histología.....	60
4.6 Temperatura acumulada efectiva (TAE).....	60
4.7 Fertilidad.....	61

## Tabla de contenido (continuación)

<b>Capítulo 5. Conclusiones</b> .....	63
5.1 Recomendaciones.....	64
Lista de referencias.....	65

## Lista de Figuras

Figura		Página
1	Mapa de Kyushu, ubicación del mar Ariake y la prefectura de Kumamoto en Japón (Sekino, 2009).....	2
2	Interacción entre las especies químicas del sistema carbón-carbonatos y el pH (Timmons <i>et al.</i> , 2002).....	5
3	Interacción entre el sistema carbón-carbonatos y un molusco bivalvo.....	6
4	Ubicación de la compañía Bivalva S.A de C.V. Ensenada, Baja California, México (Google Maps, 2013).....	10
5	Sistema de recirculación acuícola para el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto.....	11
6	Reactor de calcio utilizado durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto en un SRA. (1) cámara de reacción con coral fósil, (2) bomba, (3) cámara de burbujas, (4) entrada de agua al reactor proveniente de los SRA y (5) retorno del agua a los SRA.....	12
7	Diseño experimental del acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto en un SRA. Los sistemas del 1al 6 corresponden a los sistemas control, mientras que los sistemas del 7 al 12 corresponden a los sistemas con reactor de calcio.....	14
8	Perfil de temperaturas y el tiempo en semanas para la maduración del ostión Kumamoto en un sistema de recirculación acuícola. Las flechas indican las semanas en las que se realizaron fisiológicos como: consumo de oxígeno, excreción amoniacal e índice de condición.....	16
9	Equipo y para la determinación de consumo de oxígeno (A). Cámara metabólica y electrodo usados para la determinación de consumo de oxígeno (B).....	17
10	Ubicación de la sección a cortar en tejido metabólicamente activo en el ostión para histología (líneas punteadas) (Quintana y Burnside, 2011).....	19
11	Trazado del área ocupada por la gónada en un ostión Kumamoto (A). Trazado del área ocupada por la glándula digestiva en un ostión Kumamoto (B).....	21

## Lista de Figuras (continuación)

12	Curva de calibración para determinar la concentración de microalgas presentes en los sistemas de recirculación acuícolas para el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto.....	24
13	El pH (media $\pm$ desviación estándar) durante las 10 semanas del acondicionamiento reproductivo del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> en un SRA a diferentes temperaturas. La gráfica derecha (A) representa los SRA control y la gráfica izquierda (B) los SRA con reactor de calcio. Letras diferentes a>b>c indican diferencias significativas entre las temperaturas.....	30
14	Comportamiento de la concentración de $\text{CO}_3^-$ (media $\pm$ desviación estándar) durante las 10 semanas del acondicionamiento reproductivo del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> en un SRA a diferentes temperaturas. La gráfica izquierda (A) representa los SRA control y la derecha gráfica (B) los SRA con reactor de calcio. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas entre las temperaturas.....	31
15	Comportamiento de la concentración de $\text{HCO}_3^-$ (media $\pm$ desviación estándar) durante las 10 semanas del acondicionamiento reproductivo del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> en un SRA a diferentes temperaturas. La gráfica izquierda (A) representa los sistemas de SRA control y la gráfica derecha (B) los SRA con reactor de calcio. Letras diferentes a>b>c indican diferencias significativas entre las temperaturas.....	32
16	Comportamiento de la concentración de los $\text{CO}_2$ (media $\pm$ desviación estándar) durante las 10 semanas del acondicionamiento reproductivo del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> en un SRA a diferentes temperaturas. La gráfica izquierda (A) representa los SRA control y la gráfica derecha (B) los SRA con reactor de calcio. Letras diferentes a>b>c indican diferencias significativas entre las temperaturas.....	33
17	Comportamiento de la concentración de la alcalinidad (media $\pm$ desviación estándar) durante las 10 semanas del acondicionamiento reproductivo del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> en un SRA a diferentes temperaturas. La gráfica izquierda (A) representa los SRA control y la gráfica derecha (B) los SRA con reactor de calcio. Letras diferentes a>b>c indican diferencias significativas entre las temperaturas.....	33

## Lista de Figuras (continuación)

18	Consumo de oxígeno del ostión Kumamoto durante su acondicionamiento reproductivo por tratamientos durante las diferentes temperaturas. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas entre los tratamientos.....	35
19	Índices de condición (media $\pm$ desviación estándar) durante las 10 semanas del acondicionamiento reproductivo del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> en un SRA a diferentes temperaturas. Letras diferentes a>b>c indican diferencias significativas.....	36
20	Descripción histológica de la gónada del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> anterior al inicio del acondicionamiento reproductivo. Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatocitos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Maduro, B: Desarrollo, C: Indiferenciado, D: Desarrollo.....	38
21	Descripción histológica de la gónada del ostión Kumamoto ( <i>Crassostrea sikamea</i> ) durante el acondicionamiento reproductivo en los SRA control a los 18°C (semana 3). Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatocitos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Desarrollo, B: Desarrollo, C: Desarrollo, D: Desarrollo.....	39
22	Descripción histológica de la gónada del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> durante el acondicionamiento reproductivo en un SRA con reactor de calcio a 18°C (semana 3). Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatocitos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Maduro, B: Desarrollo, C: Indiferenciado, D: Desarrollo.....	40
23	Descripción histológica de la gónada del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> durante el acondicionamiento reproductivo en los SRA control a los 20°C (semana 4). Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatocitos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Desarrollo, B: Desarrollo, C: Desarrollo, D: Indiferenciado.....	41

## Lista de Figuras (continuación)

24	Descripción histológica de la gónada del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> durante el acondicionamiento reproductivo en los SRA con reactor de calcio a los 20°C (semana 4). Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatocitos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Indiferenciado, B: Desarrollo, C: Desarrollo, D: Desarrollo.....	42
25	Descripción histológica de la gónada del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> durante el acondicionamiento reproductivo en los sistemas de SRA control a los 22°C (semana 7). Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatocitos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Desarrollo, B: Desarrollo, C: Indiferenciado, D: Desarrollo.....	43
26	Descripción histológica de la gónada del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> durante el acondicionamiento reproductivo en los SRA con reactor de calcio a los 22°C (semana 7). Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatocitos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Desarrollo, B: Desarrollo, C: Indiferenciado, D: Desarrollo.....	44
27	Descripción histológica de la gónada del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> durante el acondicionamiento reproductivo en los SRA control a los 24°C (semana 10). Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatocitos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Maduro, B: Maduro, C: Maduro, D: Desarrollo.....	45
28	Descripción histológica de la gónada del ostión <i>Crassostrea sikamea</i> durante el acondicionamiento reproductivo en los SRA con reactor de calcio a los 24°C (semana 10). Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatocitos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Indiferenciado, B: Desarrollo, C: Maduro, D: Maduro.....	46
29	La imagen del extremo derecho representa un ostión Kumamoto no maduro y la imagen del extremo izquierdo un ostión Kumamoto maduro.....	48
30	Medición del largo y el ancho ( $\mu\text{m}$ ) de las larvas obtenidas en la fertilización del ostión Kumamoto.....	49

## Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Clasificación del desarrollo gonádico de los machos y hembras del ostión Kumamoto.....	20
2	Concentración celular del alimento entre los SRA control y los SRA con reactor de calcio en las diferentes temperaturas del acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto. Letras diferentes a>b indican diferencias significativas entre los tratamientos.....	25
3	Variables de la calidad del agua entre los SRA control y los SRA con reactor de calcio a 18°C durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto. Letras diferentes a>b indican diferencias significativas entre los tratamientos.....	25
4	Variables de la calidad del agua entre los SRA control y los SRA con reactor de calcio a 20°C durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto. Letras diferentes a>b indican diferencias significativas entre los tratamientos.....	26
5	Variables de la calidad del agua entre los SRA control y los SRA con reactor de calcio a 22°C durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto. Letras diferentes a>b indican diferencias significativas entre los tratamientos.....	27
6	Variables de la calidad del agua entre los SRA control y los SRA con reactor de calcio a 24°C durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas entre los tratamientos.....	28
7	Variables de la calidad del agua en las cuatro diferentes temperaturas durante el acondicionamiento reproductivo de cada tratamiento con SRA control y SRA con reactor de calcio. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas entre las temperaturas.....	29



## Lista de Tablas (continuación)

8	Consumo de oxígeno del ostión Kumamoto durante su acondicionamiento en SRA control y un SRA con reactor de calcio a diferentes temperaturas.....	35
9	Estadio gonadal del ostión Kumamoto ( <i>Crassostrea sikamea</i> ) previo al acondicionamiento reproductivo (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).....	38
10	Estadio gonadal de los ostiones Kumamoto ( <i>Crassostrea sikamea</i> ) en los SRA control 18°C (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).....	39
11	Estadio gonadal de los ostiones Kumamoto ( <i>Crassostrea sikamea</i> ) en los SRA con reactor de calcio a los 18°C (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).....	40
12	Estadio gonadal de los ostiones Kumamoto ( <i>Crassostrea sikamea</i> ) en los SRA control a los 20°C (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).....	41
13	Estadio gonadal de los ostiones Kumamoto ( <i>Crassostrea sikamea</i> ) en los SRA con reactor de calcio a los 20°C (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).....	42
14	Estadio gonadal de los ostiones Kumamoto ( <i>Crassostrea sikamea</i> ) en los SRA control a los 22°C (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).....	43
15	Estadio gonadal de los ostiones Kumamoto ( <i>Crassostrea sikamea</i> ) en los SRA con reactor de calcio a los 22°C (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).....	44
16	Estadio gonadal de los ostiones Kumamoto ( <i>Crassostrea sikamea</i> ) en los SRA control a los 24°C (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).....	45
17	Estadio gonadal de los ostiones Kumamoto ( <i>Crassostrea sikamea</i> ) en los SRA con reactor de calcio a los 24°C (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).....	46

## Lista de Tablas (continuación)

18	Porcentaje ocupado por la gónada en el ostión Kumamoto durante su acondicionamiento reproductivo en un sistema de recirculación control y un sistema de recirculación con reactor de calcio.....	47
19	Número de ovocitos, espermatozoides, larvas D, el ancho y el largo de las larvas D entre los SRA control y los SRA con reactor de calcio, obtenidos de los reproductores de ostión Kumamoto después de las 10 semanas del periodo de acondicionamiento reproductivo. Letras diferentes a>b>c indican diferencias significativas.....	48

## Capítulo 1. Introducción

La producción acuícola mundial en el 2010 fue de 59.81 millones de toneladas, las cuales se dividieron en peces de agua dulce (33.7 millones de toneladas), moluscos (14.2 millones de toneladas), crustáceos (5.7 millones de toneladas), peces diádromos (3.6 millones de toneladas), peces marinos (1.8 millones de toneladas) y otros animales acuáticos (814, 300 toneladas) (FAO, 2012). Los moluscos se destacan de estos grupos de producción (en su mayoría bivalvos como ostiones, mejillones y almejas, entre otros) debido a que su cultivo requiere un mínimo de mantenimiento y depende de la producción natural del medio. Estas características hacen a los bivalvos una fuente económica de proteína animal más barata comparada con los peces y crustáceos incrementando su interés por parte de los productores acuícolas para su cultivo (Helm *et al.*, 2004).

A nivel mundial, los principales productores de moluscos bivalvos son: China, Japón, Estados Unidos de América, República de Corea, Tailandia, Francia, España, Italia y Chile. México ocupa el cuarto lugar en la producción de moluscos bivalvos en América Latina por debajo de Chile, Brasil y Perú (FAO, 2008). En México la acuicultura de los bivalvos se lleva casi en su totalidad en las costas del Pacífico de Baja California y el Golfo de California (Cariño y Monteforte, 1995).

En México el bivalvo con mejor aceptación es el ostión, debido a su amplia distribución, abundancia, sabor, valor nutritivo, y su gran adaptabilidad. México cuenta con nueve especies de ostión de importancia comercial, para la explotación acuícola y pesquera. Las especies de ostiones más importantes en México son: (1) el ostión del Este (*Crassostrea virginica*), (2) el ostión de Piedra (*Crassostrea iridescens*), (3) el ostión del Placer (*Crassostrea corteziensis*), (4) el ostión de Mangle (*Crassostrea rhizophorae*), (5) el ostión Japonés (*Crassostrea gigas*), (6) *Ostrea angelica*, (7) *Ostrea fisheri*, (8) *Ostrea palmula* y (9) el ostión Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) (SAGARPA, 2010). Entre estas especies de importancia comercial, el ostión Kumamoto ha despertado el interés de los productores ostrícolas, debido a que es una especie que tiene un sabor sutil, una mayor proporción de carne con respecto a su concha, una mejor textura incluso durante

la época de verano y puede alcanzar el doble del precio que el ostión japonés (*C. gigas*) (Robinson, 1992; Gordon *et al.*, 2001).

### 1.1 Generalidades del ostión Kumamoto

El ostión Kumamoto es nativo del Mar de Ariake (Figura 1), ubicado en Kyushu, en la prefectura de Kumamoto en Japón (Sekino, 2009). El ostión Kumamoto pertenece al filo Mollusca al grupo de los lamelibranquios o bivalvos (CONAPESCA, 2008). El ostión Kumamoto está conformado por dos valvas de forma irregular y asimétrica unidas por una charnela. Las valvas están compuestas por carbonato de calcio como la calcita, aragonita y una matriz orgánica (Addadi *et al.*, 2006). La parte exterior de las valvas es áspera, mientras que en su interior es lisa, debido a que los carbonatos de calcio se transforman en una sustancia iridiscente llamada “nacar” (CONAPESCA, 2008). Estos organismos alcanzan la madurez sexual en el primer año de vida, su fecundación es externa (Imai, 1982; Pauley *et al.*, 1988) y presentan un hermafroditismo protándrico (Baghurts y Mitchell, 2002).

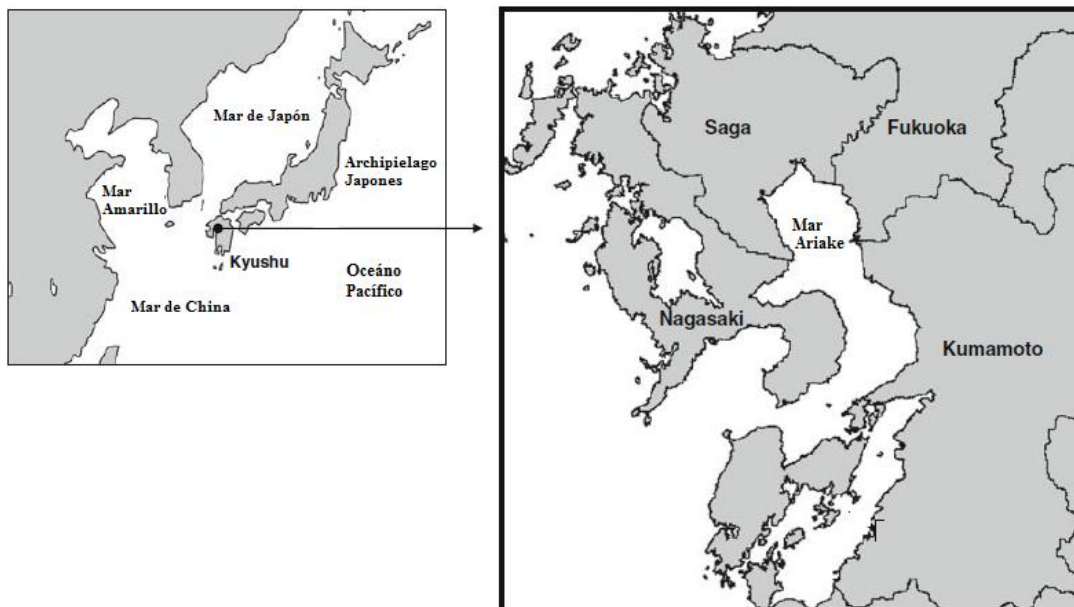


Figura 1. Mapa de Kyushu, ubicación del mar Ariake y la prefectura de Kumamoto en Japón, obtenido de Sekino 2009.

El ostión Kumamoto fue introducido a México en 1975 a la bahía de San Quintín (Baja California, México) para su cultivo comercial con semilla proveniente de la costa oeste de los Estados Unidos de América como una variedad del ostión japonés (*Crassostrea gigas*) (Cáceres-Martínez *et al.*, 2012). Posteriormente el cultivo del ostión Kumamoto se extendió a los estados de Baja California Sur, Sonora y Sinaloa con semilla producida en laboratorio (SAGARPA, 2010). La producción de moluscos bivalvos en México presenta una serie de limitaciones que han frenado su desarrollo. La disponibilidad de alimento, la depredación, las mortalidades masivas asociadas a parásitos y las enfermedades, así como el cambio climático y la calidad variante del agua son algunas de las razones (Cáceres-Martínez *et al.*, 2013). La principal razón por la cual la producción de moluscos bivalvos se ha visto limitada para su desarrollo en México es la falta de semilla (FAO, 2008). En los años ochenta y noventa el abastecimiento de juveniles provenía del Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES). Sin embargo por cambios administrativos la producción de semilla colapsó. El colapso del centro provocó que los ostricultores mexicanos buscaran como fuente de abastecimiento los laboratorios de Washington y Oregon en Estados Unidos de América para suplir la demanda de larvas pediveliger y semilla (FAO, 2008).

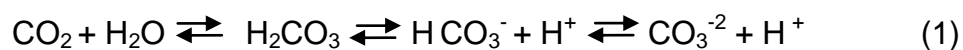
Otro factor limitante para la producción de los moluscos bivalvos al cual se le ha comenzado a dar mayor importancia, es la acidificación del océano, por efecto de la emisión de  $\text{CO}_2$  (Arnold *et al.*, 2009). Al disolverse el  $\text{CO}_2$  en el agua de mar, causa un incremento en la concentración del ion hidronio ( $\text{H}^+$ ) y una disminución del ion carbonato ( $\text{CO}_3^{-2}$ ). El resultado es una disminución del pH y de los estados de saturación del carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) oceánico (Cummings *et al.*, 2011). Las reducciones del pH en el agua marina tienen un impacto negativo en la fisiología y desarrollo de los bivalvos, al disminuir el pH interno generando acidosis e hipercapnia (Pörtner *et al.*, 2004, 2005; Raven *et al.*, 2005; Cummings *et al.*, 2011), además de tener un efecto en la concentración de  $\text{CaCO}_3$  disponible. Los principales efectos de altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  en bivalvos son: la reducción en la tasa de crecimiento (Gazeau *et al.*, 2007), la disminución del éxito reproductivo (Kurihara *et al.*, 2004), la

acidificación de los fluidos internos (Spicer *et al.*, 2007), el incremento en el riesgo de infecciones (Holman *et al.*, 2004) y disolución de la concha (Bamber, 1990).

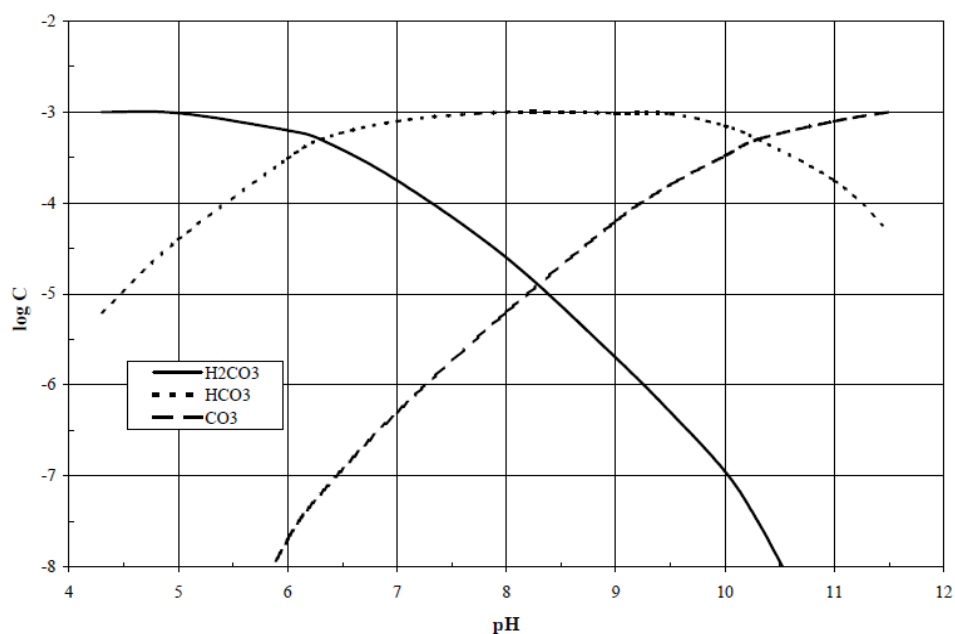
## 1.2 Antecedentes

Los organismos marinos que tienen estructuras de carbonatos de calcio, como los bivalvos, son los más sensibles a decrementos en el pH del océano provocando una disolución de la concha. El proceso de disolución de la concha de los bivalvos comienza cuando el CO<sub>2</sub> presente en un cuerpo de agua (dulce u oceánica) se asocia con las moléculas de agua generando ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). El H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> por ser un ácido débil se puede disociar en un ion hidronio (H<sup>+</sup>) y bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). El HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> también tiene la capacidad de disociarse y lo hace en un ión carbonato (CO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y en un ión hidronio (H<sup>+</sup>). Los iones hidronio aportados por la disociación del H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> protonan el agua bajando el pH. Los iones hidronio pueden ser neutralizados asociándose con iones CO<sub>3</sub><sup>-</sup> formando HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

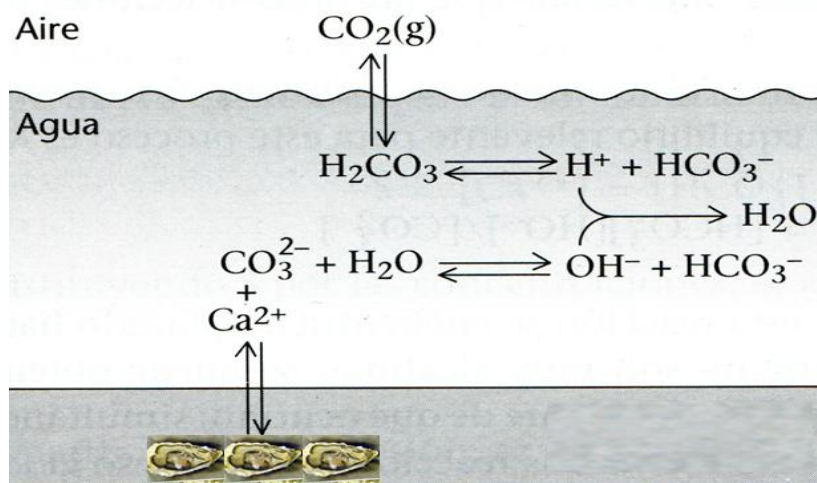
El H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al entrar en contacto con la concha provoca una disolución, disociando los carbonatos de calcio (CaCO<sub>3</sub>) de la estructura de la concha en iones CO<sub>3</sub><sup>-</sup> y Ca<sup>+2</sup>. Los iones de CO<sub>3</sub><sup>-</sup> provenientes de la disolución de la concha sirven como amortiguadores para neutralizar los iones H<sup>+</sup> provenientes de la disociación del H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> produciendo HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> regularizando el pH (Figura 3). Entre mayor sea la concentración de CO<sub>2</sub> en el agua, mayor será la concentración de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y el pH tenderá a acidificarse. Cuando la especie química dominante son los HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, el pH se mantendrá en el rango de lo neutro a lo ligeramente alcalino. En contraste cuando los CO<sub>3</sub><sup>-</sup> sean la especie química dominantes el pH tenderá hacia lo alcalino (Figura 2) (Timmons *et al.*, 2002). Esta interacción entre las diversas formas de carbono (CO<sub>2</sub>, CO<sub>3</sub><sup>-</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) con el pH y la alcalinidad le denominaremos sistema carbón-carbonatos y se representa con la siguiente ecuación:



El efecto de la acidificación del océano sobre el crecimiento y la producción de la concha en juveniles y adultos es muy variable, incluso entre organismos de las mismas especies (Gazeau *et al.*, 2013). Pequeñas variaciones en el pH pueden provocar una disolución de la concha (Arnold *et al.*, 2009). En *C. virginica* y en el mejillón azul (*Mytilus edulis*) se presenta una disolución de la concha con una disminución de 0.5 en el pH (Beniash *et al.*, 2010; Talmage y Gobler 2011). Para el mejillón del Mediterráneo con un decremento de 0.75 pH se obtienen los mismos resultados (Michaelidis *et al.*, 2005; Berge *et al.*, 2006).



**Figura 2. Interacción entre las especies químicas del sistema carbón-carbonatos y el pH (Timmons *et al.*, 2002).**



**Figura 3. Interacción entre el sistema carbón carbonatos y un molusco bivalvo**

Los sistemas de recirculación acuícolas (SRA) son una posible solución a las limitantes de depredación, disponibilidad de alimento, mortalidades por parásitos, cambios climáticos, calidad de agua variante y sobre todo la falta de juveniles y la acidificación por efecto del  $\text{CO}_2$ . Los SRA son una opción de producción intensiva donde por medio de la aplicación de operaciones unitarias básicas como: la recirculación, la remoción de sólidos, la nitrificación, la aireación/oxigenación y la desgasificación se proporcionan las condiciones óptimas de la calidad del agua para el cultivo acuícola. Una característica de los SRA es que permiten el uso racional del agua ya que el recambio diario es menor al 10% del volumen total del sistema (Timmons y Ebeling, 2010). Con el manejo y correcta aplicación de las operaciones unitarias básicas, se tiene el control sobre los principales factores que componen la dinámica de la calidad del agua como el nitrógeno amoniacal total (NAT), los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), la temperatura, el oxígeno disuelto (OD), la salinidad, el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), la alcalinidad y el pH. Los SRA permiten un mayor control en la cantidad y calidad del alimento, el control de parásitos y depredadores, así como el control de la temperatura y el fotoperiodo.

El control sobre los factores fisicoquímicos relacionados con la dinámica de la calidad del agua, los factores ambientales y los factores de alimentación manejados por las operaciones unitarias permite la creación de condiciones para una producción o reproducción de organismos acuáticos en forma continua durante todo el año (Timmons



*et al.*, 1996). El acondicionamiento reproductivo es un procedimiento en el cual se busca ampliar el ciclo reproductivo de los organismos sin tener que depender del periodo de reproducción natural (Helm *et al.*, 2004). El principal objetivo de usar SRA en el acondicionamiento reproductivo de bivalvos es maximizar la producción en cantidad y calidad de los gametos con el fin de obtener larvas con una alta viabilidad. El fotoperiodo, la alimentación y la temperatura son los principales factores a considerar para lograr una buena calidad y viabilidad de los gametos y larvas de los bivalvos (Utting y Millican, 1997).

En los moluscos bivalvos el fotoperiodo es una importante variable para promover la maduración durante el acondicionamiento reproductivo (Mallet y Carver, 2009). El fotoperiodo es un desencadenador de respuestas de otros factores que dependen de las condiciones ambientales (Bradshaw y Holzapfel, 2007). La disponibilidad de alimento en cantidad y calidad es un factor determinante en el proceso de maduración, ya que mejora la fertilidad y la calidad de los gametos (Utting and Millican, 1997). Los mejores resultados se han obtenido cuando los organismos son alimentados entre el 3% y el 6% del peso seco corporal, si la concentración del alimento es mayor al 9% provoca un crecimiento excesivo de las valvas, reduce la cantidad de espermias u ovocitos, reduce la viabilidad de las larvas y provoca desoves involuntarios (Utting y Millican, 1997; Martínez y Pérez, 2003). En el proceso de maduración es necesario que el alimento posea un perfil completo de ácidos grasos altamente insaturado como el ácido eicosapentaenoico, 20:5 n-3 (EPA) y el ácido docosahexaenoico, 20:6 n-3 (DHA), ya que son de importancia estructural para los ovocitos (Helm *et al.*, 2004 ). Las microalgas más utilizadas para la alimentación de moluscos bivalvos por cumplir con los ácidos grasos necesarios para la maduración son: *Tetraselmis (chuii, T. tetrahele y T. suecica)*, *Isochrysis spp.*, *Pavlova spp.*, *Chaetoceros spp* y *Thalassiosira weissfloggii* (Helm *et al.*, 2004).

La temperatura es otro factor determinante en la reproducción de los bivalvos (Sastry, 1968; Robinson, 1992; Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001). El cambio en las temperaturas del agua varía de acuerdo a la estación del año en turno y está directamente correlacionada con la gametogénesis en bivalvos (Sastry, 1979).

Cuando los organismos son sometidos a un acondicionamiento reproductivo existen cambios en la tasa metabólica y el gasto de energía, por lo cual es necesario monitorear constantemente el estado fisiológico de los organismos (Saucedo *et al.*, 2004). El consumo de oxígeno y el índice de condición han sido utilizados como indicadores del estado fisiológico de los organismos. El consumo de oxígeno permite determinar el metabolismo post-alimenticio, así como el destino de la energía asimilada a través del alimento (Villareal y Rivera, 1993; Díaz-Iglesias *et al.*, 2004). El índice de condición nos da información sobre el estado fisiológico del organismo debido a su actividad (reproducción, crecimiento) bajo ciertas condiciones ambientales (Bayne *et al.*, 1973). En la actualidad hay insuficiente información acerca del proceso de maduración del ostión Kumamoto en SRA y cómo influye la dinámica de la calidad del agua durante el acondicionamiento reproductivo, así como el efecto iónico del sistema carbón carbonatos. Por estas razones en este trabajo se busca evaluar el efecto del sistema carbón-carbonatos en el acondicionamiento reproductivo y la fertilidad de una especie económicamente importante como es el ostión Kumamoto.

### **1.3 Hipótesis**

El control del sistema carbón-carbonatos y la calidad del agua pueden disminuir la pérdida del índice de condición durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) en un sistema de recirculación acuícola.

### **1.4 Objetivos**

#### **1.41 Objetivo general**

Evaluar el efecto de la acidificación del agua en el índice de condición y en el uso del sustrato metabólico del ostión Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) durante el acondicionamiento reproductivo y su interacción en el sistema carbón-carbonatos.

#### **1.42 Objetivos específicos**

1. Caracterizar la dinámica del sistema carbón-carbonato (alcalinidad,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ) en el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto (*Crassostrea sikamea*)

2. Caracterizar la dinámica de la calidad del agua ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , temperatura, pH y  $\text{O}_2$ ) durante el acondicionamiento reproductivo
3. Evaluar el efecto del sistema carbón-carbonato en la fertilidad del ostión Kumamoto acondicionado en un sistema de recirculación acuícola.

## Capítulo 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Obtención de los Organismos

Un total de 240 ostiones Kumamoto (*Crassostrea sikamea*, Amemiya, 1928) fueron usados para el experimento. Los organismos fueron donados por la empresa acuícola Bivalva S. A. de C.V. ubicada en la Bahía Todos Santos en Ensenada Baja California, México (Figura 4).



Figura 4. Ubicación de la compañía Bivalva S.A de C.V. Ensenada, Baja California, México (Google Maps, 2013).

### 2.2 Aclimatación

Los organismos se aclimataron por aproximadamente 6 semanas en tanques de 200L con un recambio diaria del 10% del volumen total, a una temperatura de  $17.35 \pm 2^\circ\text{C}$ , un pH de  $7.99 \pm 1.45$  y una alcalinidad de  $130.77 \pm 6.78$  mg/L en el laboratorio de Diseño y Desarrollo de Tecnología Acuícola, en el Departamento de Acuicultura del CICESE. Antes de ser colocados en el tanque, las valvas de los ostiones fueron limpiadas para eliminar epibiontes. En el proceso de aclimatación los organismos fueron alimentados con un concentrado de pasta de microalgas Shellfish Diet 1800 (Reed Mariculture, Ca, USA), a una concentración de  $2 \times 10^6$  células por organismo por día. Previo al

experimento los ostiones se indujeron al desove por medio de shock térmico con la técnica descrita por Helm *et al.*, (2004), con la intención de contar con organismos sexualmente no maduros. Esta técnica consiste en someter a los organismos a bajas y altas temperaturas, para lograr un diferencial de 10°C durante periodos de 20 minutos, hasta que los organismos liberen sus gametos.

### 2.3 Sistema de recirculación acuícola (SRA)

Cada sistema de recirculación estaba formado por un tanque de maduración transparente de fondo plano de 20L, un biofiltro de medio dinámico de 48 L y un fraccionador de espuma para la retención de sólidos disueltos (Figura 5). El biofiltro contenía 2.65 L de medio dinámico K1 (Kaldnes, Aquatic Eco-systems, USA), con una superficie de área de 24.062 m<sup>2</sup>, una longitud de 7 mm de largo y 10 mm de diámetro. La recirculación de agua en los sistemas se llevó a cabo por medio de bombeo con aire, con un aireador eléctrico regenerativo de 1HP (S43, Aquatic Eco-systems, USA). La temperatura del agua en los SRA se controló con calentadores eléctricos con termostato de 500 watts JH500 (Aquatic Eco-systems). Cada SRA contó con su propio calentador y termostato para cumplir con el gradiente ascendente de temperatura (Figura 7).

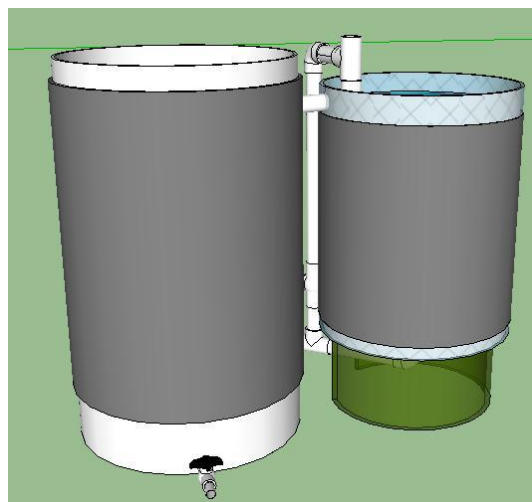


Figura 5. Sistema de recirculación acuícola para el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto

## 2.4 Reactor de calcio

El reactor de calcio estaba formado por una cámara de reacción (40 cm largo x 10.16 cm diámetro, 3.24 L), la cual tenía en su interior 1.5 Kg de corales fósiles (ReBorn, Florida, USA) como fuente de  $\text{CO}_3^{2-}$ . El agua circuló del reactor hacia los SRA con una bomba Quiet one modelo 1200 con una tasa de flujo de 18.64 L/min (Lifegar Aquactics, California, USA). El flujo de  $\text{CO}_2$  se contabilizó por medio de una cámara de burbujas (16.5 cm largo x 5.2 cm diámetro, 0.380 L). El conteo de burbujas se contabilizó en 34 ( $\pm 5$ ) burbujas por minuto.



**Figura 6.** Reactor de calcio utilizado durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto en un SRA. (1) cámara de reacción con coral fósil, (2) bomba, (3) cámara de burbujas, (4) entrada de agua al reactor proveniente de los SRA y (5) retorno del agua a los SRA.

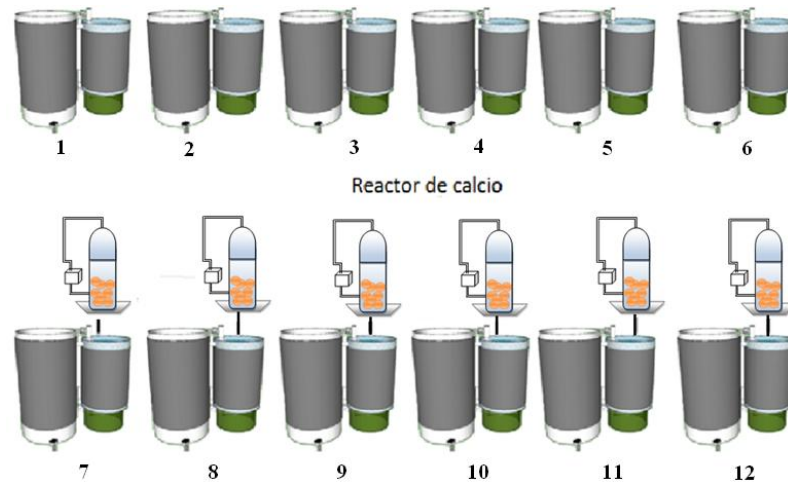
## 2.5 Alimentación

En la fase experimental los ostiones se alimentaron con una pasta comercial de microalgas Shellfish Diet 1800 (Reed Mariculture CA, USA) a una concentración de  $2 \times 10^8$  células por organismo por día. La pasta de microalgas está compuesta por una mezcla de 4 diferentes microalgas: *Isochrysis* spp, *Pavlova* spp., *Thalassiosira weissfloggii* y *Tetraselmis* spp., con una concentración de  $2 \times 10^9$  células/mL. La dosis de alimentación fue dividida en 2 porciones para evitar la producción de pseudoheces.

A fin de determinar la concentración de alimento consumido en los SRA, se elaboró una curva de calibración. La curva de calibración se elaboró haciendo diluciones de 1:10 hasta 1:100,000 células/mL en una microplaca de plástico con pozos de 300  $\mu$ L. Las diluciones fueron leídas a una longitud de onda de 670 nm en un espectrofotómetro Epoch (Biotek Instruments, Winooski, USA).

## 2.6 Diseño experimental

Se realizó un diseño totalmente aleatorizado con 12 SRA. En cada sistema se pusieron 20 ostiones Kumamoto de aproximadamente 1 año de edad. Los SRA fueron divididos en 2 grupos. El primer grupo constó de 6 SRA y fue usado como control. Para el segundo grupo fueron usados la misma cantidad de sistemas con la adición de un reactor de calcio por cada SRA (Figura 7).



**Figura 7. Diseño experimental del acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto en un SRA. Los sistemas del 1 al 6 corresponden a los sistemas control, mientras que los sistemas del 7 al 12 corresponden a los sistemas con reactor de calcio.**

## 2.7 Calidad del Agua

Las variables que componen la calidad del agua, como: nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos ( $\text{NO}_2$ ), nitratos ( $\text{NO}_3$ ), temperatura, oxígeno disuelto (OD), salinidad, alcalinidad ( $\text{CaCO}_3$ ), pH, dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) y bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ) se midieron diariamente durante las 10 semanas de experimento. El pH se midió con un potenciómetro portátil pH10 (YSI, Ohio, USA). El OD y la temperatura se midieron con un multiparámetros 55-12 (YSI, Ohio, USA). La salinidad se midió por medio de refractómetro (Vitalsine SR-6, Aquatic Eco-systems, USA).

Los compuestos nitrogenados (NAT,  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ ) se determinaron con las técnicas espectrofotométricas descritas en el APHA (1995). El NAT fue determinado con el método de azul de indofenol, leído a una longitud de onda de 640 nm. Los nitritos se midieron por la técnica de formación de compuestos azo a una longitud de onda de 543 nm (APHA, 1995). Los nitratos fueron medidos por el método de UV a 2 diferentes longitudes de onda 220 nm (materia orgánica y nitratos) y 275 nm (materia orgánica). La resta de las 2 diferentes longitudes de onda corresponde a los nitratos (APHA, 1995). La alcalinidad se determinó por un método colorimétrico definido en el APHA (1995), utilizando verde de bromocresol como indicador y titulado con ácido sulfúrico a 0.02 N.



La concentración (mg/L) de  $\text{HCO}_3^-$  fue calculada por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{HCO}_3 = \frac{Ac[H^+]}{[H^+] + 2K_2} \quad (2)$$

Donde:

$\text{HCO}_3^-$  = concentración de bicarbonato (mg/L)

AC= alcalinidad (mg/L de  $\text{CaCO}_3$ -)

$H^+$ = pH log

$K_2$ =  $4.7 \times 10^{-11}$

La concentración (mg/L) de  $\text{CO}_3^{2-}$  fue calculada por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{CO}_3 = \frac{AcK_2}{[H^+] + 2K_2} \quad (3)$$

Donde:

$\text{CO}_3^{2-}$  = concentración de Carbonatos (mg/L)

AC= alcalinidad (mg/L de  $\text{CaCO}_3$ -)

$H^+$ = pH log

$K_2$ =  $4.7 \times 10^{-11}$

La concentración (mg/L) de  $\text{CO}_2$  fue calculada por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{CO}_2 = \frac{Ac[H^+]^2}{K_1([H^+] + 2K_2)} \quad (4)$$

Donde:

$\text{CO}_2$ = concentración de  $\text{CO}_2$  (mg/L)

AC= alcalinidad (mg/L de  $\text{CaCO}_3$ -)

$H^+$ = pH log

$K_1$ =  $4.3 \times 10^{-8}$

$K_2$ =  $4.7 \times 10^{-11}$

## 2.8 Control de la temperatura acumulada efectiva y fotoperiodo

La temperatura acumulada efectiva, es un método usado para la maduración de moluscos descrita por Mann (1979). Este método consiste en someter a los organismos a la acumulación de temperatura por un tiempo determinado para promover el desarrollo gonádico, partiendo de un cero biológico. El cero biológico es la temperatura a la cual los organismos no tienen la capacidad de iniciar la gametogénesis. Para la determinación de la temperatura acumulada efectiva se empleó la siguiente fórmula.

$$Y = \sum ti - \Theta \quad (5)$$

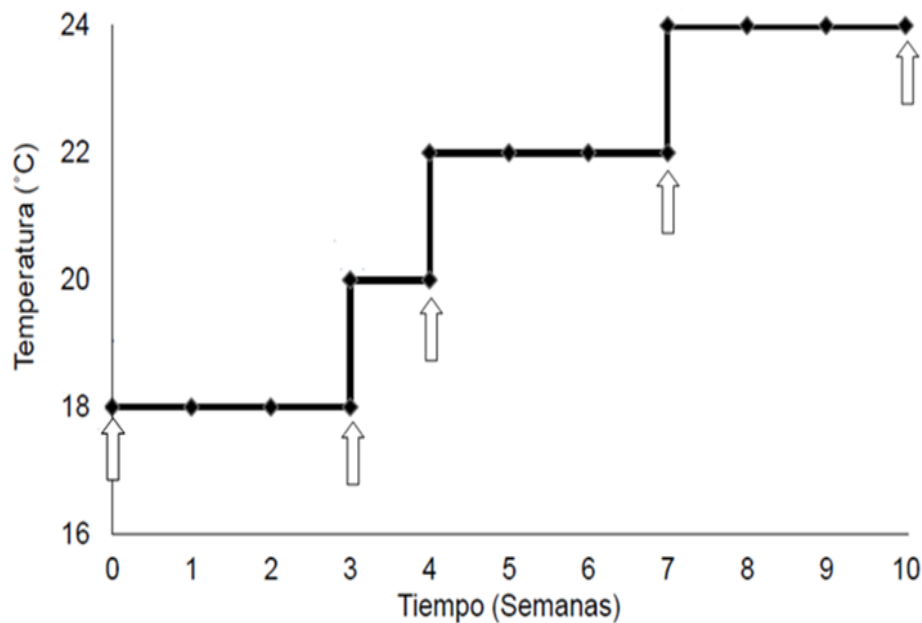
En donde:

Y = Temperatura acumulada efectiva (TAE)

ti = Temperatura diaria ( $t > \Theta$ )

$\Theta$  = Cero biológico (12°C para el género *Crassostrea*)

Los ostiones durante el acondicionamiento reproductivo, se sometieron por un periodo de 10 semanas a un gradiente de 4 diferentes temperaturas a 18 °C (3 semanas), a 20 °C (1 semana), a 22 °C (3 semanas) y a 24°C (3 semanas) (Figura 8). El fotoperiodo empleado para las 10 semanas de experimento fue de 16:8 (luz: oscuridad).



**Figura 8.** Perfil de temperaturas y el tiempo en semanas para la maduración del ostión Kumamoto en un sistema de recirculación acuícola. Las flechas indican las semanas en las que se realizaron fisiológicos como: consumo de oxígeno, excreción amoniacal e índice de condición.

## 2.9 Consumo de oxígeno y excreción amoniacal

El consumo de oxígeno y la excreción amoniacal de los organismos se determinaron a las semanas 0, 3, 4, 7 y 10 (Figura 7). En cada determinación se utilizaron 12 ostiones por tratamiento.

En la determinación del consumo de oxígeno se empleó la metodología descrita por Díaz-Iglesias *et al.* (2010). Los organismos a los cuales se les determino el consumo de oxígeno se tuvieron en ayuno por 24 horas para llevarlos a un estado basal. Posteriormente los ostiones se introdujeron a 4 cámaras metabólicas de 500 mL cada una (6 ostiones por cámara). Una quinta cámara fue usada como control. Las cámaras se llenaron con agua de mar filtrada y sometida a radiación ultra violeta (UV) para eliminar microorganismos. La temperatura del agua en las cámaras metabólicas se reguló por medio de un controlador de temperatura programable (1160S. VWR internacional, USA). La concentración de oxígeno disuelto de cada cámara metabólica se monitoreo por un electrodo polarográfico Strathkelvin (Strathkelvin Instruments, Lanarkshire, Escocia). Los electrodos eran controlados por un software de interfase de oxígeno (928, Strathkelvin Instruments, Lanarkshire, Escocia). Las mediciones se realizaron en un tiempo menor a 30 minutos a partir de la apertura de valvas para evitar un consumo mayor al 30% de la concentración de oxígeno en la cámara. El consumo de oxígeno de los ostiones se expresó en mg O<sub>2</sub>/g peso seco/h.



Figura 9. Equipo y para la determinación de consumo de oxígeno (A). Cámara metabólica y electrodo usados para la determinación de consumo de oxígeno (B).

La excreción amoniacal (U/W) producida por los ostiones en las cámaras metabólicas durante el consumo de oxígeno se determinó por medio de la técnica de Azul de Indofenol (APHA 1995). La excreción amoniacal de los organismos se expresó en mg NH<sub>4</sub>/g peso seco/h. La determinación de excreción amoniacal se llevó a cabo en forma paralela a la de consumo de oxígeno.

## 2.10 Índice de condición

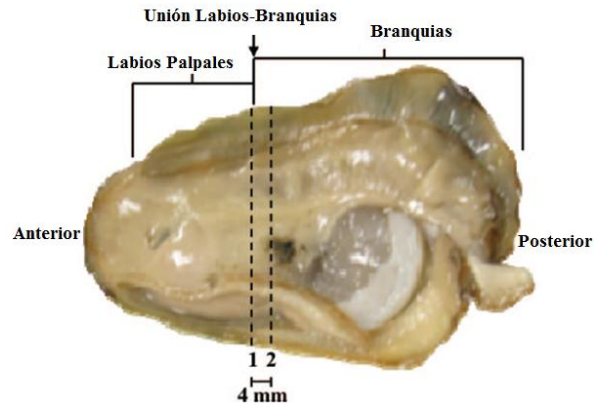
El índice de condición (IC) se determinó a las semanas 0, 3, 4, 7 y 10 (Figura 7). Para cada análisis se utilizaron los mismos 12 organismos por tratamiento previamente usados para la determinación del consumo de oxígeno y excreción amoniacal. Para la determinación del IC se utilizó la fórmula establecida por Lucas y Beninger (1985). El peso seco de los organismos se logró metiendo las valvas y el tejido metabólicamente activo por separado a una estufa a 60°C durante 48 horas, para su posterior pesado en una balanza de 0.001 gramos de precisión (Scout Pro SP601, Parsippany, USA).

$$IC = \frac{\text{Peso seco de la carne (g)}}{\text{Peso seco de la concha (g)}} \times 1000 \quad (6)$$

## 2.11 Histología

La determinación del desarrollo gonádico de los organismos durante el acondicionamiento reproductivo se llevó a cabo realizando cortes histológicos en las semanas 0, 3, 4, 7 y 10 (Figura 7). La obtención de muestras para cada uno de los análisis histológicos se utilizaron 5 organismos por tratamiento por periodo de muestreo. Al tejido metabólicamente activo de cada ostión se le realizó un corte transversal de 4 mm de espesor entre la unión de los labios pálpales y las branquias de acuerdo con la técnica descrita por Morales-Álamo y Mann (1989) (Figura 10). El tejido obtenido del corte se colocó en un casete histológico y se fijó con solución Davidson. La muestra se

deshidrato en forma secuencial con etanol al 70%, 96% y 100%, finalizando con benceno. Una vez que la muestra fue deshidratada la muestra se incluyó en parafina y posteriormente se hicieron los cortes histológicos con un micrótopo de 5  $\mu$  de espesor (American Optical). Los cortes se colocaron en un portaobjetos y se tiñeron con hematoxilina-eosina-floxina siguiendo la metodología descrita por Shaw y Battle (1957).



**Figura 10. Ubicación de la sección a cortar en tejido metabólicamente activo en el ostión para histología (líneas punteadas) (Quintana y Burnside, 2011).**

Las laminillas histológicas se examinaron con un microscopio Nikon (eclipse 80i, Melville, USA), y se fotografiaron con una cámara Evolution (VF cooled color, MediaCybernetics, Rockville, USA) conectada al microscopio. El grado de madurez de la gónada de los ostiones Kumamoto se determinó siguiendo la clasificación descrita por Steele y Mucahy (1999) (Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación del desarrollo gonádico de los machos y hembras del ostión Kumamoto**

Estadio	Descripción	
	Macho	Hembra
<b>Indiferenciado</b>	Acinos pequeños y contraídos. Presencia de algunas células sexuales tempranas, probablemente poco visibles.	
<b>Desarrollo</b>	Muchos Acinos pequeños y contraídos. Espermatogonias y espermatocitos numerosos, puede o no haber espermatozoides, si hay presencias de espermatozoides las colas están en dirección del limen del acino, en el centro del acino, presencia de tejido conectivo	Ovogonias presentes, no hay ovocitos libres. Tejido conectivo abundante
<b>Maduro</b>	El tejido inter-folicular y epitelio germinal no son evidentes. Los acinos están llenos de espermatozoides con las colas orientadas hacia el lumen del acino	Los acinos están llenos de ovocitos, los ovocitos libres con núcleo y nucléolo visibles
<b>Desovado</b>	Los acinos vacíos o parcialmente vacíos, si hay presencia de espermatozoides están poco compactados en los acinos o en los conductos de esperma. El tejido conectivo crece rápidamente entre los acinos, citólisis de las células germinales presentes y grandes cantidades de fagocitos	Los ovocitos libres pero poco compactados. Las paredes de los acinos aparentemente rotas, acinos vacíos y presencia de fagocitos
<b>Reabsorción</b>	El tejido conectivo es aparente en los acinos, infiltración de fagocitos en los acinos	El tejido conectivo es aparente en los acinos, los ovocitos pueden ser vistos en proceso de citólisis. Presencia de fagocitos en los acinos

## 2.12 Índice gonadosomático

El índice gonadosomático se calculó por medio de la relación entre el área de la gónada y el área de la glándula digestiva. Este análisis se llevó a cabo tomando una fotografía del corte histológico de los organismos, en la cual se observaba la gónada y la glándula digestiva. Posteriormente la fotografía se analizó por medio del paquete informático Image J 1.48v (National Institutes of health, USA). En la glándula digestiva, se trazó el área ocupada por la gónada y posteriormente se trazó el área ocupada por la glándula digestiva (Figura 11), con los datos obtenidos se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Índice gonadosomático} = \frac{\text{área cubierta por la gónada}}{\text{área cubierta por la glándula digestiva}} * 100 \quad (7)$$

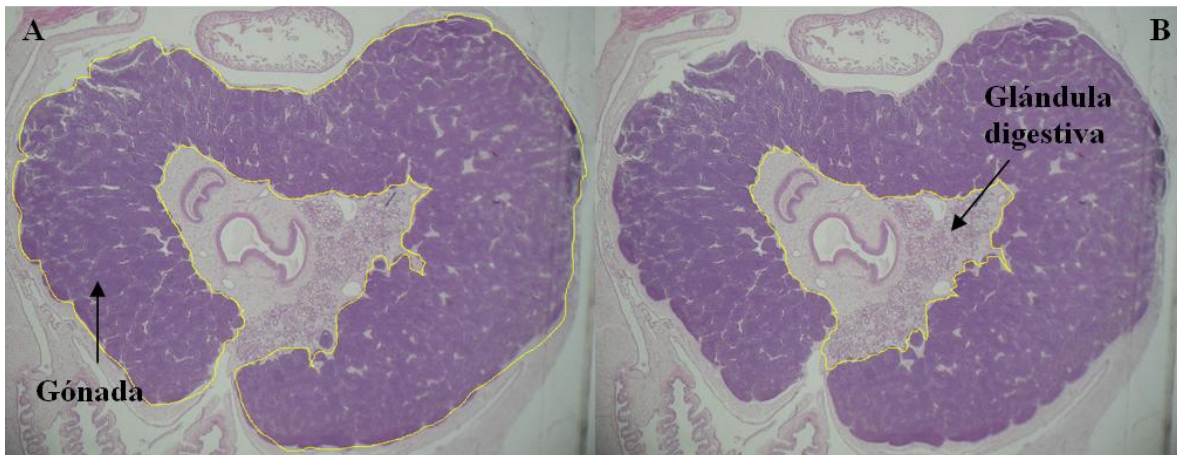


Figura 11. Trazado del área ocupada por la gónada en un ostión Kumamoto (A). Trazado del área ocupada por la glándula digestiva en un ostión Kumamoto (B)

## 2.13 Fertilización

Al finalizar el periodo del acondicionamiento reproductivo se tomaron 20 organismos por tratamiento. Los ostiones se abrieron para tomar una muestra de la gónada y determinar el sexo del organismo observando la gónada al microscopio. Posteriormente se seleccionaron la misma proporción de hembras y machos por tratamiento. El desove

se llevó a cabo por el método de raspado para la obtención de los gametos filtrándose a  $40\ \mu$  para retirar las impurezas (Helm *et al.*, 2004). Los espermatozoides se contaron de manera directa con una cámara de Neubauer y los ovocitos en una cámara de Sedgwick Rafter con un microscopio Olympus (CX31, Florida, USA). Una vez conocida la concentración de espermatozoides y ovocitos se procedió a la fertilización. Los reproductores que se acondicionaron en los SRA control se agregaron  $5.46 \times 10^5$  ovocitos (133 mL) y  $3.37 \times 10^6$  espermias (1.3 mL), aforando a un volumen de 2.5 L. En los reproductores que se acondicionaron en los SRA con reactor de calcio se mezclaron  $7.93 \times 10^5$  ovocitos (133 mL) y  $6.66 \times 10^6$  espermias (250  $\mu$ L), aforando a un volumen 5.0 L.

Veinticuatro horas después de la fertilización se contaron y midieron (largo y ancho ( $\mu$ )) las larvas D. Las larvas D se contabilizaron en una cámara Sedgwick Rafter, en un 1 mL de muestra. Para la medición del largo y ancho de los organismos, se midieron 90 larvas por tratamiento en un microscopio Nikon (eclipse 80i, Melville, USA) y se fotografiaron con una cámara Evolution (VF cooled color, MediaCybernetics, Rockville, USA).

## **2.14 Mortalidad**

La tasa de mortalidad se hizo todos los días en cada SRA durante las 10 semanas del periodo de acondicionamiento reproductivo y se extrajeron los organismos muertos para no afectar la dinámica de la calidad del agua.

## **2.15 Análisis estadístico**

Todos los datos fueron sometidos a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza. Para la comparación entre los tratamientos de cada una de las variables de la calidad del agua, la comparación de las variables de la calidad del agua en las cuatro diferentes temperaturas del acondicionamiento reproductivo de cada tratamiento, el índice de condición, el largo y ancho de las larvas D y la comparación del índice de condición por tratamiento durante las diferentes temperaturas se llevó a cabo un

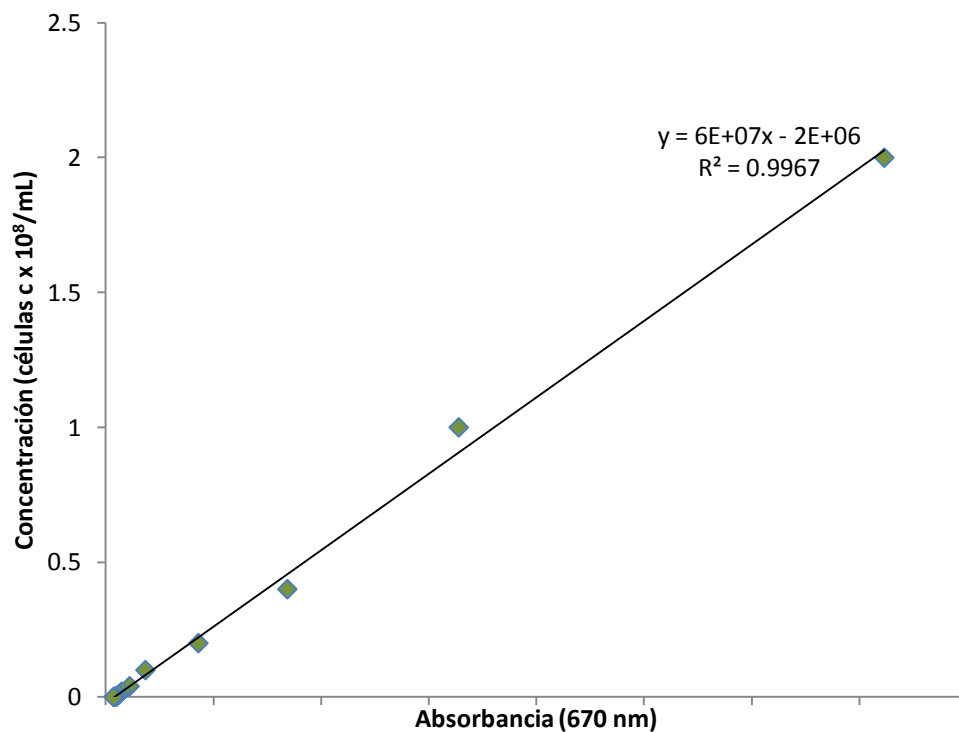


análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ . Cuando se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó una prueba *a posteriori* Tukey. En el consumo de oxígeno, la excreción amoniacal, la relación atómica o: n y la concentración espermática y de ovocitos se utilizó una prueba t con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ . Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico Statistica versión 7.

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Alimentación durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto en un SRA

La determinación diaria de la concentración de microalgas se calculó con la fórmula  $y = 6 \times 10^7 x + 2 \times 10^6$ , que se obtuvo a partir de la de regresión lineal entre la concentración de microalgas (eje y) con la absorbancia (eje x) (Figura 12).



**Figura 12.** Curva de calibración para determinar la concentración de microalgas presentes en los sistemas de recirculación acuícolas para el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto.

No se detectaron diferencias significativas en la concentración celular de alimento en los SRA control y los SRA con reactor de calcio a los 18°C ( $P=0.297$ ), 20°C ( $P=0.608$ ) y 24°C ( $P=0.382$ ). La única temperatura en la que se detectaron diferencias significativas entre ambos tratamientos durante el acondicionamiento reproductivo fue a los 22°C ( $P=0.036$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2. Concentración celular del alimento de los SRA control y los SRA con reactor de calcio en las diferentes temperaturas del acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto. Letras diferentes a>b indican diferencias significativas entre los tratamientos.**

Temperatura (°C)	Concentración de alimento (células/mL)	
	Control	Reactor
18	1.02x10 <sup>6</sup> (±3.10 x10 <sup>5</sup> ) <sup>a</sup>	9.52 x10 <sup>5</sup> (±4.04 x10 <sup>5</sup> ) <sup>a</sup>
20	9.37x10 <sup>5</sup> (±3.16 x10 <sup>5</sup> ) <sup>a</sup>	1.02 x10 <sup>6</sup> (±7.59 x10 <sup>5</sup> ) <sup>a</sup>
22	8.73 x10 <sup>5</sup> (±4.07 x10 <sup>5</sup> ) <sup>a</sup>	6.62 x10 <sup>5</sup> (±3.60 x10 <sup>5</sup> ) <sup>b</sup>
24	9.08 x10 <sup>5</sup> (±1.61 x10 <sup>5</sup> ) <sup>a</sup>	8.08 x10 <sup>5</sup> (±3.90 x10 <sup>5</sup> ) <sup>a</sup>

## 3.2 Calidad del agua durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto en un SRA

### 3.21 Calidad del agua 18°C

No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P = 0.349$ ) en la concentración de OD, en la salinidad ( $P = 0.974$ ), el NAT ( $P = 0.737$ ) y la temperatura ( $P = 0.202$ ). Se detectaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos en la concentración de los NO<sub>2</sub> ( $P = 0.000$ ) y los NO<sub>3</sub> ( $P = 0.000$ ) (Tabla 4). En el sistema carbón-carbonatos se detectaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos en el pH ( $P < 0.0001$ ), en los CO<sub>3</sub><sup>-2</sup> ( $P < 0.0001$ ), los HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ( $P < 0.0001$ ), el CO<sub>2</sub> ( $P = 0.000$ ) y la alcalinidad ( $P < 0.0001$ ) (Tabla 3).

**Tabla 3. Variables de la calidad del agua entre los SRA control y los SRA con reactor de calcio a 18°C durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto. Letras diferentes a>b indican diferencias significativas entre los tratamientos.**

Variable	18°C	
	Control (mg/L)	Reactor (mg/L)
OD	6.31 (±0.33) <sup>a</sup>	6.37 (±0.35) <sup>a</sup>
Salinidad	36.90 (±2.32) <sup>a</sup>	36.9 (±2.05) <sup>a</sup>
Temperatura	18.82(±0.90) <sup>a</sup>	18.65(±1.36) <sup>a</sup>
NAT	0.06 (±0.12) <sup>a</sup>	0.05 (± 0.12) <sup>a</sup>
NO <sub>2</sub>	0.02 (±0.02) <sup>a</sup>	0.07 (±0.16) <sup>b</sup>
NO <sub>3</sub>	5.78 (±1.30) <sup>a</sup>	6.42 (±1.86) <sup>b</sup>
pH	7.91 (±0.04) <sup>a</sup>	8.09 (±0.07) <sup>b</sup>
CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	0.0074 (±0.001) <sup>a</sup>	0.0129 (±0.003) <sup>b</sup>
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	137.21 (±20.22) <sup>a</sup>	236.97 (±59.27) <sup>b</sup>
CO <sub>2</sub>	3.85 (±0.59) <sup>a</sup>	4.44 (±1.19) <sup>b</sup>
Alcalinidad	137.50 (±18.75) <sup>a</sup>	240.74 (±59.51) <sup>b</sup>

### 3.22 Calidad del agua 20°C

No se detectaron diferencias significativas en la concentración entre los tratamientos en la concentración de OD ( $P = 0.887$ ), en la salinidad ( $P = 0.131$ ), en el NAT ( $P = 0.325$ ) y en la temperatura ( $P = 0.396$ ) (Tabla 4). Se detectaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos en la concentración de  $\text{NO}_2$  ( $P = 0.000$ ) y  $\text{NO}_3$  ( $P = 0.116$ ). En el sistema carbón-carbonatos se detectaron diferencias altamente significativas en los tratamientos en el pH ( $P < 0.0001$ ), en los  $\text{CO}_3^{-2}$  ( $P = 0.000$ ), los  $\text{HCO}_3^-$  ( $P = 0.000$ ), el  $\text{CO}_2$  ( $P = 0.000$ ) y la alcalinidad ( $P = 0.000$ ) (Tabla 4).

**Tabla 4. Variables de la calidad del agua entre los SRA control y los SRA con reactor de calcio a 20°C durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto. Letras diferentes a>b indican diferencias significativas entre los tratamientos.**

<b>20°C</b>		
<b>Variable</b>	<b>Control</b>	<b>Reactor</b>
OD	6.31 ( $\pm 0.13$ ) <sup>a</sup>	6.30 ( $\pm 0.17$ ) <sup>a</sup>
Salinidad	38.82 ( $\pm 1.70$ ) <sup>a</sup>	39.42 ( $\pm 1.31$ ) <sup>a</sup>
Temperatura	20.21( $\pm 0.58$ ) <sup>a</sup>	20.38( $\pm 0.98$ ) <sup>a</sup>
NAT	0.0381 ( $\pm 0.0564$ ) <sup>a</sup>	0.0256 ( $\pm 0.0397$ ) <sup>a</sup>
$\text{NO}_2$	0.0392 ( $\pm 0.0201$ ) <sup>a</sup>	0.0214 ( $\pm 0.0079$ ) <sup>b</sup>
$\text{NO}_3$	7.29 ( $\pm 1.82$ ) <sup>a</sup>	8.10 ( $\pm 2.16$ ) <sup>a</sup>
pH	7.94 ( $\pm 0.019$ ) <sup>a</sup>	8.04 ( $\pm 0.045$ ) <sup>b</sup>
$\text{CO}_3^{-2}$	0.0084 ( $\pm 0.0005$ ) <sup>a</sup>	0.0121 ( $\pm 0.0018$ ) <sup>b</sup>
$\text{HCO}_3^-$	156.13 ( $\pm 9.99$ ) <sup>a</sup>	222.96 ( $\pm 33.70$ ) <sup>b</sup>
$\text{CO}_2$	4.12 ( $\pm 0.26$ ) <sup>a</sup>	4.59 ( $\pm 0.41$ ) <sup>b</sup>
Alcalinidad	157.42 ( $\pm 10.10$ ) <sup>a</sup>	225.35 ( $\pm 34.36$ ) <sup>b</sup>

### 3.23 Calidad del agua 22°C

No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos en la concentración de OD ( $P = 0.296$ ), en el NAT ( $P = 0.766$ ), los  $\text{NO}_3$  ( $P = 0.258$ ) y la temperatura ( $P = 0.178$ ). Se detectaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos en la salinidad ( $P = 0.0039$ ) y los nitritos  $\text{NO}_2$  ( $P = 0.000$ ) (Tabla 5).

En el sistema carbón-carbonatos se detectaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos en el pH ( $P < 0.0001$ ), los  $\text{CO}_3^{-2}$  ( $P < 0.0001$ ), los  $\text{HCO}_3$  ( $P = 0.000$ ), el  $\text{CO}_2$  ( $P = 0.000$ ) y la alcalinidad ( $P = 0.000$ ) (Tabla 5).

**Tabla 5. Variables de la calidad del agua entre los SRA control y los SRA con reactor de calcio a 22°C durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto. Letras diferentes a>b indican diferencias significativas entre los tratamientos.**

<b>22°C</b>		
<b>Variable</b>	<b>Control</b>	<b>Reactor</b>
OD	5.76 ( $\pm 0.39$ ) <sup>a</sup>	5.71 ( $\pm 0.20$ ) <sup>a</sup>
Salinidad	36.92 ( $\pm 1.96$ ) <sup>a</sup>	37.98 ( $\pm 2.29$ ) <sup>b</sup>
Temperatura	22.07 ( $\pm 0.70$ ) <sup>a</sup>	22.22 ( $\pm 0.62$ ) <sup>a</sup>
NAT	0.0554 ( $\pm 0.1024$ ) <sup>a</sup>	0.0492 ( $\pm 0.1462$ ) <sup>a</sup>
NO <sub>2</sub>	0.0467 ( $\pm 0.0244$ ) <sup>a</sup>	0.0247 ( $\pm 0.0130$ ) <sup>b</sup>
NO <sub>3</sub>	8.87 ( $\pm 1.90$ ) <sup>a</sup>	8.45 ( $\pm 2.39$ ) <sup>a</sup>
pH	7.95 ( $\pm 0.04$ ) <sup>a</sup>	8.03 ( $\pm 0.04$ ) <sup>b</sup>
CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	0.0080 ( $\pm 0.0011$ ) <sup>a</sup>	0.0115 ( $\pm 0.0019$ ) <sup>b</sup>
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	163.80 ( $\pm 14.19$ ) <sup>a</sup>	191.03 ( $\pm 27.64$ ) <sup>b</sup>
CO <sub>2</sub>	4.23 ( $\pm 0.46$ ) <sup>a</sup>	4.64 ( $\pm 0.58$ ) <sup>b</sup>
Alcalinidad	165 ( $\pm 14.35$ ) <sup>a</sup>	213.65 ( $\pm 36.99$ ) <sup>b</sup>

### 3.24 Calidad del agua 24°C

No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos en el OD ( $P = 0.296$ ), en el NAT ( $P = 0.766$ ) y la temperatura ( $P = 0.631$ ). Se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos en los NO<sub>2</sub> ( $P = 0.000$ ), los NO<sub>3</sub> ( $P = 0.002$ ) y la salinidad ( $P = 0.003$ ) (Tabla 7). En el sistema carbón-carbonatos se detectaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos en el pH ( $P < 0.0001$ ), los CO<sub>3</sub><sup>-2</sup> ( $P = 0.000$ ), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ( $P = 0.000$ ), el CO<sub>2</sub> ( $P = 0.083$ ) y la alcalinidad ( $P = 0.000$ ) (Tabla 6).

**Tabla 6. Variables de la calidad del agua entre los SRA control y los SRA con reactor de calcio a 24°C durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas entre los tratamientos.**

<b>24°C</b>		
<b>Variable</b>	<b>Control</b>	<b>Reactor</b>
OD	5.58 ( $\pm 0.18$ ) <sup>a</sup>	5.72 ( $\pm 0.28$ ) <sup>b</sup>
Salinidad	35.25 ( $\pm 2.33$ ) <sup>a</sup>	36.04 ( $\pm 3.54$ ) <sup>a</sup>
Temperatura	24.14 ( $\pm 0.96$ ) <sup>a</sup>	24.05 ( $\pm 0.91$ ) <sup>a</sup>
NAT	0.0286 ( $\pm 0.0443$ ) <sup>a</sup>	0.0298 ( $\pm 0.0783$ ) <sup>a</sup>
NO <sub>2</sub>	0.0519 ( $\pm 0.0239$ ) <sup>a</sup>	0.0156 ( $\pm 0.0064$ ) <sup>b</sup>
NO <sub>3</sub>	12.72 ( $\pm 2.79$ ) <sup>a</sup>	10.82 ( $\pm 3.24$ ) <sup>b</sup>
pH	8.02 ( $\pm 0.05$ ) <sup>a</sup>	8.06 ( $\pm 0.14$ ) <sup>b</sup>
CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	0.0080 ( $\pm 0.0005$ ) <sup>a</sup>	0.0087 ( $\pm 0.0004$ ) <sup>b</sup>
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	147.40 ( $\pm 9.85$ ) <sup>a</sup>	160.41 ( $\pm 8.93$ ) <sup>b</sup>
CO <sub>2</sub>	3.24 ( $\pm 0.40$ ) <sup>a</sup>	3.37 ( $\pm 0.30$ ) <sup>a</sup>
Alcalinidad	148.88 ( $\pm 10.01$ ) <sup>a</sup>	162.38 ( $\pm 8.78$ ) <sup>b</sup>

### **3.25 Comparación de las variables de la calidad del agua en las cuatro diferentes temperaturas del acondicionamiento reproductivo de cada tratamiento**

No se detectaron diferencias significativas en la concentración de NAT en los SRA control ( $P = 0.138$ ) durante las 10 semanas de acondicionamiento reproductivo. No se detectaron diferencias significativas ( $P = 0.417$ ) en el NAT en los SRA con reactor de calcio durante el periodo de acondicionamiento reproductivo. Se detectaron diferencias significativas ( $P = 0.000$ ) en los NO<sub>2</sub> en los SRA control durante las diferentes temperaturas. Se detectaron diferencias significativas ( $P = 0.001$ ) en los NO<sub>2</sub> en los SRA con reactor de calcio durante el acondicionamiento reproductivo. Se detectaron diferencias significativas en los NO<sub>3</sub> ( $P < 0.0001$ ) en el tratamiento control durante las 10 semanas de acondicionamiento reproductivo. Se detectaron diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) en los NO<sub>3</sub> en el tratamiento con reactor de calcio en las cuatro diferentes temperaturas durante las 10 semanas del acondicionamiento reproductivo. (Tabla 7).

Se detectaron diferencias significativas ( $P = 0.000$ ) en la salinidad en los SRA control durante el acondicionamiento reproductivo. Se detectaron diferencias significativas ( $P = 0.000$ ) en la salinidad en los SRA con reactor de calcio durante las 10 semanas de

acondicionamiento reproductivo. Se detectaron diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) en la concentración de OD en los SRA control durante el acondicionamiento reproductivo. Se detectaron diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) en el OD en los SRA con reactor de calcio durante las 10 semanas del acondicionamiento reproductivo. Se detectaron diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) en las temperaturas en los SRA control durante el acondicionamiento reproductivo. Se presentaron diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) en los SRA con reactor de calcio durante las 4 diferentes temperaturas del acondicionamiento reproductivo (Tabla 7).

**Tabla 7. Variables de la calidad del agua en las cuatro diferentes temperaturas durante el acondicionamiento reproductivo de cada tratamiento con SRA control y SRA con reactor de calcio. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas entre las temperaturas.**

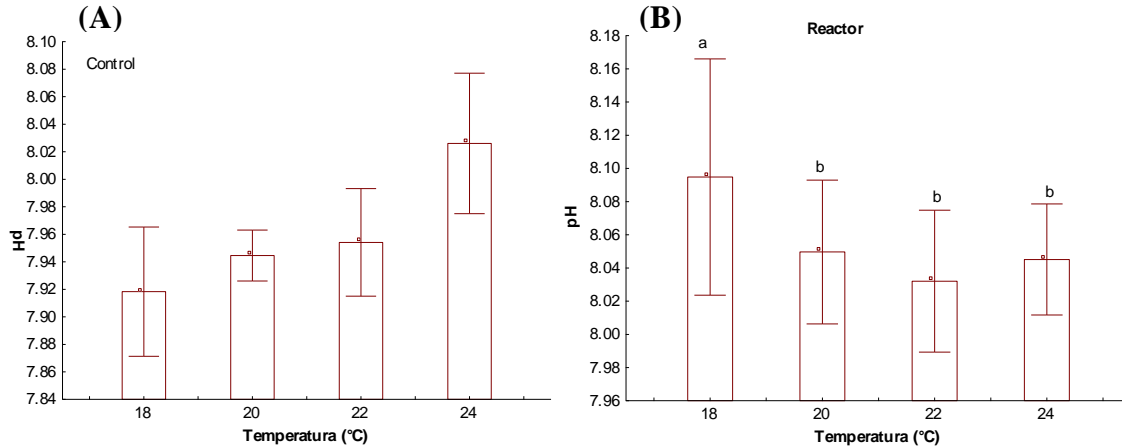
Variable	Tratamiento	Temperatura °C			
		18	20	22	24
NAT	Control	0.06(±0.12) <sup>a</sup>	0.03(±0.05) <sup>a</sup>	0.05(±0.10) <sup>a</sup>	0.02(±0.04) <sup>a</sup>
	Reactor	0.05(±0.12) <sup>a</sup>	0.02(0.03±) <sup>a</sup>	0.04(0.14±) <sup>a</sup>	0.02(±0.07) <sup>a</sup>
NO <sub>2</sub>	Control	0.02(±0.02) <sup>a</sup>	0.03(±0.02) <sup>b</sup>	0.04(±0.02) <sup>bc</sup>	0.05(±0.02) <sup>c</sup>
	Reactor	0.07(±0.16) <sup>a</sup>	0.02(±0.007) <sup>ab</sup>	0.02(±0.01) <sup>b</sup>	0.01(±0.006) <sup>b</sup>
NO <sub>3</sub>	Control	5.72(±1.30) <sup>a</sup>	7.29(±1.85) <sup>b</sup>	8.87(±1.90) <sup>c</sup>	12.72(±2.79) <sup>d</sup>
	Reactor	6.42(±1.86) <sup>a</sup>	8.10(±2.16) <sup>b</sup>	8.45(±2.39) <sup>b</sup>	10.82(±3.24) <sup>c</sup>
Salinidad	Control	36.90(±2.32) <sup>a</sup>	38.82(±1.70) <sup>b</sup>	36.92(±1.96) <sup>a</sup>	35.25(±2.33) <sup>c</sup>
	Reactor	36.9(±2.05) <sup>a</sup>	39.4(±1.31) <sup>b</sup>	37.98(±2.29) <sup>c</sup>	36.04(±3.54) <sup>a</sup>
OD	Control	6.31(±0.33) <sup>a</sup>	6.31(±0.13) <sup>a</sup>	5.76(±0.39) <sup>b</sup>	5.58(±0.18) <sup>c</sup>
	Reactor	6.37(±0.35) <sup>a</sup>	6.30(±0.17) <sup>a</sup>	5.71(±0.20) <sup>b</sup>	5.72(±0.28) <sup>b</sup>
Temperatura	Control	18.82(±0.90) <sup>a</sup>	20.21(±0.58) <sup>b</sup>	22.07(±0.70) <sup>c</sup>	24.14(±0.96) <sup>d</sup>
	Reactor	18.65(±1.36) <sup>a</sup>	20.38(±0.98) <sup>b</sup>	22.22(±0.62) <sup>c</sup>	24.05(±0.91) <sup>d</sup>

### 3.26 pH

Se detectaron diferencias altamente significativas ( $P < 0.0001$ ) en el pH de los SRA control durante la fase experimental entre las diferentes temperaturas. La media del pH durante las 10 semanas de acondicionamiento reproductivo en los SRA control fue de 7.95 (±0.06). El pH más alto (8.11) se registró durante el periodo de maduración correspondiente a los 24 °C. El menor pH se observó (7.79) los 18°C (Figura 13).

Se detectaron diferencias altamente significativas ( $P = 0.000$ ) en el pH de los SRA con reactor de calcio durante el acondicionamiento reproductivo a las diferentes

temperaturas. La media del pH durante las 10 semanas de acondicionamiento en los sistemas con reactor de calcio fue de 8.06 ( $\pm 0.06$ ). El valor mínimo (7.88) y el valor máximo (8.28) del pH fueron registrados a los 18°C (Figura 13).



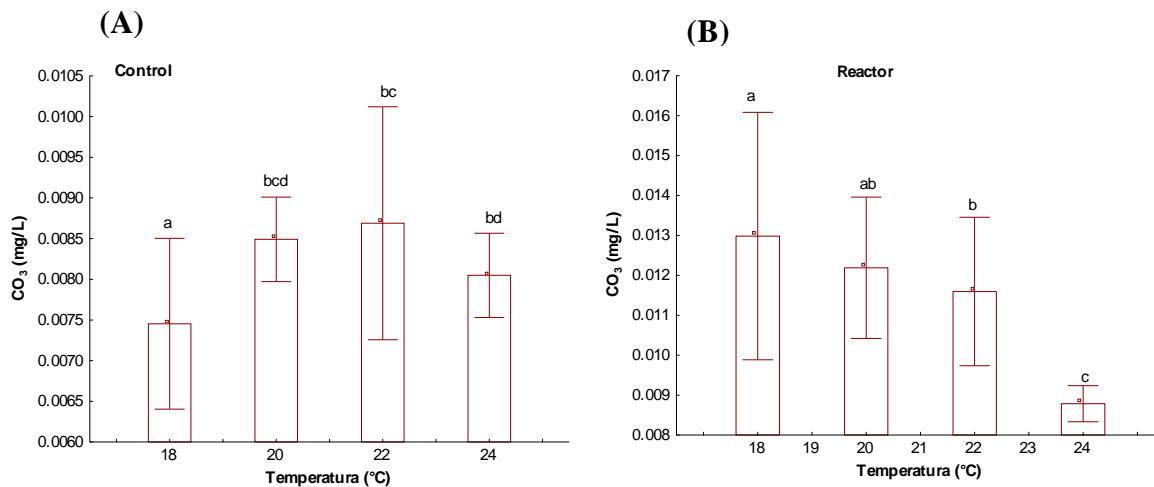
**Figura 13.** El pH (media  $\pm$  desviación estándar) durante las 10 semanas del acondicionamiento reproductivo del ostión *Crassostrea sikamea* en un SRA a diferentes temperaturas. La gráfica derecha (A) representa los SRA control y la gráfica izquierda (B) los SRA con reactor de calcio. Letras diferentes a>b>c indican diferencias significativas entre las temperaturas.

### 3.27 $\text{CO}_3^{-2}$

Se detectaron diferencias altamente significativas ( $P < 0.0001$ ) en la concentración de  $\text{CO}_3^{-2}$  en los SRA control en las diferentes temperaturas. La concentración media durante las 10 semanas de acondicionamiento reproductivo para los sistemas control fue de  $0.0080 \pm 0.0011$  mg/L. La concentración mínima (0.000917 mg/L) se observó a los 18°C mientras que la concentración máxima (0.012452 mg/L) se exhibió a los 22°C (Figura 14).

Se detectaron diferencias altamente significativas ( $P = 0.000$ ) en la concentración de  $\text{CO}_3^{-2}$  en los SRA con el reactor de calcio durante las 10 semanas de experimento. La concentración media de  $\text{CO}_3^{-2}$  durante la fase experimental fue de  $0.0117 (\pm 0.0029)$  mg/L. La mínima concentración de  $\text{CO}_3^{-2}$  (0.001079 mg/L) se registró a los 22°C y la máxima (0.021698 mg/L) a los 18 °C (Figura 14).



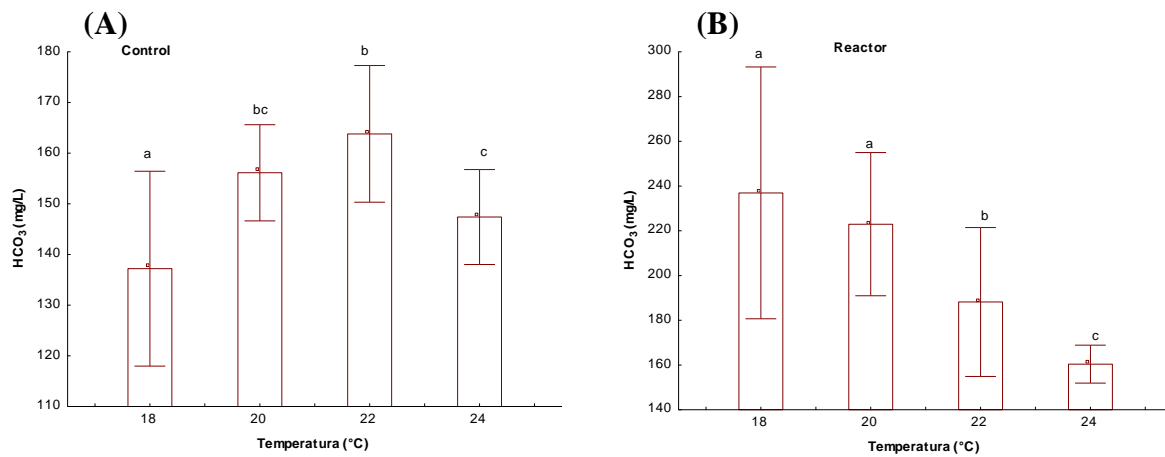


**Figura 14. Comportamiento de la concentración de  $\text{CO}_3^-$  (media  $\pm$  desviación estándar) durante las 10 semanas del acondicionamiento reproductivo del ostión *Crassostrea sikamea* en un SRA a diferentes temperaturas. La gráfica izquierda (A) representa los SRA control y la derecha gráfica (B) los SRA con reactor de calcio. Letras diferentes a>b>c>d indican diferencias significativas entre las temperaturas.**

### 3.28 $\text{HCO}_3^-$

Se detectaron diferencias altamente significativas ( $P < 0.0001$ ) en la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  durante el acondicionamiento reproductivo en los SRA control en las diferentes temperaturas. La concentración media de  $\text{HCO}_3^-$  durante las diferentes temperaturas fue de 148.54 ( $\pm 19.40$ ) mg/L. La mínima concentración (99.13 mg/L) se exhibió a los 22°C y la máxima (228.1744 mg/L) a los 18°C (Figura 15).

Se detectaron diferencias altamente significativas ( $P < 0.0001$ ) en la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  en los SRA con reactor de calcio durante las 10 semanas de la fase experimental. La concentración media de  $\text{HCO}_3^-$  durante el acondicionamiento reproductivo fue de 209.99 ( $\pm 52.69$ ) mg/L. La menor concentración (99.13 mg/L) se presentó a los 22°C y la mayor (395.2141 mg/L) a los 18°C (Figura 15).



**Figura 15. Comportamiento de la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  (media  $\pm$  desviación estándar) durante las 10 semanas del acondicionamiento reproductivo del ostión *Crassostrea sikamea* en un SRA a diferentes temperaturas. La gráfica izquierda (A) representa los sistemas de SRA control y la gráfica derecha (B) los SRA con reactor de calcio. Letras diferentes a>b>c indican diferencias significativas entre las temperaturas.**

### 3.29 CO<sub>2</sub>

Se detectaron diferencias altamente significativas ( $P < 0.0001$ ) en la concentración de CO<sub>2</sub> en los SRA control durante las diferentes temperaturas. La concentración media de CO<sub>2</sub> durante las 10 semanas de acondicionamiento fue 3.68 ( $\pm 0.60$ ) mg/L. La concentración mínima de CO<sub>2</sub> (2.47 mg/L) se registró a los 18°C y la máxima (6.23 mg/L) a los 22 °C (Figura 16).

Se detectaron diferencias altamente significativas ( $P < 0.0001$ ) en la concentración de CO<sub>2</sub> de los SRA con reactor de calcio entre las temperaturas durante las 10 semanas de acondicionamiento reproductivo. La concentración media de CO<sub>2</sub> para los SRA con reactor de calcio en las diferentes temperaturas fue de 4.33 ( $\pm 0.98$ ) mg/L. Las concentración mínima (2.69 mg/L) y máxima se registraron a los 18°C (Figura 16).

### 3.30 Alcalinidad

Se detectaron diferencias altamente significativas ( $P < 0.0001$ ) en la alcalinidad de los SRA control entre las diferentes temperaturas. La concentración media durante las 10 semanas de acondicionamiento reproductivo fue de 149.48 ( $\pm 19.06$ ) mg/L de CaCO<sub>3</sub>. La mínima concentración (100 mg/L de CaCO<sub>3</sub>) se registró a los 18°C y la máxima (230 mg/L de CaCO<sub>3</sub>) a los 22 °C (Figura 17).

Se detectaron diferencias altamente significativas ( $P < 0.0001$ ) en la alcalinidad en los SRA con reactor de calcio entre las diferentes temperaturas durante las 10 semanas de acondicionamiento reproductivo. La concentración media para los SRA con reactor de calcio durante las diferentes temperaturas fue de 218.96 ( $\pm 51.96$ ) mg/L de  $\text{CaCO}_3$ . La mínima concentración (140 mg/L de  $\text{CaCO}_3$ ) se registró a los 24°C y la máxima (400 mg/L de  $\text{CaCO}_3$ ) a los 18°C (Figura 17).

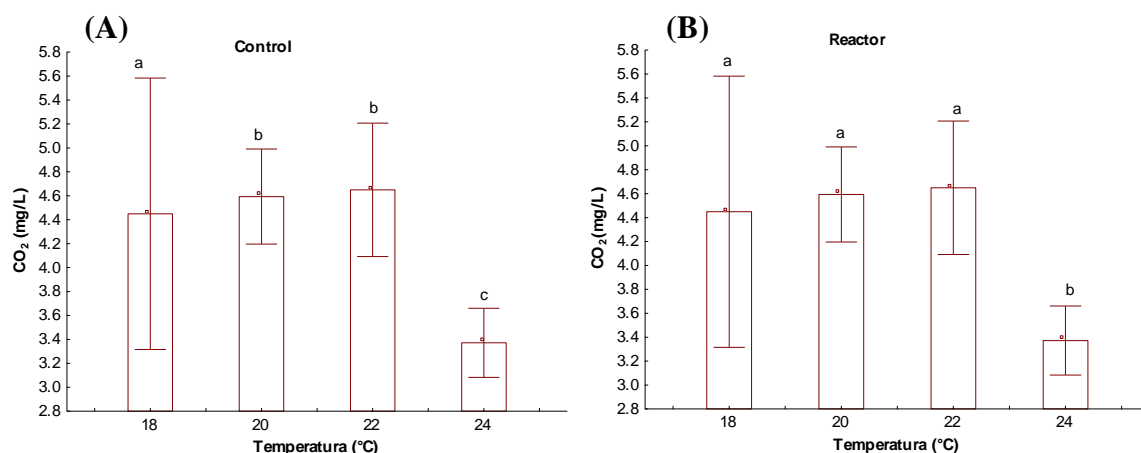


Figura 16. Comportamiento de la concentración de los  $\text{CO}_2$  (media  $\pm$  desviación estándar) durante las 10 semanas del acondicionamiento reproductivo del ostión *Crassostrea sikamea* en un SRA a diferentes temperaturas. La gráfica izquierda (A) representa los SRA control y la gráfica derecha (B) los SRA con reactor de calcio. Letras diferentes a>b>c indican diferencias significativas entre las temperaturas.

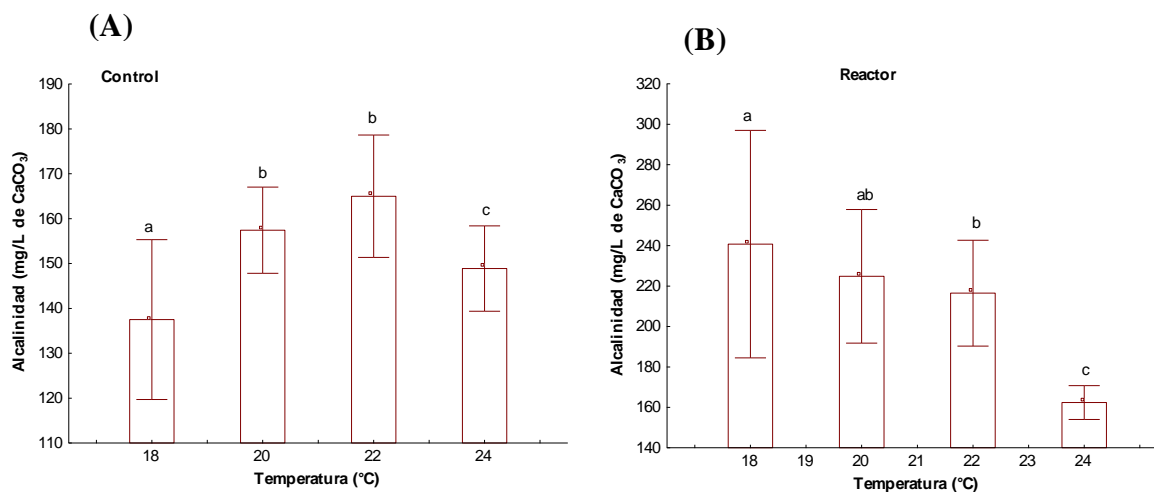


Figura 17. Comportamiento de la concentración de la alcalinidad (media  $\pm$  desviación estándar) durante las 10 semanas del acondicionamiento reproductivo del ostión *Crassostrea sikamea* en un SRA a diferentes temperaturas. La gráfica izquierda (A) representa los SRA control y la gráfica derecha (B) los SRA con reactor de calcio. Letras diferentes a>b>c indican diferencias significativas entre las temperaturas.

### **3.3 Consumo de oxígeno y excreción amoniacal del ostión Kumamoto durante su acondicionamiento reproductivo en un SRA**

#### **3.31 Consumo de oxígeno**

No se detectaron diferencias significativas ( $P = 0.758$ ) en el consumo de oxígeno a los 18°C entre los tratamientos. No se detectaron diferencias significativas ( $P = 0.659$ ) en el consumo de oxígeno a los 20°C entre los SRA control y los SRA con reactor de calcio.

Se detectaron diferencias significativas ( $P = 0.001$ ) en el consumo de oxígeno a los 22°C entre los tratamientos (Tabla 8). No fue posible determinar el consumo de oxígeno a los 24°C debido a problemas técnicos con el equipo.

#### **3.32 Comparación del consumo de oxígeno por tratamientos durante las diferentes temperaturas**

Se detectaron diferencias significativas ( $P = 0.000$ ) en el consumo de oxígeno en los SRA control a los 18°C y 20°C con respecto al consumo de oxígeno a los 22°C. Se detectaron diferencias significativas ( $P = 0.000$ ) en el consumo de oxígeno en los SRA con reactor de calcio entre los 18°C y 20°C con el consumo de oxígeno de los organismos a los 22°C (Figura 18).

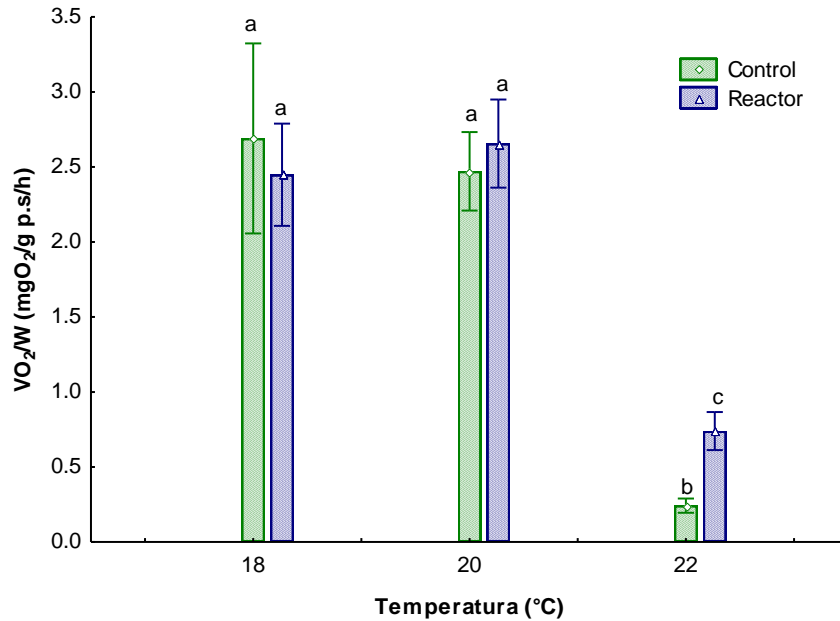


Figura 18. Consumo de oxígeno del ostión Kumamoto durante su acondicionamiento reproductivo por tratamientos durante las diferentes temperaturas. Letras diferentes a>b>c indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 8. Consumo de oxígeno del ostión Kumamoto durante su acondicionamiento en SRA control y un SRA con reactor de calcio a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Consumo de oxígeno (VO <sub>2</sub> /W (mgO <sub>2</sub> /g p.s/H)	
	Control	Reactor
18	2.69 (±2.31) <sup>a</sup>	2.45 (±1.19) <sup>a</sup>
20	2.47 (±0.95) <sup>a</sup>	2.66 (±1.07) <sup>a</sup>
22	0.24 (±0.17) <sup>a</sup>	0.74 (±0.42) <sup>b</sup>

### 3.3 Excreción amoniaca del ostión Kumamoto durante su acondicionamiento reproductivo en un SRA a diferentes temperaturas

No fue posible determinar la excreción amoniaca de los organismos debido a diferencias en la concentración de NAT entre el agua contenida en las cámaras metabólicas y el agua proveniente de los SRA. El agua contenida en las cámaras metabólicas presentaba una mayor concentración de NAT en comparación de la

proveniente de los SRA. Cuando los organismos procedentes de los SRA abrían las valvas en las cámaras metabólicas provocaban un efecto de dilución en la concentración de NAT. Debido a esto, la excreción amoniacal al final del experimento de consumo de oxígeno era menor que al inicio del experimento.

### 3.4 Índice de Condición

No se detectaron diferencias significativas ( $P = 0.243$ ) en los índices de condición de entre los tratamientos durante las 10 semanas de acondicionamiento reproductivo. El índice de condición inicial fue de  $53.05 (\pm 8.75)$ . Al término del acondicionamiento reproductivo los SRA control registraron un índice de condición de  $49.27 (\pm 11.39)$  y los SRA con reactor de calcio presentaron un índice de condición de  $45.67 (\pm 7.66)$  (Figura 19).

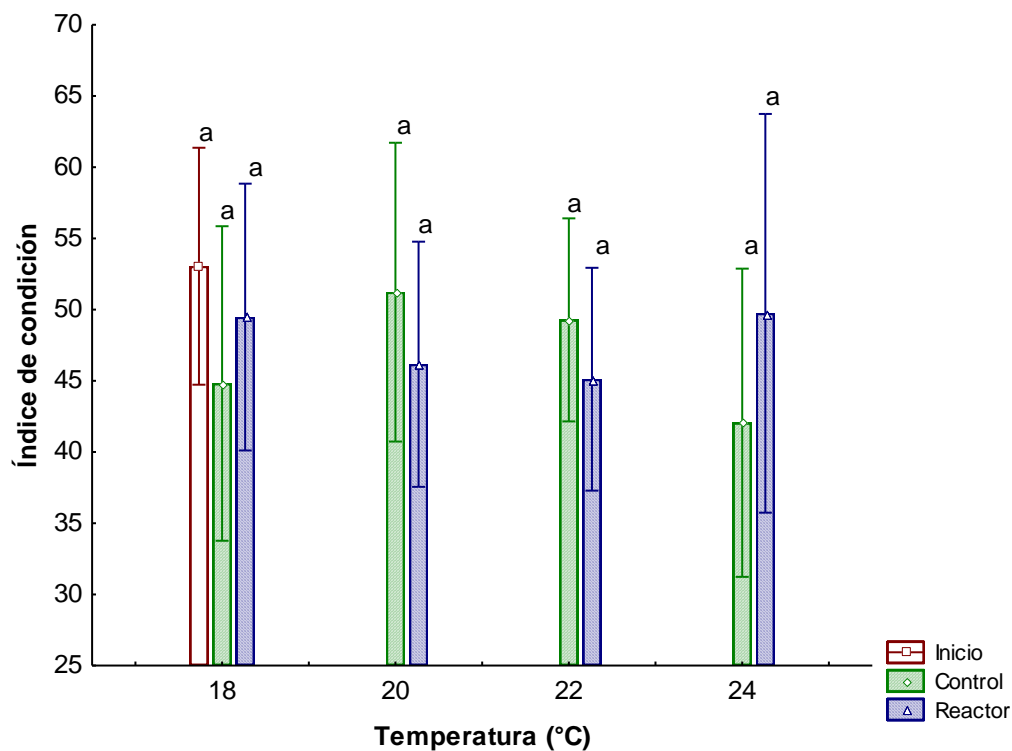


Figura 19. Índices de condición (media  $\pm$  desviación estándar) durante las 10 semanas del acondicionamiento reproductivo del ostión *Crassostrea sikamea* en un SRA a diferentes temperaturas.

### **3.5 Análisis histológico del desarrollo gonádico del ostión Kumamoto durante el acondicionamiento reproductivo**

En ambos tratamientos se encontró que en todas las temperaturas durante el proceso de maduración había organismos indiferenciados, en desarrollo y maduros. En la semana 0 se observó que el 60% de los ostiones se encontraba en desarrollo (Figura 20, Tabla 9). Después de 3 semanas el 100% organismos acondicionados en los SRA control se encontraban en desarrollo (Figura 21, Tabla 10), mientras que los organismos en los SRA con reactor tuvieron un 20% de maduros y un 20% indiferenciados (Figura 22, Tabla 11). Durante la semana de acondicionamiento a 20°C el 80% de los ostiones de los SRA control se encontraba en desarrollo y un 20% indiferenciados (Figura 23, Tabla 12), mientras que los ostiones en los SRA con reactor de calcio registraron un 40% indiferenciados y 60% en desarrollo (Figura 24, Tabla 13). Al finalizar el acondicionamiento a 22°C los SRA control registraron un 20% de organismos indiferenciados (Figura 25, Tabla 14) mientras que en los SRA con reactor de calcio un 40% (Figura 26, Tabla 15). En la semana 10 se encontró un 40% de organismos indiferenciados y un 60% de organismos maduros en los SRA control (Figura 27, Tabla 16) y en los SRA con reactor de calcio un 40% de ostiones maduros, 40% en desarrollo y un 20% indiferenciados (Figura 28, Tabla 17). Durante las 10 semanas de acondicionamiento reproductivo no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos en la temperatura, por lo cual se descarta los ostiones de cualquiera de los dos tratamientos haya tenido una mayor cantidad de temperatura acumula efectiva (TAE).

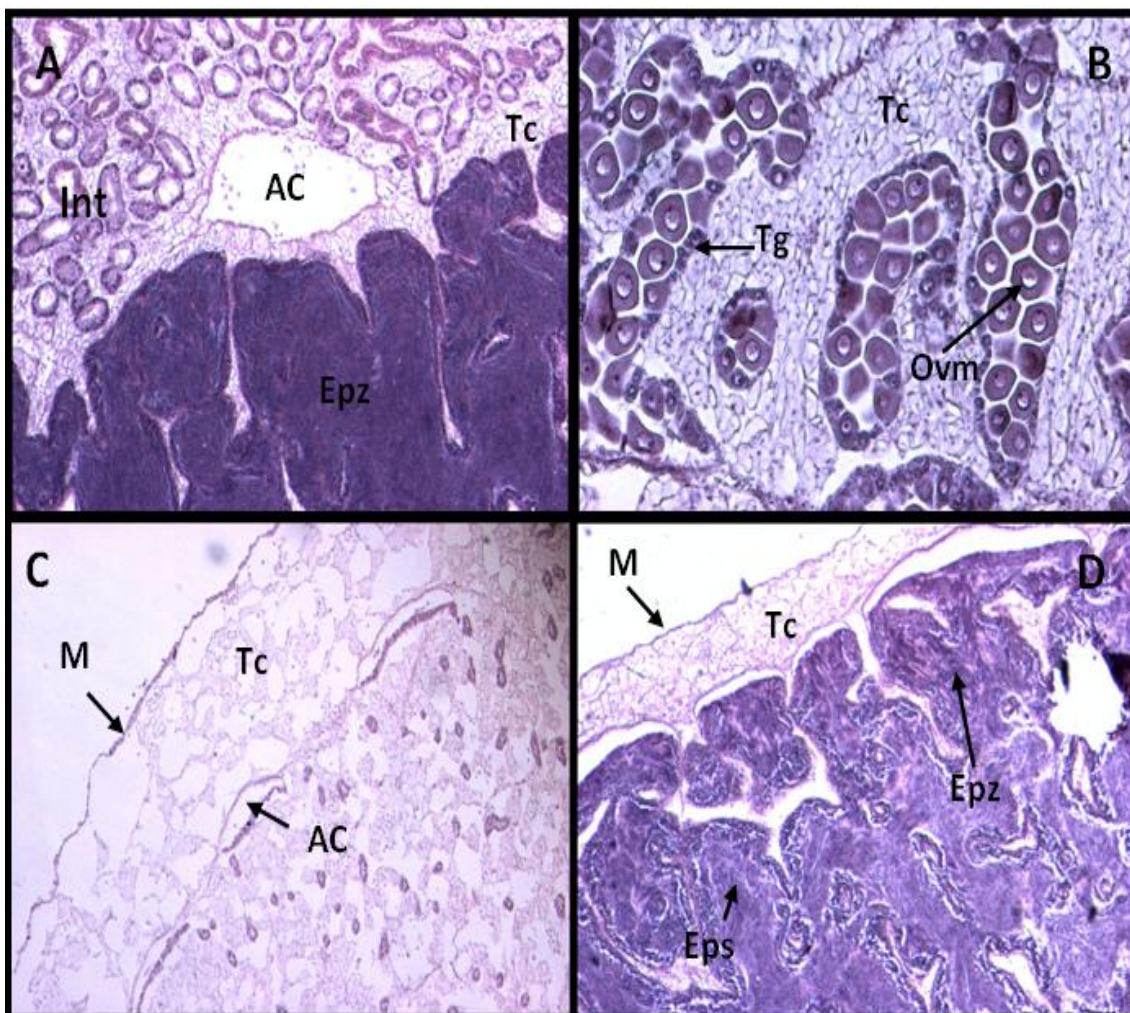


Figura 20. Descripción histológica de la gónada del ostión *Crassostrea sikamea* anterior al inicio del acondicionamiento reproductivo. Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatocitos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Maduro, B: Desarrollo, C: Indiferenciado, D: Desarrollo.

Tabla 9. Estadio gonadal del ostión Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) previo al acondicionamiento reproductivo (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).

Semana	Temperatura	Sexo	Inicio		TAE
			Estadio gonadal	Desarrollo gonadal (%)	
0	18	M	Maduro	20	
0	18	M	Desarrollo		
0	18	H	Desarrollo	60	0
0	18	H	Desarrollo		
0	18		Indiferenciado	20	



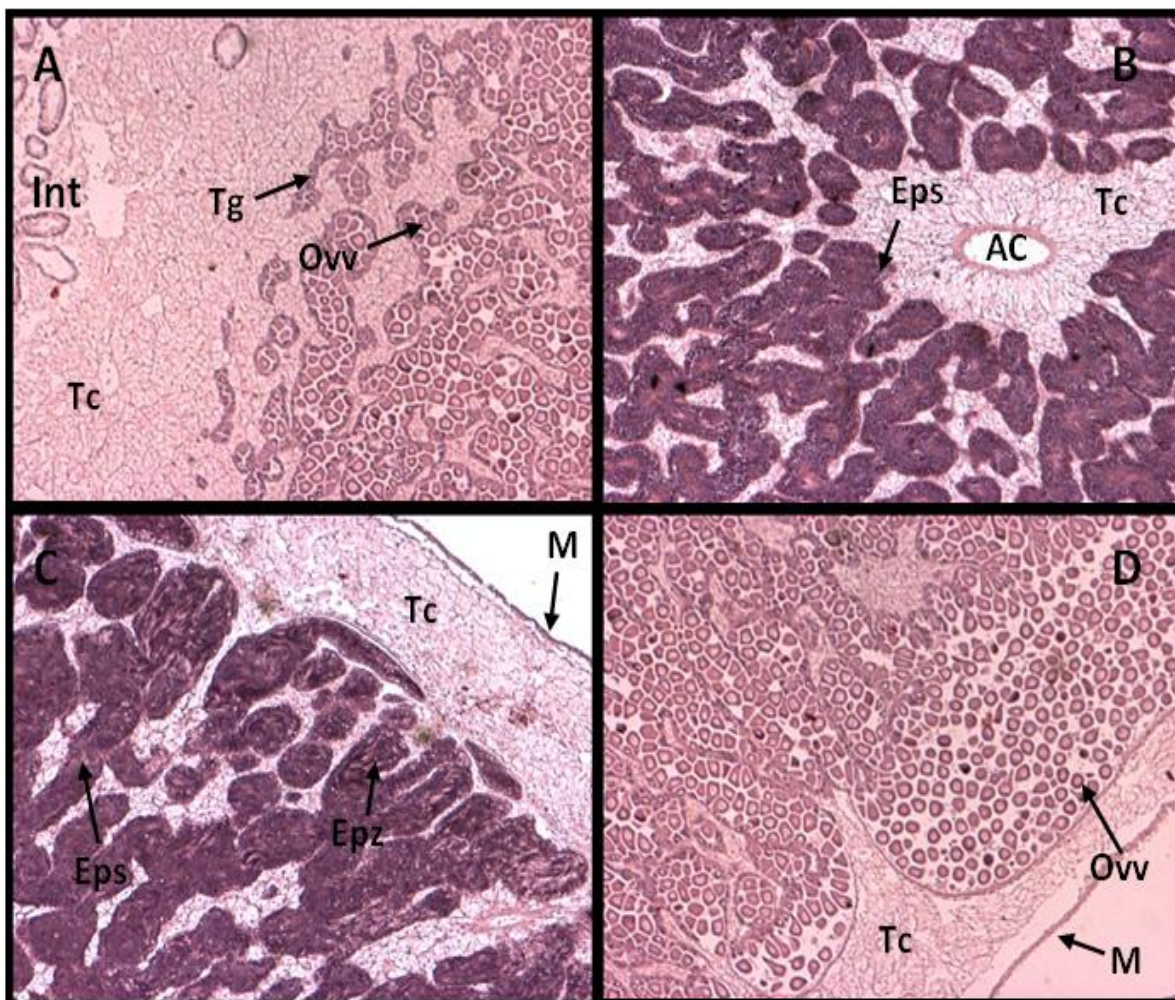


Figura 21. Descripción histológica de la gónada del ostión Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) durante el acondicionamiento reproductivo en los SRA control a los 18°C (semana 3). Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatozoides, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Desarrollo, B: Desarrollo, C: Desarrollo, D: Desarrollo.

Tabla 10. Estadio gonadal de los ostiones Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) en los SRA control 18°C (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).

Semana	Temperatura	Sexo	Control 18°C		TAE
			Estadio gonadal	Desarrollo gonadal (%)	
3	18	H	Desarrollo		
3	18	M	Desarrollo		
3	18	M	Desarrollo	100	143.22
3	18	M	Desarrollo		
3	18	H	Desarrollo		

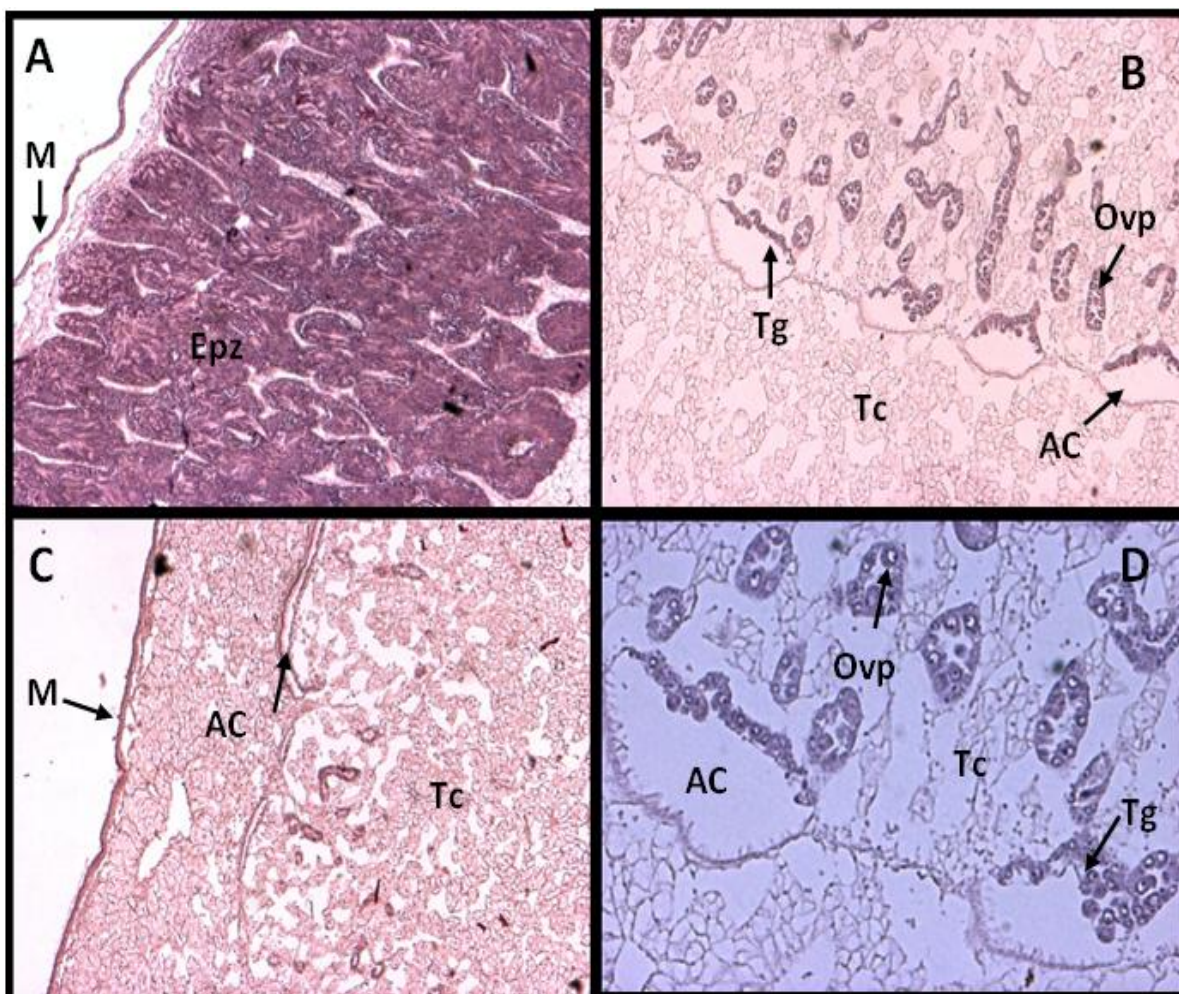


Figura 22. Descripción histológica de la gónada del ostión *Crassostrea sikamea* durante el acondicionamiento reproductivo en un SRA con reactor de calcio a 18°C (semana 3). Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatocitos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Maduro, B: Desarrollo, C: Indiferenciado, D: Desarrollo.

Tabla 11. Estadio gonadal de los ostiones Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) en los SRA con reactor de calcio a los 18°C (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).

Semana	Temperatura	Sexo	Reactor 18°C		TAE
			Estadio gonadal	Desarrollo gonadal (%)	
3	18	M	Maduro	20	139.65
3	18	M	Desarrollo		
3	18	M	Desarrollo	60	
3	18	H	Desarrollo		
3	18		indiferenciado	20	

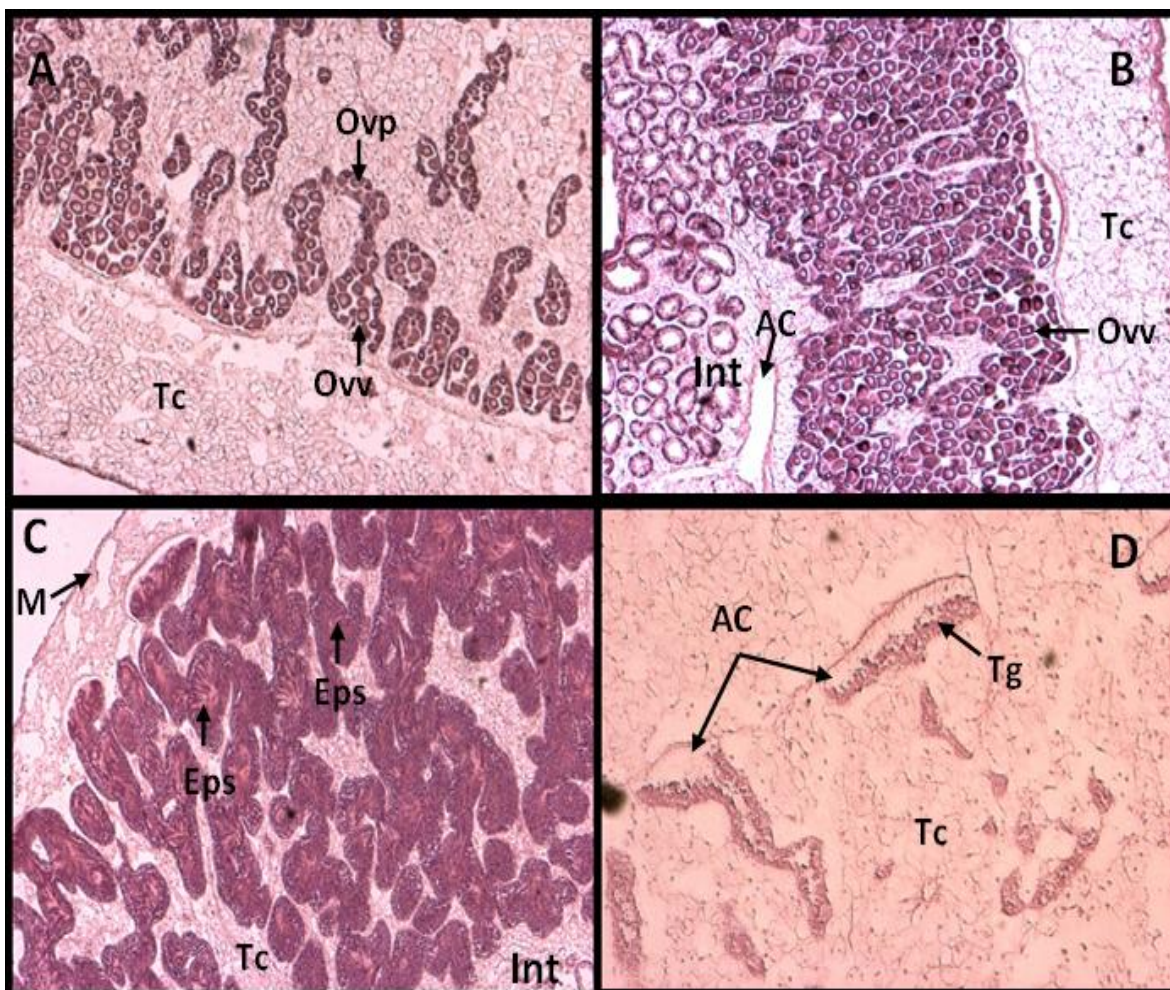


Figura 23. Descripción histológica de la gónada del ostión *Crassostrea sikamea* durante el acondicionamiento reproductivo en los SRA control a los 20°C (semana 4). Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatocitos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Desarrollo, B: Desarrollo, C: Desarrollo, D: Indiferenciado.

Tabla 12. Estadio gonadal de los ostiones Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) en los SRA control a los 20°C (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).

Semana	Temperatura	Sexo	Control 20°C		TAE
			Estadio gonadal	Desarrollo gonadal (%)	
4	20	M	Desarrollo		
4	20	H	Desarrollo		
4	20	M	Desarrollo	80	199.22
4	20	H	Desarrollo		
4	20		indiferenciado	20	

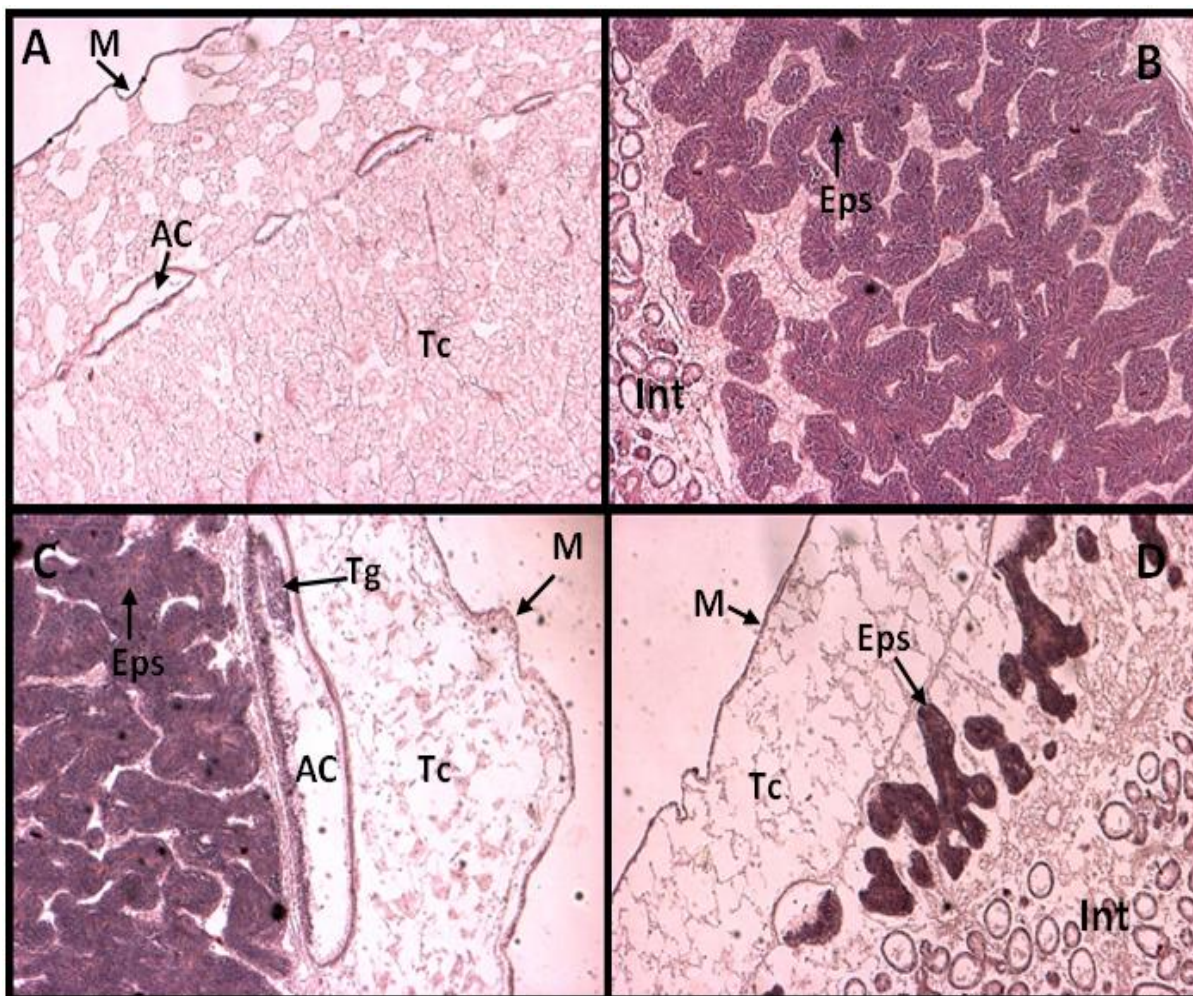


Figura 24. Descripción histológica de la gónada del ostión *Crassostrea sikamea* durante el acondicionamiento reproductivo en los SRA con reactor de calcio a los 20°C (semana 4). Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatoцитos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Indiferenciado, B: Desarrollo, C: Desarrollo, D: Desarrollo.

Tabla 13. Estadio gonadal de los ostiones Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) en los SRA con reactor de calcio a los 20°C (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).

Semana	Temperatura	Sexo	Reactor 20°C		TAE
			Estadio gonadal	Desarrollo gonadal (%)	
4	20	M	Desarrollo		
4	20	M	Desarrollo	60	
4	20	M	Desarrollo		198.22
4	20		Indiferenciado	40	
4	20		Indiferenciado		

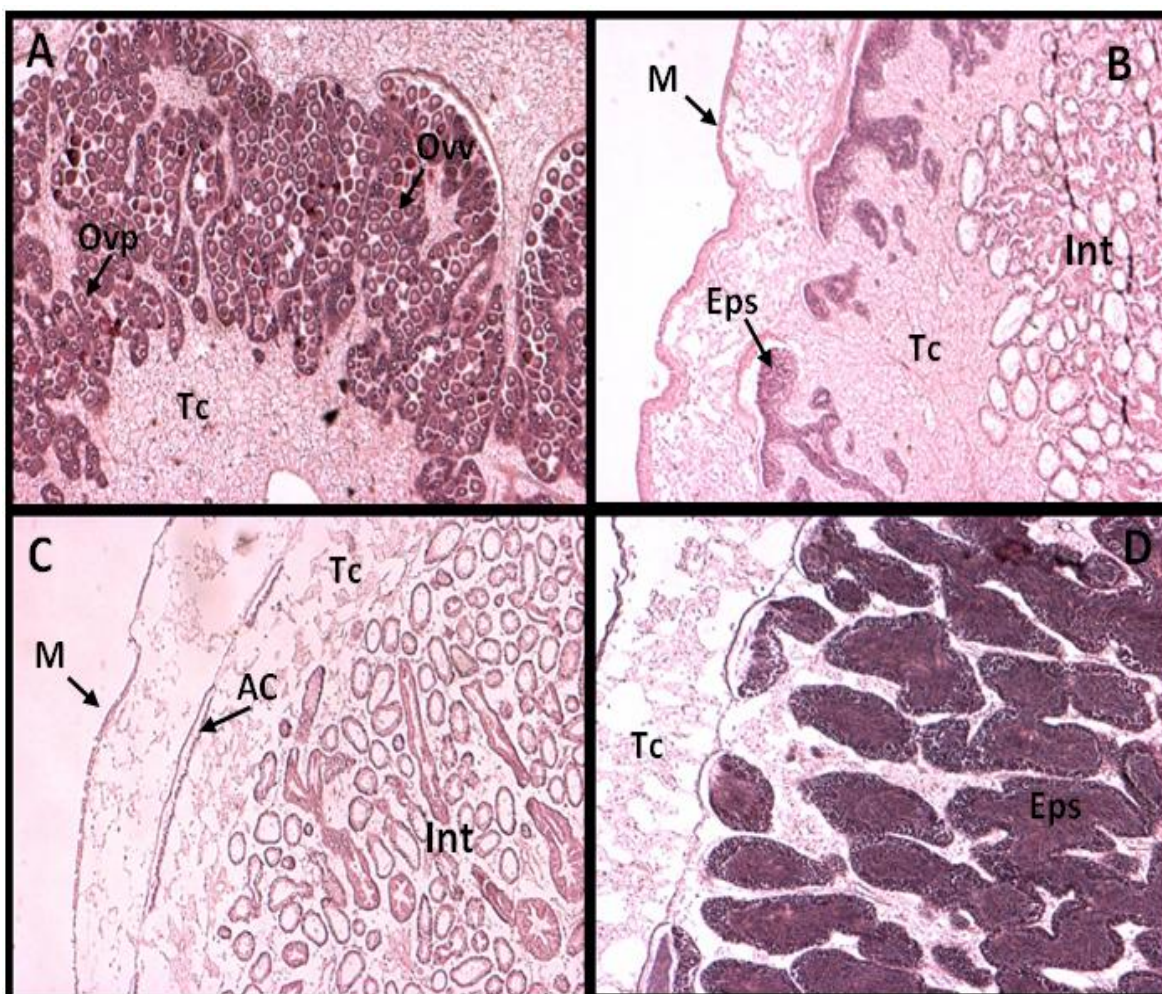


Figura 25. Descripción histológica de la gónada del ostión *Crassostrea sikamea* durante el acondicionamiento reproductivo en los sistemas de SRA control a los 22°C (semana 7). Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovw: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatocitos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Desarrollo, B: Desarrollo, C: Indiferenciado, D: Desarrollo.

Tabla 14. Estadio gonadal de los ostiones Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) en los SRA control a los 22°C (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).

Semana	Temperatura	Sexo	Control 22°C		TAE
			Estadio gonadal	Desarrollo gonadal (%)	
7	22	M	Desarrollo		410.69
7	22	M	Desarrollo	80	
7	22	H	Desarrollo		
7	22	M	Desarrollo		
7	22		Indiferenciado	20	

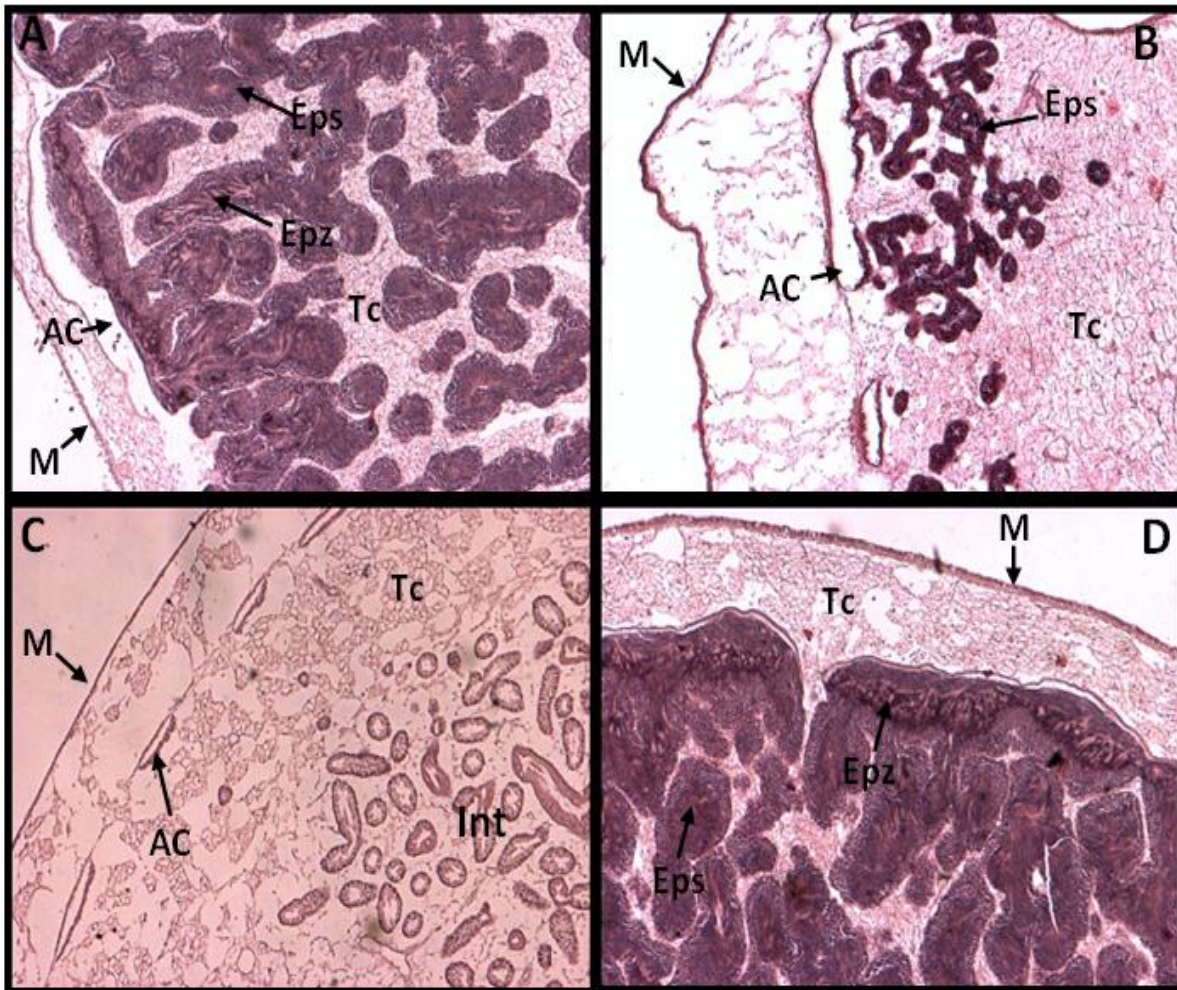


Figura 26. Descripción histológica de la gónada del ostión *Crassostrea sikamea* durante el acondicionamiento reproductivo en los SRA con reactor de calcio a los 22°C (semana 7). Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatoцитos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Desarrollo, B: Desarrollo, C: Indiferenciado, D: Desarrollo.

Tabla 15. Estadio gonadal de los ostiones Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) en los SRA con reactor de calcio a los 22°C (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).

Semana	Temperatura	Sexo	Reactor 22°C		TAE
			Estadio gonadal	Desarrollo gonadal (%)	
7	22	M	Desarrollo		
7	22	M	Desarrollo	60	
7	22	M	Desarrollo		412.93
7	22		Indiferenciado	40	
7	22		Indiferenciado		

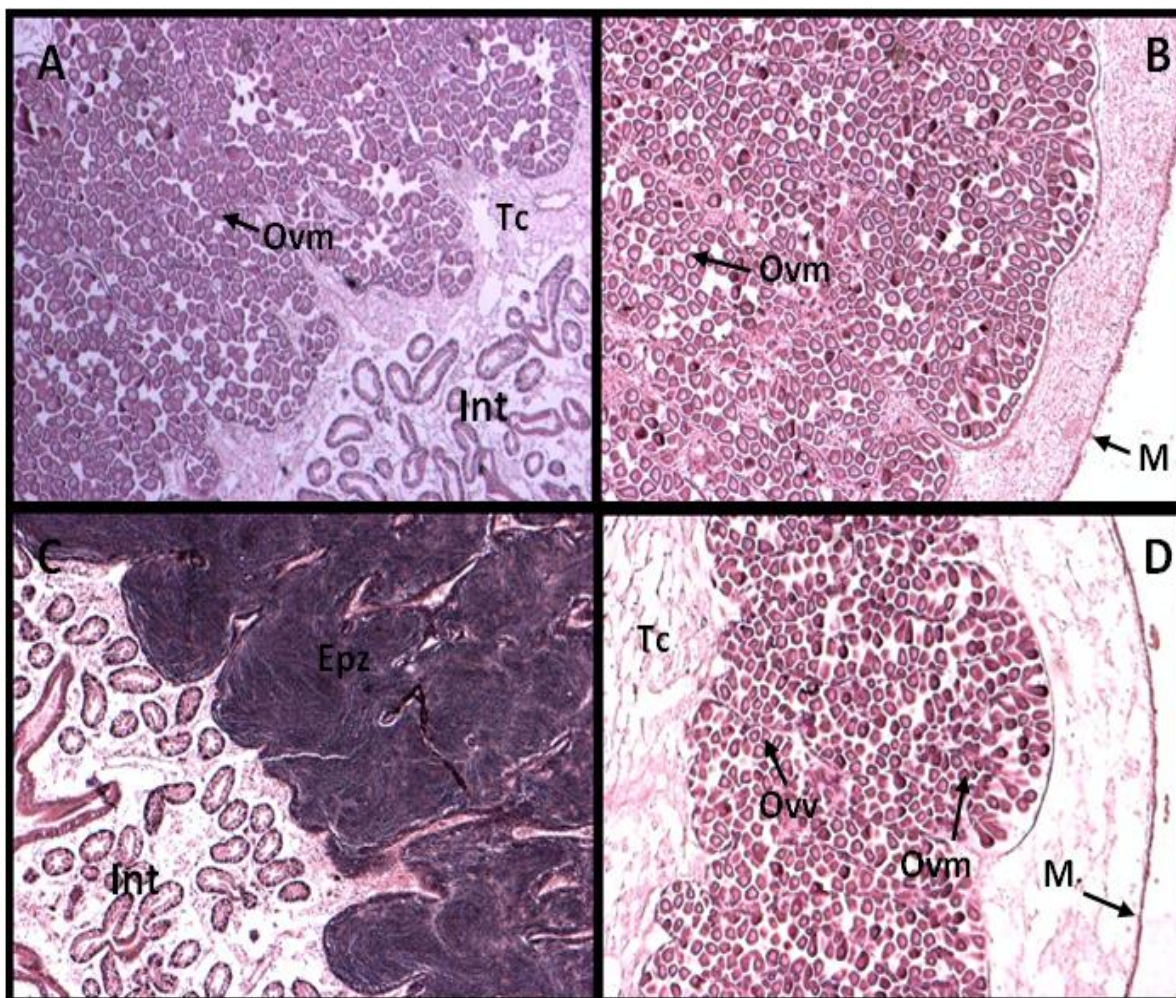


Figura 27. Descripción histológica de la gónada del ostión *Crassostrea sikamea* durante el acondicionamiento reproductivo en los SRA control a los 24°C (semana 10). Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ov: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatocitos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Maduro, B: Maduro, C: Maduro, D: Desarrollo.

Tabla 16. Estadio gonadal de los ostiones Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) en los SRA control a los 24°C (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).

Semana	Temperatura	Sexo	Control 24°C		TAE
			Estadio gonadal	Desarrollo gonadal (%)	
10	24	H	Maduro		
10	24	H	Maduro	60	
10	24	M	Maduro		665.63
10	24	H	Desarrollo	40	
10	24	M	Desarrollo		

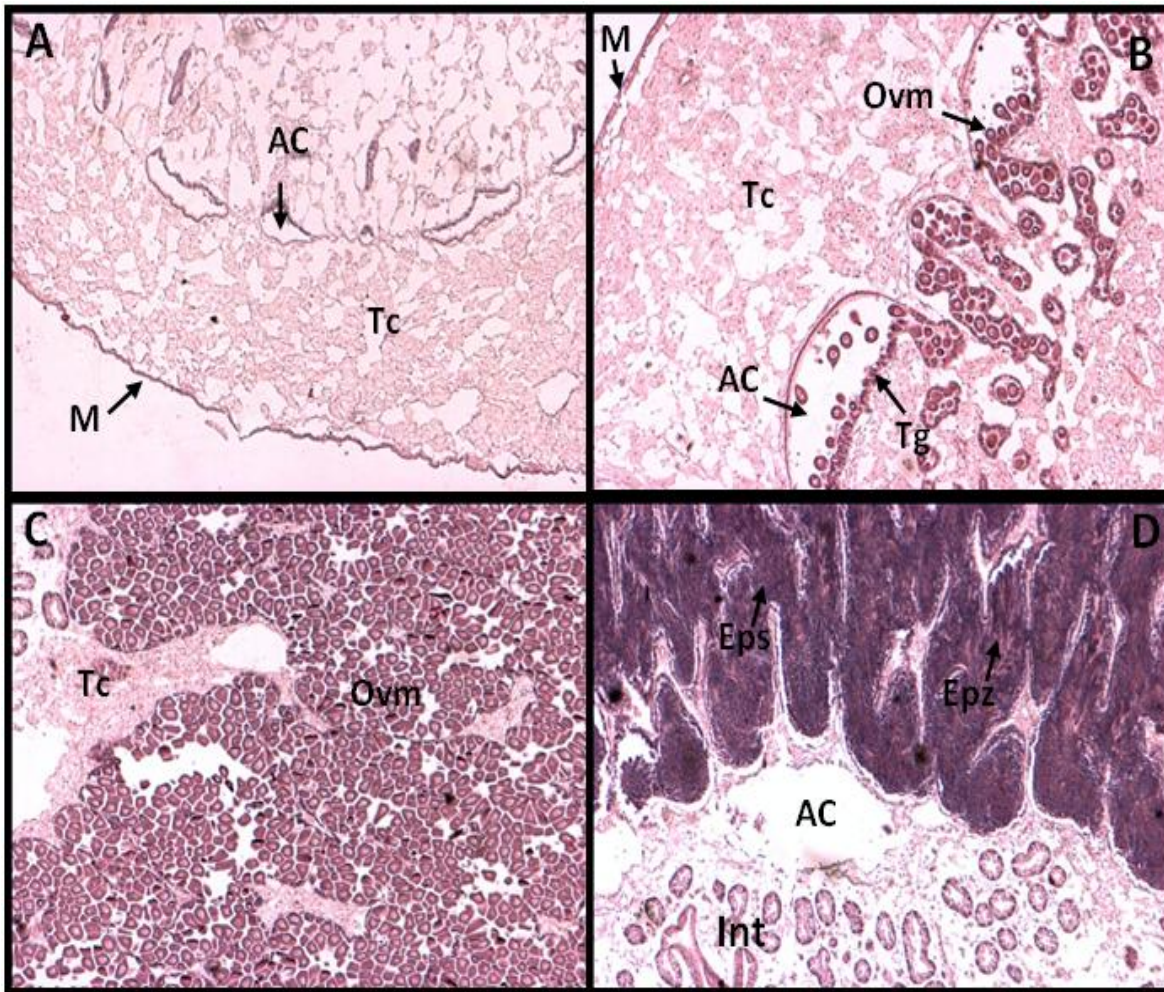


Figura 28. Descripción histológica de la gónada del ostión *Crassostrea sikamea* durante el acondicionamiento reproductivo en los SRA con reactor de calcio a los 24°C (semana 10). Tc: tejido conectivo, Ac: acino, Tg: tejido germinativo, Ovp: ovocitos primarios, Ovv: ovocitos en vitelogénesis, Eps: espermatoocitos, Epz: espermatozoide, Ovm: ovocito maduro, Int: intestinos. A: Indiferenciado, B: Desarrollo, C: Maduro, D: Maduro.

Tabla 17. Estadio gonadal de los ostiones Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) en los SRA con reactor de calcio a los 24°C (M: macho, H: hembra, TAE: temperatura acumulada efectiva).

Semana	Temperatura	Sexo	Reactor 24°C		TAE
			Estadio gonadal	Desarrollo gonadal (%)	
10	24	M	Maduro	40	665.98
10	24	H	Maduro		
10	24	H	Desarrollo	40	
10	24	H	Desarrollo		
10	24		Indiferenciado	20	



### 3.6 Índice gonadosomático

En la Tabla 18 se muestra el porcentaje ocupado por la gónada en los organismos por cada tratamiento y por temperatura. Se puede observar un incremento y decremento en el porcentaje ocupado por la gónada en los organismos en ambos tratamientos. Estos resultados concuerdan con lo observado en los cortes histológicos donde en cada temperatura se apreciaban organismos en desarrollo y organismos indiferenciados, provocando los cambios en el porcentaje de la gónada (Tabla 18).

**Tabla 18.** Porcentaje ocupado por la gónada en el ostión Kumamoto durante su acondicionamiento reproductivo en un sistema de recirculación control y un sistema de recirculación con reactor de calcio.

Temperatura (°C)	% Gónada		
	Inicio	Control	Reactor
	54.08(±31.43)		
18		44.64 (±19.19)	72.85 (±11.95)
20		70.20 (±19.77)	54.85 (±19.56)
22		69.02 (±26.29)	49.17 (±29.23)
24		75.88 (±33.10)	53.28 (±8.93)

### 3.7 Fertilización

En los 20 organismos obtenidos para el experimento de la fertilización de los SRA control se identificaron: 11 machos, 4 hembras, 3 indiferenciados y 2 desovados parcialmente. De los 20 ostiones muestreados de los SRA con el reactor de calcio se identificaron: 9 machos, 3 hembras, 3 organismos en proceso de maduración y 5 indiferenciados (Figura 29).

Se detectaron diferencias significativas ( $P = 0.031$ ) en el número de ovocitos entre los SRA control y los SRA con reactor de calcio. El tratamiento donde se obtuvo un mayor número de ovocitos fue en los SRA con reactor de calcio. Se detectaron diferencias significativas ( $P = 0.000$ ) en la concentración espermática entre los SRA control y los SRA con reactor de calcio. La mayor concentración fue obtenida en el tratamiento de los SRA con reactor de calcio. Se detectaron diferencias significativas ( $P = 0.000$ ) en el

número de larvas entre los tratamientos. El tratamiento que produjo el mayor número de larvas fue el de los SRA con reactor de calcio. Se detectaron diferencias significativas en el largo ( $P = 0.001$ ) y en el ancho ( $P = 0.000$ ) de las larvas entre los tratamientos. Las larvas más grandes se encontraron en los tratamientos con SRA con reactor de calcio (Tabla 19) (Figura 30).



Figura 29. La imagen del extremo derecho representa un ostión Kumamoto no maduro y la imagen del extremo izquierdo un ostión Kumamoto maduro.

Tabla 19. Número de ovocitos, espermatozoides, larvas D, el ancho y el largo de las larvas D entre los SRA control y los SRA con reactor de calcio, obtenidos de los reproductores de ostión Kumamoto después de las 10 semanas del periodo de acondicionamiento reproductivo. Letras diferentes a>b>c indican diferencias significativas.

Variable	Control	Reactor
Ovocitos	4 100 ( $\pm 424.26$ ) mL <sup>-1</sup> <sup>a</sup>	5 950 ( $\pm 212.13$ ) mL <sup>-1</sup> <sup>b</sup>
Espermatozoides	1. 82 x 10 <sup>6</sup> ( $\pm 6.8$ x 10 <sup>5</sup> ) mL <sup>-1</sup> <sup>a</sup>	26.6 x 10 <sup>6</sup> ( $\pm 3.05$ x 10 <sup>5</sup> ) mL <sup>-1</sup> <sup>b</sup>
Larvas	110.66 ( $\pm 7.02$ ) mL <sup>-1</sup> <sup>a</sup>	396 ( $\pm 38.22$ ) mL <sup>-1</sup> <sup>b</sup>
Largo	53.84 $\mu$ m ( $\pm 4.31$ ) <sup>a</sup>	55.89 $\mu$ m ( $\pm 4.23$ ) <sup>b</sup>
Ancho	59.62 $\mu$ m ( $\pm 5.64$ ) <sup>a</sup>	62.72 $\mu$ m ( $\pm 4.17$ ) <sup>b</sup>

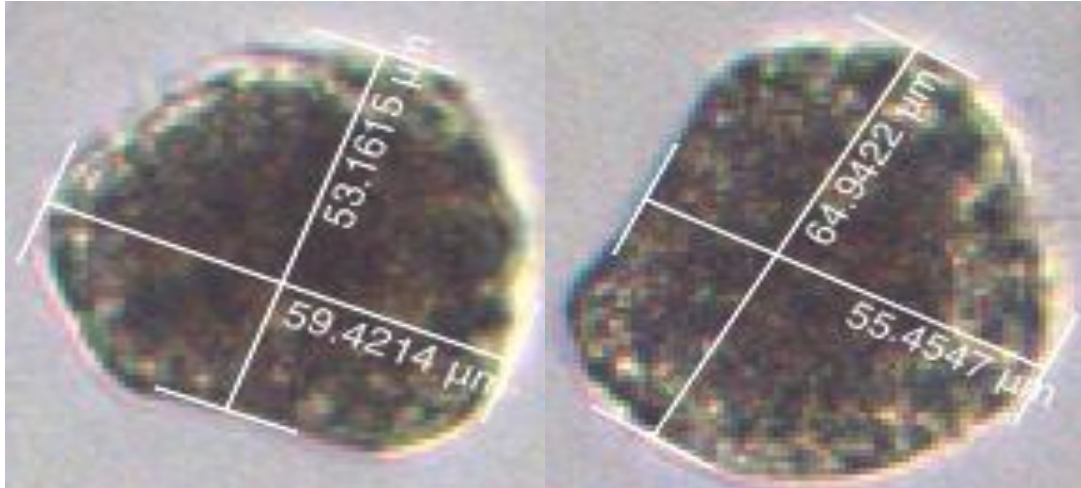


Figura 30. Medición del largo y el ancho ( $\mu\text{m}$ ) de las larvas obtenidas en la fertilización del ostión Kumamoto.

### 3.8 Mortalidad

Durante el acondicionamiento reproductivo de los  $18^{\circ}\text{C}$  se registraron 2 organismos muertos que representó el 0.83% de mortalidad. Un organismo en un SRA control y un organismo en un SRA con reactor de calcio. Al final de la tercera semana durante el acondicionamiento en esta misma temperatura ( $18^{\circ}\text{C}$ ) se registró una mortandad de 20 organismos en uno de los SRA con reactor de calcio. Esta mortandad fue debido a un mal funcionamiento del calentador eléctrico elevando la temperatura hasta los  $31.4^{\circ}\text{C}$  y bajando la concentración de OD a  $2.31\text{ mg/L}$ .

## Capítulo 4. Discusión

### 4.1 Alimentación

El ciclo reproductivo de los bivalvos está influenciado por factores externos. Los factores reconocidos como más importantes son la temperatura y la alimentación (Thompson *et al.*, 1996). La temperatura tiene influencia directa sobre el desarrollo gonadal y el desove, mientras que la alimentación tiene una influencia en la calidad de los gametos, afectando directamente el crecimiento y supervivencia de las larvas y postlarvas (Loosanoff y Davis, 1963; Lannan *et al.*, 1980; Muranaka y Lannan, 1984; Utting y Millican, 1997; Uriarte *et al.*, 2004).

La concentración de alimento requerida por los moluscos bivalvos está determinada por la relación del peso seco del tejido metabólicamente activo y el peso seco de las microalgas utilizadas. La ración óptima, se encuentra usualmente entre el 2 y el 4% del peso corporal (Helm *et al.*, 2004). Raciones entre el 6 y 9% del peso seco corporal resultan excesivas y no presentan ningún beneficio en el acondicionamiento reproductivo, promueven un crecimiento irregular en las valvas, retrasan el desarrollo gonádico, no aumentan el número de ovocitos durante el desove y provocan baja viabilidad de las larvas (Stephenson, 1973). Sin embargo también se encontró que dietas con un 8% del peso seco corporal en *P. maximus*, equivalente a una concentración celular de  $14 \times 10^9$  células por organismo por día aceleraba la gametogénesis comparada con una dieta de  $3 \times 10^9$  células por organismo por día equivalente al 2% del peso seco corporal (Devauchele y Mingant, 1991). En el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto se alimentó a los ostiones con una tasa de alimentación de  $2 \times 10^8$  células por organismo por día y se encontró que esta concentración estaba dentro de los rangos recomendables para los moluscos bivalvos. No obstante esta tasa de alimentación a pesar de ser óptima para el acondicionamiento reproductivo de bivalvos, provocó una concentración celular en los SRA superior a la recomendada de 100,000 células/mL. Las concentraciones superiores a la recomendada inducen a una gran producción de pseudoheces, afectando la calidad del agua, además altas concentraciones de alimento pueden

provocar desoves involuntarios durante el periodo de acondicionamiento reproductivo (Muranaka y Lannan, 1984; Coutteau *et al.*, 1994; Heasman *et al.*, 1996; Mallet y Carver, 2009). En la dosificación de la ración y el manejo de la concentración celular en la alimentación de bivalvos en SRA se pueden utilizar diferentes estrategias de alimentación: (1) la alimentación de flujo continuo ó (2) alimentación por ración(es). La estrategia de alimentación de flujo continuo permite una mejor dosificación del alimento (concentración celular baja y uniforme) e incrementa la eficiencia de asimilación. El método de alimentación por porción(es) presenta incrementos drásticos en la concentración celular en los SRA, aumentando la producción de pseudoheces deteriorando la calidad del agua y provoca que los organismos mantengan cerradas sus valvas (Ricotta, 1998; Ramírez *et al.*, 1999). Durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto se alimentó por el método de raciones (2 porciones por día), lo que provocó que los ostiones tuvieran las valvas cerradas la mayor parte del tiempo, pero no se observó una gran cantidad de pseudoheces, esto podemos atribuirlo a la remoción de sólidos, producto del patrón de circulación del agua en el tanque de acondicionamiento. Estos resultados señalan que la tasa de alimentación durante el proceso de acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto se encontró dentro de los rangos óptimos, pero la estrategia de alimentación utilizada probablemente no fue la adecuada.

## **4.2 Calidad del agua**

El monitoreo de las variables de la calidad del agua nos permitió conocer el funcionamiento de los SRA durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto. El mantenimiento de la calidad del agua para el acondicionamiento reproductivo es esencial para asegurar la supervivencia, crecimiento y maduración de las gónadas de los bivalvos cuando son mantenidos en un SRA (Widman *et al.*, 2008). La manipulación de las variables físicas tales como: la temperatura, el fotoperiodo, la salinidad y las nutricionales como la cantidad y calidad del alimento son factores que afectan el desarrollo gonadal, acelerando o retrasando la maduración de la gónada (Gallagher y Mann, 1986; Muranaka y Lannan, 1984; Ren *et al.*, 2003; Mallet y Carver, 2009).

En los SRA control y los SRA con reactor de calcio se detectaron diferencias significativas en la salinidad a los 20 y 22°C esto fue debido a la pérdida de agua por evaporación. El aumento en la salinidad por efecto de la temperatura durante el periodo de acondicionamiento reproductivo ya ha sido reportado en otros estudios y se encontró que no producía ningún efecto deletéreo en los organismos (Lawson, 1995). En este experimento, la salinidad promedio de los SRA control durante las 10 semanas de acondicionamiento fue  $36.79 \pm 2.37$  g/Kg, y en los SRA con reactor de calcio fue de  $37.32 \pm 2.56$  g/Kg. Estas salinidades se encontraron dentro de las reportadas como óptimas para los moluscos bivalvos (30 – 41 g/Kg) en las cuales no se ven afectados la actividad metabólica, el crecimiento de los organismos y el desarrollo gonadal (Muranaka y Lannan, 1984; Bricelj y Shumway, 1991; Hughes-Games, 1977; Helm *et al.*, 2004).

En el acondicionamiento reproductivo en bivalvos la temperatura del agua es importante, ya que está directamente relacionada al proceso de gametogénesis y el desove de los organismos (Muranaka y Lannan, 1984; Shpigel *et al.*, 1992; Utting y Millican, 1997). En los bivalvos las bajas temperaturas promueven el crecimiento somático y la acumulación de reservas energéticas (glicógeno) que serán utilizadas durante la maduración gonadal, mientras que su incremento puede acelerar el proceso de gametogénesis y promover el desove (Saout *et al.*, 1999; Farías, 2008). En el género *Crassostrea* el proceso de gametogénesis comienza cuando la temperatura del agua alcanza los 18°C (Lango-Reynoso, 1999). El desarrollo de los ovocitos primarios en condiciones controladas de temperatura, fotoperiodo y alimentación comienza después de los 17.5°C. Sin embargo para alcanzar la maduración de las gónadas se requiere un incremento en la temperatura desde los 19°C hasta los 25°C, entre mayor sea el tiempo de exposición de los organismos a temperaturas cálidas, el periodo de acondicionamiento reproductivo será menor (Chávez-Villalba *et al.*, 2002). En el caso del ostión Kumamoto se ha reportado que en temperaturas de 24°C se produjeron gametos maduros de 2 a 4 semanas antes que los sometidos a los 20°C (Robinson, 1992). En este experimento el gradiente de temperaturas (18 - 24°C) se encontró dentro del rango empleado en la maduración de gametos para varias especies de moluscos bivalvos, promoviendo exitosamente su maduración. Las temperaturas

utilizadas durante un acondicionamiento reproductivo pueden variar según el sexo del organismo, la edad (Green *et al.*, 1983) la condición nutricional, las características genéticas (Newell y Pye, 1970; Wallis, 1977) y las variables ambientales (Newell y Pye, 1970; Bourget, 1983; Poza-Boveda y Rodríguez, 1987; Urban, 1994).

El fotoperiodo es una variable importante en el acondicionamiento reproductivo en los bivalvos. El ciclo reproductivo de los bivalvos puede acelerarse o retrasarse, alterando las condiciones de temperatura y fotoperiodo (Fabioux *et al.*, 2005). En *P. magellanicus* y en *A. irradians* la exposición a largos periodos de luz promovieron un mejor desarrollo de la gónada que los organismos expuestos a largos periodos de obscuridad (Couturier y Aiken, 1989; Desanctis *et al.*, 2007). Mallet y Carver (2009) establecieron que se requiere un mínimo de 8:16 (luz: obscuridad) para promover la maduración gonadal, siendo el mejor fotoperiodo el de 16:8 (luz: obscuridad). Este último fotoperiodo es el mismo que se utilizó durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto obteniéndose resultados positivos en la maduración de la gónada.

En los SRA el primer factor limitante es el oxígeno disuelto (OD) (Timmons *et al.*, 2002). En los moluscos bivalvos se han registrado concentraciones de OD de 7.15 mg/L y 6.25 mg/L para *C. gigas* (Clark *et al.*, 2013). En el cultivo de *A. purpuratus* se han registrado concentraciones de 5.8 mg/L y 4.8 mg/L (Soria *et al.*, 2007), en *M. mercenaria* concentraciones de 7.2 mg/L (Martínez y Pérez, 2003) y en *C. virginica* de 7.1 mg/L (Kuhn *et al.*, 2013). Estas concentraciones se pueden reportar como ideales, ya que en ninguno de los casos se reportaron efectos nocivos sobre los organismos. En los SRA utilizados para el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto, la concentración promedio de OD más alta fue registrada a los 18°C con 6.37 mg/L, en los SRA con reactor de calcio la concentración más baja fue registrada a los 24°C con 5.58 mg/L en los SRA control. Estas concentraciones de OD se encuentran dentro del rango óptimo para el crecimiento y acondicionamiento reproductivo de moluscos bivalvos.

Las concentraciones de los compuestos nitrogenados (NAT y NO<sub>2</sub>) deben ser constantemente monitoreadas, ya que la exposición a altas concentraciones de NAT por periodos prolongados provoca efectos negativos en la tasa de crecimiento, la

capacidad de reproducción y la resistencia a enfermedades (Colt y Armstrong, 1981). La concentración de NAT no presentó diferencias significativas entre los dos tratamientos ( $0.05 \pm 0.10$  mg/L sistemas control,  $0.04 \pm 0.11$  mg/L sistemas con reactor de calcio). Estas concentraciones son mayores a las registradas en el acondicionamiento reproductivo de *A. purpuratus* que osciló entre 0.005 y 0.01 mg/L (Martínez y Pérez, 2003; Merino *et al.*, 2009), en *C. virginica* el rango óptimo de NAT se encontró entre 0.01 y 0.027 mg/L (Magnesen y Jacobsen, 2012) y 0.26 mg/L para *P. maximus* (Kuhn *et al.*, 2013). Aun cuando la concentración de NAT obtenida durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto fue mayor a las reportadas para otras especies de bivalvos, no registró un efecto negativo. En el caso de los SRA utilizados para la producción o el proceso de acondicionamiento reproductivo se recomienda mantener la concentración de NAT por debajo de 1 mg/L (Timmons *et al.*, 2002).

En los  $\text{NO}_2$  se han reportado en sistemas de flujo de abierto y SRA concentraciones entre 0.02 y 0.27 mg/L en *A. purpuratus* (Martínez y Pérez, 2003; Merino *et al.*, 2009), 0.01 mg/L en *C. virginica* (Magnesen y Jacobsen, 2012) y 0.27 mg/L con *P. maximus* (Kuhn *et al.*, 2013). La concentración máxima de  $\text{NO}_2$  durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto en ambos tratamientos fue 0.07 mg/L. No hay un efecto de los nitritos en el acondicionamiento por su baja concentración y el pH del agua.

Los  $\text{NO}_3$  son los compuestos nitrogenados menos tóxicos en los SRA (Timmons *et al.*, 2002). Concentraciones  $\text{NO}_3$  de 7.60 mg/L se han registrado en *A. purpuratus* (Martínez y Pérez, 2003) y 14.1 mg/L en *P. maximus* (Kuhn *et al.*, 2013). La concentración máxima reportada durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto fue de 10.82 mg/L, la cual se mantuvo dentro del rango óptimo para los moluscos bivalvos. Si comparamos las concentraciones de  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$  a las diferentes temperaturas entre los tratamientos podemos observar que en gran parte de ellos existen diferencias significativas. Estas diferencias se atribuyen a que el pH en los sistemas con reactor de calcio siempre fue mayor que en los sistemas control. El pH tiene un efecto en la tasa de nitrificación (nitrición y nitración), las bacterias



quimioautótrofas del grupo filogenético al cual pertenecen las *Nitrosomonas* (transforman el NAT a  $\text{NO}_2$ ) tienen un pH óptimo entre 7.0 y 8.0, mientras que el pH óptimo para las bacterias del grupo filogenético al cual perteneces las *Nitrobacter* (transforma el  $\text{NO}_2$  a  $\text{NO}_3$ ) de 7.5 a 8.0 (Odell *et al.*, 1996, Hagopian y Riley, 1998).

#### 4.21 Sistema carbón-carbonatos

El monitoreo del pH es fundamental para la óptima eficiencia del biofiltro (Lekang, 2007). Si existen cambios drásticos en el pH (0.5 – 1.0 unidades) hay una disminución de la eficiencia de nitrificación de hasta el 50% con la acumulación de compuestos nitrogenados (NAT y  $\text{NO}_2$ ) en el SRA (Timmons y Ebeling, 2010). En los SRA operados con agua marina el pH debe mantenerse entre 7.8 y 8.3 para su correcto funcionamiento (Lekang, 2007). En estos valores de pH son en los cuales los moluscos bivalvos crecen y se desarrollan en su medio natural de manera óptima. En este trabajo durante las 10 semanas de acondicionamiento reproductivo el pH en los SRA con reactor de calcio ( $8.06 \pm 0.06$ ) fue mayor que en los SRA control ( $7.95 \pm 0.06$ ). El pH de los SRA control fueron superiores a los registrados en la producción de semilla de *M. mercenaria* en un SRA de  $7.5 \pm 0.2$  (Martínez y Pérez, 2003) y en la producción de juveniles de *A. purpuratus* de  $8.07 \pm 0.17$  a  $16^\circ\text{C}$  y de  $7.97 \pm 0.26$  a  $22^\circ\text{C}$  (Soria *et al.*, 2007). El pH de los SRA con reactor de calcio es similar al reportado durante el acondicionamiento reproductivo de *C. virginica* que osciló en un rango de pH de 7.8 - 8.5 (Buchanan *et al.*, 1998). El rango de pH observados en este experimento entre los SRA control y SRA con reactor de calcio no mostró tener algún efecto negativo en los organismos. El valor del pH en los SRA control se incrementó, mientras que en los SRA con reactor de calcio el valor del pH se mantuvo constante en las temperaturas de 20, 22 y  $24^\circ\text{C}$ . Estos resultados indican que el reactor de calcio funcionó correctamente, aportando en concentraciones suficientes iones de  $\text{CO}_3^{2-}$  para mantener constante los valores del pH durante el acondicionamiento reproductivo. En los SRA control se observó que el pH incrementó conforme aumentaba la temperatura, esto se debe a que las bacterias nitrificantes contenidas en el biofiltro incrementaron su metabolismo conforme aumentó la temperatura. El incremento en el metabolismo de las bacterias nitrificantes derivó en un aumento de iones  $\text{H}^+$  derivados del proceso de

nitrificación (Hagopian y Riley 1998; Chen *et al.*, 2006). El incremento de los iones  $H^+$  aceleró la disolución de la concha de los ostiones conforme se elevaba la temperatura. Como respuesta al incremento de los iones  $H^+$  tiene que haber un aumento en la concentración de iones  $CO_3^{-2}$  para neutralizar el efecto de este ion en el pH. La fuente de  $CO_3^{-2}$  es el mismo organismo, ya sea por disolución de la concha o por un proceso de difusión por el manto en donde se liberan iones de  $CO_3^{-2}$  que finalmente neutralizaron a los iones  $H^+$  formando iones  $HCO_3^-$ . Los iones  $CO_3^{-2}$  son parte del sistema carbón-carbonatos y junto con los iones  $H_2CO_3$  y  $HCO_3^-$  son los responsables directos de las variaciones del pH en el agua. La concentración de iones  $CO_3^{-2}$  en los SRA con reactor de calcio ( $0.0117 \pm 0.0029$  mg/L) siempre fue mayor que la concentración registrada en los SRA control ( $0.0080 \pm 0.0011$  mg/L) durante las 10 semanas de acondicionamiento reproductivo. Sin embargo las concentraciones de iones  $CO_3^{-2}$  en ambos tratamientos demostraron ser suficientes para mantener el pH del agua dentro de los rangos óptimos. Cuando los bivalvos se encuentran en el proceso de engorda o acondicionamiento reproductivo en un SRA el control del pH se vuelve esencial, ya que nos suministra en forma indirecta información sobre la salud del biofiltro y la interacción del sistema carbón-carbonatos (balance iónico) con la tasa de nitrificación y el balance iónico del agua. Los valores de pH menores de 7.0 hacen que disminuya la capacidad del bivalvo para alimentarse, propicia una pérdida en el índice de condición y provoca una disolución de la concha, valores menores a 6.5 incrementan la mortalidad (Bamber, 1987). En el agua cuando se tienen altas concentraciones del ión  $HCO_3^-$  el pH se mantiene en un rango entre 7.0 y 8.5 (Timmons *et al.*, 2002). En la Figura 15 podemos observar que en los SRA control la concentración de iones  $HCO_3^-$  disminuyó a los 24°C, pero el pH siguió aumentando. En los SRA con reactor de calcio la concentración de iones  $HCO_3^-$  tendió a disminuir conforme se elevaba la temperatura, mientras que el pH se mantuvo constante. La disminución en la concentración de iones  $HCO_3^-$  se debió al incremento en la tasa metabólica de las bacterias nitrificantes contenidas en el biofiltro. Las bacterias nitrificantes utilizan el carbono inorgánico ( $CO_2$  y  $HCO_3^-$ ) en procesos metabólicos asociados al crecimiento, la reproducción y el metabolismo (Chen *et al.*, 2006; Ebeling *et al.*, 2006). Al aumentar la tasa metabólica se incrementa el consumo del carbono inorgánico y como consecuencia se observa una reducción en la concentración de iones  $HCO_3^-$ . En los SRA el  $CO_2$  en su fase líquida

proviene de la respiración de los organismos, de la difusión del  $\text{CO}_2$  en su fase gaseosa y por el proceso de amonificación (Timmons *et al.*, 2002). Las altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  en el agua modifican el balance del sistema carbón- carbonatos, ya que el  $\text{CO}_2$  se integra al sistema formándose  $\text{H}_2\text{CO}_3$  que provoca una disminución del pH (Orr *et al.*, 2005; Arnold *et al.*, 2009). El pH sirve para saber de una manera indirecta la interacción del  $\text{CO}_2$  en el sistema carbón- carbonatos. El  $\text{CO}_2$  en altas concentraciones reduce la tasa de crecimiento, afecta la tasa de calcificación (Gazeau *et al.*, 2007), reduce el éxito reproductivo (Kurihara *et al.*, 2004), provoca una disolución de la concha (Arnold *et al.*, 2009), acidifica los fluidos internos del organismo (Spicer *et al.*, 2007) y aumenta el riesgo de infección (Holman *et al.*, 2004; Bibby *et al.*, 2007). La concentración de  $\text{CO}_2$  en los SRA control y en los SRA con reactor de calcio se mantuvo constante durante los 18, 20 y 22 °C, pero disminuyó significativamente a los 24°C. La disminución en la concentración de  $\text{CO}_2$  en ambos tratamientos es debido a que la principal fuente de carbono inorgánico para las bacterias nitrificantes es el  $\text{CO}_2$  (Timmons *et al.*, 2002). Sin embargo no se puede solamente atribuir la disminución en la concentración de iones  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{CO}_2$  a la nitrificación. Findlay *et al.*, (2009) reportó que los moluscos bivalvos utilizan los iones  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono para la formación de su concha. El carbono que fijan para la producción de la concha lo obtienen de los iones  $\text{HCO}_3^-$  y del  $\text{CO}_2$  presentes en el agua. Con los resultados obtenidos podemos afirmar que la concentración de  $\text{CO}_2$  en los SRA control y SRA con reactor de calcio no son suficientes para tener efectos negativos durante las 10 semanas de acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto.

La alcalinidad se puede definir como la capacidad que tiene un agua para neutralizar un ácido (Timmons *et al.*, 2002). En SRA se han registrado alcalinidades entre 103.1 mg/L de  $\text{CaCO}_3$  con *M. mercenaria* y 120 mg/L de  $\text{CaCO}_3$  con *A. purpuratus*, (Martínez y Pérez, 2003; Merino *et al.*, 2009). En los SRA control se registró una media de  $149.48 \pm 19.06$  mg/L de  $\text{CaCO}_3$ . Debido a que los recambios del agua se realizaron cada 8 días, la única fuente de alcalinidad disponible en los SRA control era la proveniente de la disolución de la concha por efecto del  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . La alcalinidad en los SRA con reactor de calcio ( $218.96 \pm 51.96$ ) mg/L de  $\text{CaCO}_3$ ) siempre fue mayor que la observada en los SRA control. La alcalinidad de los SRA con reactor de calcio

proporcionó al agua un efecto amortiguador y mantuvo constante los valores de pH durante el acondicionamiento reproductivo. Las alcalinidades registradas en ambos tratamientos (control y con reactor de calcio) son superiores a las registradas como óptimas para los moluscos bivalvos, sin embargo no se observaron efectos negativos durante el acondicionamiento reproductivo en el ostión Kumamoto.

### **4.3 Consumo de oxígeno**

La temperatura es uno de los principales factores que controlan el metabolismo en los bivalvos y al incrementarse, aumenta la tasa metabólica de estos (Bayne y Newell, 1983). En *P. mazatlanica* se observó que el consumo de oxígeno aumentaba conforme se incrementaba la temperatura (Saucedo *et al.*, 2004). En experimentos realizados con *M. edulis* y *C. gigas* se observó una mayor demanda de oxígeno cuando la temperatura del agua se incrementaba durante los meses más calurosos del año (Bayne y Thompson, 1970; Shpigel *et al.*, 1992). En este experimento, durante el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto, la tasa de consumo de oxígeno en los SRA control y los SRA con reactor de calcio se mantuvo constante a los 18°C y 20°C. A los 22°C se detectó una disminución en la tasa de consumo de oxígeno en ambos tratamientos. Hand y Hardewig, (1996) detectaron que una posible causa de la disminución en la tasa de consumo de oxígeno era debido a que los organismos estaban sometidos a condiciones de estrés. Sin embargo en los SRA control y los SRA con reactor de calcio, los factores que integran la calidad del agua se mantuvieron dentro los rangos reportados como óptimos, por lo que no fueron una fuente de estrés para los ostiones Kumamoto. En *P. mazatlanica* se observó que cuando los organismos están próximos al desove, se incrementa el consumo de oxígeno y cuando están en condición post-desove disminuye la tasa de consumo oxígeno. Esto podría indicar que la disminución de consumo de oxígeno en nuestros experimentos fue debido a que los ostiones tuvieron desoves parciales durante el proceso de acondicionamiento reproductivo.

#### 4.4 Índice de condición

Se ha reportado que el índice de condición en los bivalvos disminuye durante los meses fríos o cuando se tienen altas temperaturas y bajas concentraciones de alimento. (Gabbott y Walker, 1971; Del Río-Portilla, 1991; Chávez-Villalba *et al.*, 2010). Otro factor que puede provocar una disminución en el índice de condición son altas concentraciones de CO<sub>2</sub>. El CO<sub>2</sub> tiene un efecto negativo en el proceso de calcificación, el cual es integral en el control de procesos fisiológicos como el crecimiento, el metabolismo, la reproducción y la regulación interna del pH (Pörtner, 2008). Por lo cual, al verse afectado este proceso, se ve afectado el índice de condición. (Barry *et al.*, 2005; Wood *et al.*, 2008). En SRA se ha registrado que el índice de condición puede disminuir en los ostiones desde la primera semana de su acondicionamiento reproductivo (Buchanan *et al.*, 1998). En el ostión Kumamoto se han registrado disminuciones en el índice de condición durante su acondicionamiento reproductivo a partir de la semana 7, pasando de 69.5 a 43.9, atribuyendo esta disminución al incremento en la temperatura (18 – 24°C) (Panana, 2012). Sin embargo Findlay *et al.* (2009) registraron que aun cuando los bivalvos estén en condiciones desfavorables tienen la capacidad de regular su metabolismo y no verse afectados en talla y peso mientras se les suministre alimento en cantidad y calidad y no se altere el proceso de calcificación. En los SRA control y en los SRA con reactor de calcio no se detectaron diferencias significativas entre los dos tratamientos ni entre las temperaturas del acondicionamiento reproductivo. Obteniéndose un índice de condición promedio de  $49.27 \pm 11.39$  en los SRA control y  $45.67 \pm 7.66$  en los SRA con reactor de calcio. Esto puede indicar que la cantidad de alimento fue suministrada en cantidad y calidad y el proceso de calcificación no se vio afectado por las concentraciones de CO<sub>2</sub>, debido al control del balance iónico (sistema carbón-carbonatos). Los índices de condición constantes y las variaciones en el índice gonadosomático pueden indicarnos que los ostiones Kumamoto probablemente tuvieron desoves parciales durante el periodo de acondicionamiento reproductivo.

#### 4.5 Histología

Posterior al proceso de aclimatación y desove inducido por medio de shock térmico (Helm *et al.*, 2004) se observó que el 60% de los ostiones con los cuales se inició el proceso de acondicionamiento reproductivo estaban diferenciados sexualmente y se encontraban en desarrollo. La gónada en estos ostiones ocupaba el 54.08% de la glándula digestiva. Esto indica que el tiempo de aclimatación de 6 semanas a una temperatura de 17.35°C ( $\pm 2$ ) fue un periodo muy extenso y los organismos ya habían iniciado gametogénesis. Para *C. gigas* se requieren de 23 días a 19°C para observar los primeros ovocitos maduros (Chávez-Villalba *et al.*, 2002). Por lo que será necesario reducir el tiempo de aclimatación y la temperatura para evitar que los organismos inicien gametogénesis. Las bajas temperaturas y una tasa de alimentación óptima benefician el desarrollo de gametos y la acumulación de reservas energéticas, las cuales son consumidas durante el proceso de maduración (Bayne *et al.*, 1975). Los ostiones acondicionados en los SRA control y SRA con reactor de calcio presentaron organismos indiferenciados en las cuatro diferentes temperaturas, así como un incremento y disminución del índice gonadosomático (Tabla 9 - 17), obteniéndose un mayor número de organismos indiferenciados (40%) en los ostiones acondicionados en los SRA con reactor de calcio a los 20 y 22°C. Estos resultados sugieren que el sistema carbón-carbonatos puede tener efecto en el tiempo de maduración gonadal del ostión Kumamoto, además de indicar posibles desoves parciales por efecto del incremento en la temperatura durante las 10 semanas de acondicionamiento reproductivo. Los resultados obtenidos concuerdan con los registrados para bivalvos de zonas frío-templadas en donde los cuales presentan cambios en el porcentaje ocupado por la gónada en la glándula digestiva debido a desoves parciales como respuesta al incremento de temperatura, teniendo como una temperatura mínima de desove de 20°C (Mann, 1979; Martínez y Pérez, 2003; Saldaña, 2012).

#### 4.6 Temperatura acumulada efectiva (TAE)

La temperatura acumulada efectiva (TAE) ha sido ampliamente utilizada como indicador del desarrollo gonadal en bivalvos (Mann, 1979; Muranaka y Lannan, 1984; Utting y

Spencer, 1991). Los bivalvos de aguas frías y templadas requieren de un periodo de 4 a 8 semanas de acondicionamiento reproductivo para alcanzar la madurez gonadal. En nuestro experimento encontramos que tanto los SRA control como los SRA con reactor de calcio necesitaron alrededor de una TAE de 665 grados día, lo cual coincide con el trabajo de Helm *et al.* (2004) quienes indican que cuando se someten a los moluscos bivalvos a condiciones controladas de temperatura y alimento, se requieren entre 350 y 650 grados día acumulados para madurarlos. Aunque el TAE es un poco más elevado a lo reportado por estos autores, se sabe que si los organismos son preacondicionados suministrando una alta concentración de alimento se puede reducir el TAE (Millican y Helm 1994). Existen diferentes TAE dependiendo del manejo que se les dé a los organismos como también la especie con la que se trabaje (Price y Maurer, 1971; Helm *et al.*, 1973; Utting y Spencer, 1991). En nuestro caso el alto TAE fue debido a: (1) que los organismos ya habían empezado a desarrollar los gametos al iniciar el experimento y (2) los organismos aparentemente tuvieron desoves parciales debido al incremento en la temperatura. La TAE no es un indicador seguro para evaluar el grado de madurez de los organismos, ya que el proceso de maduración depende de factores como el manejo de los reproductores, la calidad del agua, la temperatura y la calidad de alimento (Millican y Helm, 1994). Si la TAE se complementa con histología, nos puede ayudar a generar protocolos más específicos para el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto en SRA.

#### **4.7 Fertilidad**

La calidad de los gametos se ve afectada por el proceso de acondicionamiento reproductivo al cual se encuentran sometidos los bivalvos (Helm *et al.*, 1973). En el proceso de acondicionamiento reproductivo, con una dieta con altas concentraciones de ácidos grasos (PUFAS y HUFAS) se proporciona a los reproductores nutrientes necesarios para la formación de gametos de buena calidad, lo cual se verá reflejado en las tasas de fertilidad y supervivencia de las larvas (Gallagher y Mann, 1986). En nuestro experimento encontramos que la concentración espermática y de ovocitos, la cantidad de larvas (D) y las lavas más grandes (largo, ancho) se obtuvieron de los organismos acondicionados en los SRA con reactor de calcio. Los resultados obtenidos

en la tasa de alimentación, la dinámica de la calidad del agua, el índice de condición y la TAE, no fueron diferentes entre los tratamientos y se mantuvieron dentro de los rangos reportados como óptimos para el ostión Kumamoto. Sin embargo al analizar la calidad del agua y en forma específica el sistema carbón carbonatos, podemos observar que durante el periodo de acondicionamiento reproductivo se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos en las concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^-$ ,  $\text{CO}_2$  y alcalinidad. Las mayores concentraciones de los iones que integran el sistema carbón-carbonato se detectaron en los SRA con reactor de calcio. Estos resultados sugieren que en el acondicionamiento reproductivo, la temperatura, la alimentación y el fotoperiodo no son los únicos factores que intervienen en la maduración del ostión Kumamoto, sino que el balance iónico tiene un efecto importante. Se desconocen los mecanismos involucrados en el balance iónico, el metabolismo del calcio y en la formación/disolución de la concha, por lo que este estudio sirve como un punto de partida para el desarrollo de estudios posteriores.



## Capítulo 5. Conclusiones

Los SRA son capaces de mantener la calidad del agua dentro de los rangos óptimos reportados para los moluscos bivalvos.

Los SRA con reactor de calcio, promovieron un mejor equilibrio en el sistema carbón-carbonatos.

La concentración de CO<sub>2</sub> registrada en este experimento en ambos tratamientos no provocó efectos negativos en el ostión Kumamoto.

Los reactores de calcio tienen una influencia directa en la fertilidad de los ostiones Kumamoto.

El incremento constante de temperaturas en el acondicionamiento reproductivo, puede provocar desoves parciales.

La temperatura, la alimentación y el fotoperiodo, no son los únicos factores que intervienen en la maduración del ostión Kumamoto, el intercambio iónico también debe ser considerado.

## 5.1 Recomendaciones

Realizar estudios sobre el efecto de estrategias de alimentación en el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto en SRA.

Determinar y analizar el efecto de los iones aportados por el reactor de calcio en el ostión Kumamoto durante su acondicionamiento reproductivo en SRA.

Determinar el tiempo y temperatura de aclimatación óptima para el ostión Kumamoto.

Realizar estudios con las larvas obtenidas al final del acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto.

Realizar nuevos prototipos de fraccionadores de espuma para la retención de sólidos en los SRA.

Estudiar el efecto del manejo del sistema, carbón- carbonatos en el metabolismo del calcio.

Estudiar el efecto del sistema carbón- carbonatos en la calidad de los gametos.

Se hacen las siguientes recomendaciones para determinar la excreción amoniacal durante la determinación de consumo de oxígeno:

- Generar un reservorio de agua proveniente de los SRA. El agua deberá estar filtrada a 10, 5 y 1 $\mu$  y pasada por radiación UV.
- Antes de introducir a los organismos a las cámaras metabólica, secarlos con papel secante para retirar el excedente de agua de sus valvas y evitar errores en la medición.

## Lista de referencias

- Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F., Weiner, S. (2006). Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemistry-A European Journal*, 12(4), 981–987.
- APHA (1995) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, edición 18, *American Public Health Association*, Washington, DC.
- Arnold, K. E., Findlay, H. S., Spicer, J. I., Daniels, C. L., Boothroyd, D. (2009). Effect of CO<sub>2</sub> related acidification on aspects of the larval development of the European lobster, *Homarus gammarus* (L.). *Biogeosciences Discuss*, 6(2), 3087–3107.
- Bamber, R. N. (1987). The effects of acidic sea water on young carpet-shell clams *Venerupis desussata* (L.) (Mollusca: Veneracea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 108(3), 241–260.
- Bamber, R. N., (1990). The effects of acidic seawater on three species of lamellibranch mollusc. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 143(3), 181–191.
- Bayne, B. L., Thompson, R. J. (1970). Some physiological consequences of keeping *Mytilus edulis* in the laboratory. *Helgoländer wiss Meeresunters*. 20(1-4), 526-552.
- 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(01), 39-58.
- Bayne, B. L., Gabbott, P. A., Widow, J. (1975). Some effects of stress in the adult on the eggs and larvae of *Mytilus edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 55(03), 675–689.
- Bayne, B.L., Newell, R.C. (1983). Physiological energetics of marine mollusks. In: K.M. Wilbur (editor). *The Mollusca*. 4(1), 407-515.
- Beniash, E., Ivanina, A., Lieb, N. S., Kurochkin, I., Sokolova, I. M. (2010). Elevated level of carbon dioxide affects metabolism and shell formation in oysters *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series*, 419, 95-108.
- Berge, J. A., Bjerkgeng, B., Pettersen, O., Schaanning, M. T., Oxnevad, S. (2006). Effects of increased sea water concentrations of CO<sub>2</sub> on growth of the bivalve *Mytilus edulis* L. *Chemosphere*, 62(4), 681–687.
- Bibby, R., Cleall-Harding, P., Rundle, S., Widdicombe, S., Spicer, J. (2007) Ocean acidification disrupts induced defences in the intertidal gastropod *Littorina littorea* *Biology Letters*, 3(6), 699-701.

- Bourget, E. (1983). Seasonal variations of cold tolerance in intertidal mollusks and its relation to environmental conditions In: *The St. Lawrence Estuary. Canadian Journal of Zoology*, 61(6), 1193-1201.
- Bradshaw, W.E., Holzapfel, C.M., (2007). Evolution of animal photoperiodism. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 1-25.
- Bricelj, V. M., Shumway, S. E., (1991). Physiology: energy acquisition and utilization. In: Shumway, S.E. (Ed.), *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Elsevier*, 305–337.
- 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(4), 1183-1189.
- Cáceres-Martínez J., Vásquez-Yeomans R., Guerrero-Rentería Y. (2012). Gametogenesis of Kumamoto oyster (*Crassostrea sikamea*). *Hidrobiológica*, 22 (2), 181-184.
- Cáceres-Martínez J., Vásquez-Yeomans R. (2013). Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones para la producción. *Ciencia Pesquera*, número especial 21, 5-48.
- Cariño, M. M., y Monteforte, M. (1995). History of pearling in the Bay of La Paz, South Baja California, Mexico (1533-1914). *Gems & Gemology*, 31(2), 108–126.
- Chávez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamiseza, J., Pouvreau, S., Barrett, J., Cochard, J., Le Pennec, M. (2002). Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture*, 214(1), 115–130.
- 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(1), 128-136.
- Chen, S., Ling J., Blancheton, J. P. (2006). Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 179–197.
- Clark, M. S., Thorne, M. A. S., Amaral, A., Vieira, F., Batista, F.M., Reis, J., Power, D. M (2013). Identification of molecular and physiological responses to chronic environmental challenge in an invasive species: the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecology and Evolution*, 3(10), 3283–3297.
- 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*, 34-47.

- CONAPESCA (2008). Programa maestro sistema producto ostión, Baja California. Ostiones de Baja California, A. C. Gobierno de México.
- Coutteau, P., Hadley, N. H., Manzi, J. J. y Sorgeloos, P. (1994). Effect of algal ration and substitution of algae by manipulated yeast diets on the growth of juvenile *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture*, 120(1), 135-150.
- Couturier, C., Aiken, D., (1989). Possible role of photoperiod in sea scallop reproduction. In *Proceedings of the annual meeting 1989, Aquaculture Association of Canada Symposium* (Vol. 89, No. 3, pp. 65-67).
- Cummings, V., Hewitt, J., Van Rooyen, A., Currie, K., Beard, S., Thrush, S., Norkko, J., Barr, N., Heath, P., Halliday, N. J., Sedcole, R., Gomez, A., McGraw, C., Metcalf, V. (2011). Ocean acidification at high latitudes: potential effects on functioning of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *PloS one*, 6(1), e16069.
- 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.
- Desanctis, P. N., Tetrault, K., Tettelbach, S. T., (2007). Effects of photoperiod manipulation on reproductive condition of the northern bay scallop *Argopecten irradians irradians*. *Veliger* 49, 15–18.
- Díaz Iglesias, E., Díaz Herrera, F., 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.
- 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.
- Ebeling, J. M., Timmons, M. B., Bisogni, J.J., (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1), 346–358.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S. (2005). Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*, 250(1), 458–470.
- FAO, (2008). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura. Factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. FAO Departamento de Pesca y Acuicultura. Recuperado de <http://www.fao.org/fishery/sofia/en>

- FAO, (2012). El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA). *FAO Departamento de Pesca y Acuicultura*. Recuperado de <http://www.fao.org/fishery/sofia/en>
- Farías, (2008). 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.
- Findlay, H. S., Wood, H. L., Kendall, M. A., Spicer, J. I., Twitchett, R. J., and Widdicombe, S. (2009). Calcification, a physiological process to be considered in the context of the whole organism. *Biogeosciences Discuss.*, 6(1), 2267–2284.
- 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(1), 98-105.
- Gallagher, S. M., Mann, R., Sasaki, G. C., (1986). Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture*, 56(2), 8-103.
- Gazeau, F., Quiblier C., Jansen, J. M., Gattuso, J. P., Middelburg J. J., Heip C. H. R. (2007). Impact of elevated CO<sub>2</sub> on shellfish calcification. *Geophysical Research Letters*, 34(7).
- Gazeau, F., Parker, L. M., Comeau, S., Gattuso, J. P., O'Connor, W. A., Martin, S., Pörtner, H. O., Ross, P. M. (2013). Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Mar Biol*, DOI: 10.1007/s00227-013-2219-3.
- Gordon, D. G., Blanton, N. E., Nosh, T. Y. (2001) .Heaven on the half shell. West Winds Press, Portland, 119.
- Green, E. J., Singh, D. E., Hicks, B. y Mccuaig, J. M. (1983). An Arctic intertidal population of *Macoma balthica*: (Mollusca, Pelecypoda): Genotypic and phenotypic components of population structure. *anadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40(9), 1360-1371.
- Hagopian, D. S, Riley, J. G., (1998). A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural Engineering*, 18(4), 223–244.
- Hand, S. C., and I. Hardewig. (1996). Down regulation of cellular metabolism during environmental stress. *Annual review of physiology*, 58(1), 58, 539–563.
- Heasman, M. P., O'Connor, W. A., Frazer, A. W. (1996). Temperature and nutrition as factors in conditioning broodstock of the commercial scallop *Pecten fumatus* Reeve. *Aquaculture*, 143(1), 75-90.
- 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(3), 673-684.

- Helm, M. M., Bourne M., Lovatelli, A. (2004). Hatchery culture of bivalves, A practical manual. FAO. Documento Técnico de Pesca.
- Holman, J. D., Burnett, K. G., and Burnett, L. E. (2004). Effects of hypercapnic hypoxia on the clearance of *Vibrio campbellii* in the blue crab, *Callinectes sapidus*, Biol. Bull. *The Biological Bulletin*, 206(3), 188–196.
- Hughes-Games, W. L. (1977). Growing the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) in subtropical sea water fish ponds. I. Growth rate, survival and quality index. *Aquaculture*, 11(3). 217-229.
- Imai, T. (1982). Aquaculture in shallow seas. Ed. A. A. Balkema/Rotterdam, pp.615.
- Kuhn, D. D., Angier, M. W., Barbour, S. L., Smith, S. A., Flick, G. J. Jr. (2013). Culture feasibility of eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in zero-water exchange recirculating aquaculture systems using synthetically derived seawater and live feeds. *Aquacultural Engineering*, 54, 45–48.
- Kurihara, H., Shimode, S., and Shirayama, Y. (2004): Effects of raised CO<sub>2</sub> concentration on the egg production rate and early development of two marine copepods (*Arctia steuri* and *Acartia erythraea*). *Mar. Poll. Bull.*, 49, 721–727.
- Lango-Reynoso, F. (1999). Détermination de la sexualité chez l'huitre *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). These de Doctorat d'Université, U.B.O., France, 170.
- Lannan, J. E., Robinson, A. K., Breese, W. P., (1980). Broodstock management of *Crassostrea gigas*: II. Broodstock conditioning to maximise larval survival. *Aquaculture*, 21, 337–345.
- Lawson, T. B., (1995). Water quality and environmental requirements. Fundamental of Aquacultural Engineering, vol. 1. *Chapman and Hall, London*, 12–39.
- Lekang, O. I. (2007). *Aquaculture engineering*. Singapore, Hong Kong, Blackwell, 340.
- Loosanoff, V. L., Davis, H. C., (1963). Rearing of Bivalve Mollusks. U.S. Bureau of Commercial Fisheries Biological Laboratory, Milford, Connecticut, 136.
- Lucas, I., Beninger, P.G. (1985). The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*. 44(3), 187-200.
- Magnesen, T., Jacobsen, A., (2012). Effect of water recirculation on seawater quality and production of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *Aquacultural Engineering*, 47, 1–6.
- Mallet, A. L., Carver, C. E., (2009). The effect of photoperiod on the reproductive development of the northern bay scallop, *Argopecten irradians irradians*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 374(2), 128–133.

- 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(1), 95-110.
- Martínez, G., Pérez, H. (2003). Effect of different temperature regimes on reproductive conditioning in the scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture*, 228(1), 153-167.
- Merino G., Uribe E., Soria, G., Brand, E. (2009). A comparison of larval production of the northern scallop, *Argopecten purpuratus*, in closed and recirculating culture systems. *Aquacultural Engineering*, 40(2), 95–103.
- Michaelidis, B., Ouzounis, C., Paleras, A., Portner, H. O. (2005) Effects of long-term moderate hypercapnia on acid–base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Ecol Prog Ser*, 293,109–118.
- Millican, P. F., Helm, M. M. (1994). Effects of nutrition on larvae production in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 123(1), 83-94.
- Muranaka, M.S., Lannan, J. E. (1984). Broodstock management of *Crassostrea gigas*: environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture*. 39(1), 217-228.
- Newell, R. C. y Pye, V. I. (1970). Seasonal changes in the effects of temperature on the oxygen consumption of the periwinkle *Littorina littorea* (L.) and the mussel *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 34: 367-383.
- Odell, L. H., Kirmeyer, G. J., Wilczak, A., Jacangelo, J. G., Marcinko, J. P., and Wolfe , R. L.. 1996. Controlling Nitrification in Chloraminated Systems. *Jour. AWWA*, 88(7), 86-98.
- Orr, J. C., Fabry, V. J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S. C., Feely, R. A., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R. M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, R. G., Plattner, G. K., Rodgers, K. B., Sabine, C. L., Sarmiento, J. L., Schlitzer, R., Slater, R. D., Totterdell, I. J., Weirig, M. F., Yamanaka, Y., Yool, A. (2005). Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437(7059), 681–686.
- Pauley, G. B., Der Raay, B., y Troutt, D. (1988). Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Northwest)-Pacific oyster. *United States Fish Wildlife Service Biological Report* 82 (11.85), 28.
- Pörtner, H.-O., Langenbuch, M., Reipschläger, A. (2004). Biological impact of elevated ocean CO<sub>2</sub> concentrations: lessons from animal physiology and Earth history. *Journal of Oceanography*, 60(4), 705-718.



- Pörtner, H.-O., Langenbuch, M., Michaelidis, B. (2005). Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO<sub>2</sub> on marine animals: From Earth history to global change. *Journal of Geophysical Research: Oceans (1978–2012)*, 110(C9).
- Poza-Boveda, J. V. y Rodríguez, R. J. (1987). Survival of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Gilging, 1828) in respect to temperature, salinity and ph variations. *Soc. Cienc. Nat. La Salle*. 47, 127-128.
- Price, K. S., Maurer, D., (1971). Holding and spawning Delaware Bay oysters (*Crassostrea virginica*) out of season. II. Temperature requirements for maturation of gonads. *Proc. Natl. Shellf. Assoc.* 61, 29-33.
- Quintana, R., Burnside, W. M. (2011). Rapid estimation of gonad-to-body ratio in eastern oysters by image analysis. *North American Journal of Aquaculture* 73, 451–455.
- Ricotta, I. S., Ramirez, J. L., Avila, S., Ibarra, A. M., (1998). Biochemical composition of gonad and muscle in the catarina scallop, *Argopecten ventricosus*, after reproductive conditioning under two feeding systems. *Aquaculture*, 163, 111–122.
- Ramírez, J. L., Avila, S., Ibarra, A. M. (1999). Optimization of forage in two food-filtering organisms with the use of a continuous, low-food concentration, agricultural drip system. *Aquacultural Engineering*, 20(3), 175–189.
- Raven J., Caldeira K., Elderfield, H., Hoegh-Guldberg, O., Liss, P., Riebesel, I U., Shepherd, J., Turley, C., Watson, A. (2005). Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide, Policy document 12/05, [www.royalsoc.ac.uk](http://www.royalsoc.ac.uk), The Royal Society, UK.
- Ren, J. S., Marsden, I. D., Ross, A. H., Schiel, D. R., (2003). Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand. *New Zeal. J. Mar. Fresh. Res.*, 37, 171– 182.
- Robinson, A. (1992). Gonadal cycle of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture*, 106(1), 89-97.
- Rodríguez-Jaramillo, C., Maeda-Martínez, A.N., Valdez, M.E., Reynoso-Granados, T., Monsalvo-Spencer, P., Prado-Ancona, D., Cardoza-Velasco, F., Robles-Mungaray, M., Sicard, M. T., (2001). The effects of temperature on the reproductive maturity of the penshell *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). *J. Shellfish Res.* 20, 39– 47.
- SAGARPA (2010). Plan rector: sistema producto ostión. Acciones para el fortalecimiento de cadenas productivas en baja California Sur. Gobierno de México. SAGARPA División de Pesca.

- 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(3), 325-346.
- Saldaña, S. (2012). Evaluación del desempeño reproductivo a través de la expresión de los genes *Cg-Foxl2*, *OyVlg*, *og-TGF-β* y *vlg* en diferentes cruces de *Crassostrea gigas* sometidas a diferentes temperaturas. Tesis Maestría. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur.
- Saout, C., Quéré, C., Donval, A., Paulet, Y.M., Samain, J., (1999). An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the bay of Brest (France). *Aquaculture*, 172(3), 301–314.
- Sastry, A.N., (1968). The relationships among food, temperature, and gonad development of the bay scallops, *Aequipecten irradians* Lamarck. *Physiological zoology*, 44-53.
- Sastry, A. N., (1979). Pelecypoda (excluding Ostreidae). In: A.C. Giese and J.S. Pearse (Editors), Reproduction of Marine Invertebrates. *Academic Press, New York, NY*. 113-292.
- 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(1), 377-387.
- 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(4), 819–831.
- Shpigel, M., Barber, B. J., Mann, R. (1992). Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 161(1). 15-25.
- Soria G., Merino G., Brand E. (2007). Effect of increasing salinity on physiological response in juvenile scallops *Argopecten purpuratus* at two rearing temperatures. *Aquaculture*, 270(1), 451–463.
- Spicer, J. I., Raffo, A., and Widdicombe, S. (2007). Influence of CO<sub>2</sub>- related seawater acidification on extracellular acid-base balance in the velvet swimming crab *Necora puber*. *Marine Biology*, 151(3), 1117–1125.
- Steele, S. y Mulcahy, M.F. (1999). Gametogenesis of oyster *Crassostrea gigas* in Southern Ireland. *Journal of Marine Biology Association. U.K.* 79(04), 673-668.

- Stephenson, R. R., (1973). Some aspects of reproduction of the oyster (*Ostrea edulis* L.), in the field and laboratory. Ph.D. Thesis, Marine Science Laboratory, University College of North Wales, 88.
- Talmage, S. C., Gobler, C. J. (2011) Effects of elevated temperature and carbon dioxide on the growth and survival of larvae and juveniles of three species of Northwest Atlantic bivalves. *PLoS ONE* 6(10):e26941.
- Thompson, R. J., Newell, R. I. E., Kennedy, V. S and Mann R. (1996). Reproductive processes and early development. *In* V. S. Kennedy, R. I. E. Newell and A. F. Eble, editors. The eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *College Park, MD. Maryland Sea Grant College*, 335-370.
- Timmons, M. R., Newell, V. and Mann, K. R. (1996). Reproductive processes and early development. *Maryland. Maryland Sea Grant Book*, 335-370.
- Timmons, M. B., Ebeling, J. M., Wheaton, F. W., Summerfelt, S. T., Vinci, B. J. (2002). Recirculating aquaculture systems. 2nd ed. Northeastern Regional, Aquaculture center.
- Timmons M., Ebeling, J. (2010). Recirculating Aquaculture. (2nd ed.) *Cayuga Aqua Ventures*.
- Urban, H. J. (1994). Upper temperature tolerance of ten bivalve species off Peru and Chile related to El Niño. *Mar. Ecol.* 107(1-2), 139-149.
- Uriarte, I., Farías, A., Hernandez, J., Schäfer, C., Sorgeloos, P. ( 2004). Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): effects of enriched diets. *Aquaculture*, 230(1), 349–357.
- Utting, S., Spencer B. (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(1), 45-54.
- 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.
- Wallis, R. L. (1977). Some aspects of the thermal tolerance of *Trichomya hirsuta* (Mollusca:Bivalvia) of Eastern Australia. *Mar. Biol.* 43 (3), 217-223.
- Widman, J. C. Jr., Meseck, S. L., Sennefelder, G., Veilleux, D. J. (2008). Toxicity of Un-ionized Ammonia, Nitrite, and Nitrate to Juvenile Bay Scallops, *Argopecten*

irradians irradians. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 54(3), 460–465.