

**Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada**



**Efecto Combinado de la Temperatura y la Alimentación
Sobre el Cultivo de Semillas de Ostion del Pacífico
Crassostrea gigas (Thunberg)**

TESIS

DOCTORADO EN CIENCIAS

CECILIA FLORES VERGARA

ENSENADA BAJA CFA, MEXICO JULIO DE 2006

TESIS DEFENDIDA POR

CECILIA FLORES VERGARA

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Director del Comité



Dr. Benjamín Barón Sevilla
Miembro del Comité



Dra. Carmen Panjagua Chávez
Miembro del Comité



Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Miembro del Comité



Dr. Alexei F. Licea Navarro
Coordinador del Programa de Posgrado



Dr. Raúl Ramón Castro Escamilla
Director de Estudios de Posgrado

13 de Julio de 2006

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



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA**

**EFFECTO COMBINADO DE LA TEMPERATURA Y LA ALIMENTACIÓN SOBRE EL
CULTIVO DE SEMILLAS DE OSTIÓN DEL PACÍFICO
Crassostrea gigas (THUNBERG).**

TESIS

**que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS**

Presenta:

CECILIA FLORES VERGARA

Ensenada, Baja California, México, Julio del 2006.

RESUMEN de la tesis de CECILIA FLORES VERGARA, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS con orientación en ACUICULTURA. Ensenada, Baja California. Julio de 2006

**EFFECTO COMBINADO DE LA TEMPERATURA Y LA ALIMENTACIÓN
SOBRE EL CULTIVO DE SEMILLAS DE OSTIÓN DEL PACÍFICO
Crassostrea gigas (THUNBERG).**

Resumen aprobado por:


Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Director de Tesis

El ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* es una de las principales especies acuáticas de interés económico en el ámbito mundial. En la parte Noroeste de México existe una producción importante de esta especie, producción anual que se ha mantenido en 500 toneladas en promedio, pero que los productores pretenden incrementar. Sin embargo, estas proyecciones se han visto amenazadas debido a que desde 1997 se han suscitado eventos de mortalidad masiva de semillas de ostión, mayores al 80%, principalmente en los meses de verano y que ha sido atribuida a la llamada "mortalidad de verano" que también ha causado pérdidas recientes en diversas partes del mundo.

Para buscar soluciones a este problema se han realizado investigaciones que han sido dirigidas principalmente a enfermedades y a aspectos genéticos y de nutrición. En este trabajo se evaluó el efecto de diferentes temperaturas y dietas microalgales en semillas de ostión *C. gigas* sobre el crecimiento, la composición bioquímica, el consumo de oxígeno y la excreción de amonio como indicadores de estrés.

Estas semillas se cultivaron a las temperaturas de 20°C, 23°C, 26°C, 29°C y 32°C y se alimentaron con dietas de microalgas de alta y baja calidad nutricia (*Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis* sp., *Pavlova lutheri* y *Dunaliella tertiolecta*).

Las microalgas proporcionadas a las semillas de ostión tuvieron valores similares en los diferentes parámetros evaluados en este estudio. El promedio de peso seco orgánico fue de 160 µg ml⁻¹, proteínas de 48-51%, carbohidratos de 12-15% y lípidos de 36-38%. El contenido calórico de las dietas fue también similar, alrededor de 2,475 calorías, excepto para *D. tertiolecta* que proporcionó 4,435 calorías. En los ácidos grasos de las dietas sólo hubo diferencia significativa en *D. tertiolecta*. En esta última se encontraron altos porcentajes de los ácidos grasos saturados 14:0, 16:0 y 18:0, bajo porcentaje del ácido graso monoinsaturado 16:1, concentraciones traza del 18:2 y 18:3 y ausencia de los ácidos grasos poliinsaturados 18:4, 20:4, 20:5 y 20:6.

La tasa de filtración (Tf) de *C. gigas* fue similar con las tres dietas. La mayor Tf se obtuvo, en general, en las primeras horas (3.4 mg h⁻¹ semilla). Las semillas tuvieron buen crecimiento por debajo de los 32°C, sobretodo en las semillas mantenidas alrededor de 24°C. A 32°C el crecimiento de las semillas fue mínimo y murieron a la quinta semana. La supervivencia de las semillas por debajo de los 32°C fue del 75% al 100%. La composición

proximal de las semillas de *C. gigas* fue afectada por cambios en la temperatura. Las proteínas y carbohidratos de las semillas disminuyeron y los lípidos se incrementaron cuando se elevó la temperatura. Los ácidos grasos saturados de las semillas se incrementaron, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados disminuyeron cuando se elevó la temperatura. El consumo de oxígeno de *C. gigas* tuvo un intervalo de 0.3-4.3 ml O₂ h⁻¹ g⁻¹ y la excreción de amonio de 4-152 μg NH₄ h⁻¹ g⁻¹. Ambos parámetros se incrementaron cuando se incrementó la temperatura, principalmente después de los 26°C. Mientras que la proporción O:N de las semillas disminuyó. Valores bajos, menores a 50, de la proporción O:N desde los 26°C indican la posibilidad de que el sustrato catabolizado principal fueron las proteínas. Altos niveles de temperatura, como aquellos alcanzados cuando baja la marea, pueden ser un fuerte factor estresante que afecta a las semillas de ostión del Pacífico, especialmente cuando la calidad y cantidad del alimento disponible es baja.

Palabras clave: Microalgas, dietas, *Crassostrea gigas*, composición bioquímica, fisiología.

ABSTRACT of the thesis presented by CECILIA FLORES VERGARA as a partial requirement to obtain the DOCTOR OF SCIENCE degree in AQUACULTURE. Ensenada, Baja California. July, 2006

COMBINED EFFECTS OF TEMPERATURE AND DIETS ON THE CULTURE OF PACIFIC OYSTER *Crassostrea gigas* (THUNBERG) SPATS

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is one of the main worldwide aquatic species of economic interest. At northwestern Mexico there is an important sustained production, around 500 tons, and producers pretend to increase it. Unfortunately, these projections have been threatened because since 1997 events of massive oyster spat mortality, higher than 80%, have been occurred, mainly in the summer, which have been attributed to the summer mortality syndrome which caused recent loss at several sites worldwide. To search for solutions to this problem research is conducted on diseases, genetic and nutritional aspects. In this work, I evaluated the combined effect of temperature and microalgal diet on growth, biochemical composition, fatty acids, oxygen consumption and ammonia excretion of the Pacific oyster *C. gigas* spats as indicators of nutritional stress.

The oyster spats were cultured at 20°C, 23°C, 26°C, 29°C and 32°C and fed with microalgal diets with high and low nutritional quality (*Chaetoceros calcitran*, *Isochrysis* sp., *Pavlova lutheri* y *Dunaliella tertiolecta*). The microalgae fed to oyster spats, resulted in similar values of the parameters evaluated in this study. The average ash free dry weight of the microalgae was 160 µg ml⁻¹, proteins were 48-51%, carbohydrates were 12-15% and lipids were 36-38%. The caloric content of diets was also similar, near 2,475 calories, except to *D. tertiolecta* which supplied 4,435 calories. With respect to the fatty acids, *D. tertiolecta* was different from the other diets, it had high percentages of saturated fatty acids 14:0, 16:0 y 18:0, low percentage of the monounsaturated fatty acid 16:1, trace concentration of 18:2 and 18:3 and lack of the polyunsaturated fatty acids 18:4, 20:4, 20:5 y 20:6. The filtration rate (fr) of the spats was similar among the three diets. Faster fr (3.4 mg h⁻¹ spat⁻¹) was obtained, in general, among the three first hours after feeding. Spats grew well at temperatures below 32°C, mainly those kept near 24°C. At 32°C growth was minimal and spats died on fifth week. Spat survival in those kept below 32°C was between 88% and 100%. The biochemical composition of the oyster spats was affected by changes on temperature. Proteins and carbohydrates of the spats decreased and lipids increased when temperature raised. The saturated fatty acids increase, while polyunsaturated fatty acids decreased when temperature raised. The oxygen consumption of the spats was between 0.4 a 6.2 mgO₂ h⁻¹g⁻¹ and ammonia excretion was between 4-152 µg NH₄ h⁻¹g⁻¹. Both parameters increased with temperature, mainly above 26°C, while the O:N ratio decreased. Low values of O:N ratio, lower than 50, from and about 26°C, indicated the possibility that proteins were the main catabolized substrate. High temperature levels, as those achieved at low tide stages, could be an important stressor on Pacific oyster spats, specially when the quality and quantity of the available food is poor.

Key words: Microalgae, diets, *Crassostrea gigas*, biochemical composition, physiology

Dedico esta tesis con todo mi amor

a mis hijos Pablo y Raúl;

y en especial a mi esposo Leo

También con mucho cariño

a toda mi familia, amigos y maestros.

GRACIAS POR SU AMOR Y APOYO

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, **CONACYT**, por la beca que me proporcionó durante mis estudios de postgrado y por todo el apoyo que ofrece a la investigación.

Al Sistema de Investigación del Mar de Cortés, **SIMAC**, por el financiamiento otorgado para la realización de mi trabajo de tesis doctoral, parte importante para la conclusión de este y muchos trabajos.

A la empresa **MAXMAR** por la donación de las semillas de ostión *Crassostrea gigas*. Ahora ubicados en "El Rincón de ballenas" Baja California.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, **C.I.C.E.S.E.**, por todas las facilidades otorgadas para mi formación, desde el inicio de mis estudios de postgrado, tanto de maestría como de doctorado. Gracias por todo su apoyo.

Con mucho cariño a mi directora de tesis, **Dra. Beatriz Cordero Esquivel**, porque además de brindarme su apoyo y confianza siempre ha sido una gran amiga. Gracias a ella concluí esta etapa de mi formación.

A la **Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega**, por su apoyo y participación en el trabajo y elaboración de esa tesis, en especial por la instrucción para el funcionamiento del Cromatógrafo de Gases. Gracias por su amistad y cariño.

Al **Dr. Benjamín Barón Sevilla**, por su gran apoyo en la ejecución de los diversos experimentos en el laboratorio de fisiología, por sus observaciones, análisis de datos y los comentarios para la conclusión de esta tesis. Agradezco sus consejos y amistad.

A la **Dra. Carmen Paniagua Chávez**, por todo el apoyo brindado para este trabajo de tesis, desde el análisis de datos hasta la elaboración del escrito final. Gracias por la confianza y amistad.

Al **Dr. Fernando Díaz Herrera**, por su apoyo desde las primeras propuestas para los diversos experimentos de fisiología, en especial, por proporcionar el respirómetro y material para los experimentos del consumo de oxígeno y excreción de amonio.

A los investigadores del C.I.C.E.S.E. que hayan facilitado mi trabajo de tesis. Con un agradecimiento especial a aquellos que fueron mis profesores. Al Dr. Eugenio Iglesias y a Pilar Sánchez Saavedra por su comprensión cuando trabajamos en los diferentes laboratorios.

A los técnicos **Biol. Norberto Flores** y **Biol. Patricia Ascencio** porque su ayuda en los experimentos fue fundamental. También gracias a los técnicos Francisco Valenzuela,

Adrián Celaya, José Espinoza y Luis Murillo, encargados del funcionamiento del laboratorio húmedo.

Al personal Administrativo, en especial a **Dolores Sarracino, Citlali Romero e Ivonne Best**. También a las encargadas de la Biblioteca, especialmente a **Guadalupe Morales** por su gran ayuda y compañerismo.

A mis amigos: **Ana Nallely y Gabriel, Lizza y Alex, Diana, Saúl, Alberto y Ana, Gabriel y Billy** por el lazo amistad y cariño que nos une y por el tiempo que compartimos. Un especial agradecimiento a **Ana Calero** por todo su apoyo.

A las Secretarias **Cecilia Loera, Ma. Elena Corona y Bibiana Medina**, por todas las atenciones prestadas.

Gracias infinitas a todos aquellos que me brindaron su amistad y apoyo.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	10
II.1. Objetivo General.....	10
II.2. Objetivos Específicos.....	10
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
III.1. Dietas para las semillas de ostión <i>C. gigas</i>	12
III.1.1. Microalgas utilizadas	12
III.1.2. Condiciones de cultivo de las microalgas.....	12
III.1.3. Peso seco orgánico de las microalgas.....	13
III.1.4. Composición bioquímica de las microalgas.....	14
III.1.4.1. Composición proximal de las microalgas.....	14
III.1.4.2. Ácidos grasos de las microalgas	15
III.1.5. Análisis de calorimetría de las microalgas	16
III.2. Diseño experimental para el cultivo de semillas de ostión <i>C. gigas</i>	17
III.2.1. Experimento 1 (selección de dietas de alta calidad nutricia para semillas de ostión <i>C. gigas</i>)	17
III.2.2. Experimento 2 (efecto interactivo de la temperatura y de la dieta en las semillas de ostión <i>C. gigas</i>).....	18
III.3. Cultivo de las semillas de ostión <i>C. gigas</i>	19
III.3.1. Obtención de semillas.....	19
III.3.2. Condiciones de cultivo de las semillas de ostión.....	19
III.4. Crecimiento y supervivencia de semillas de ostión <i>C. gigas</i> ...	20
III.5. Composición bioquímica de las semillas de ostión <i>C. gigas</i>	20
III.6. Consumo de oxígeno de las semillas de ostión <i>C. gigas</i>	21
III.7. Excreción de amonio de las semillas de ostión <i>C. gigas</i>	22
III.8. Proporción oxígeno-nitrógeno O:N de las semillas de ostión <i>C.</i> <i>gigas</i>	23
III.9. Análisis estadísticos.....	23
III.9.1. Evaluaciones de los cultivos de microalgas.....	23
III.9.2. Evaluaciones del cultivo de semillas del ostión <i>C. gigas</i>	24
IV. RESULTADOS.....	25
IV.1. Dietas para las semillas de ostión <i>C. gigas</i>	25
IV.1.1. Peso seco orgánico y composición proximal de las dietas de microalgas	25
IV.1.2. Ácidos grasos de las dietas de microalgas.....	26
IV.1.3. Análisis de calorimetría de las dietas de microalgas....	28

CONTENIDO (Continuación)	Página
IV.2. FISIOLÓGIA DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN <i>C. gigas</i>	29
IV.2.1. CRECIMIENTO DE LAS SEMILLAS DE OSTION <i>C. gigas</i>	29
IV.2.1.1. Experimento 1 (selección de dietas de alta calidad nutricia para semillas de ostión <i>C. gigas</i>)	29
IV.2.2.2. Experimento 2 (efecto interactivo de la temperatura y de la dieta en semillas de ostión <i>C. gigas</i>).....	31
IV.2.2. SUPERVIVENCIA DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN <i>C. gigas</i>	35
IV.2.3. COMPOSICION PROXIMAL DE SEMILLAS DE OSTIÓN <i>C. gigas</i>	37
IV.2.3.1. Proteínas	37
IV.2.3.2. Carbohidratos	41
IV.2.3.3. Lípidos	43
IV.2.3.4. Ácidos grasos de las semillas de ostión <i>C. gigas</i>	45
IV.2.4. CONSUMO DE OXIGENO DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN <i>C. gigas</i>	54
IV.2.5. EXCRECIÓN DE AMONIO DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN <i>C. gigas</i>	59
IV.2.6. PROPORCIÓN O:N DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN <i>C. gigas</i>	62
V. DISCUSIÓN	65
V.1. CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN <i>C. gigas</i>	65
V.2. COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN <i>C. gigas</i>	69
V.3. CONSUMO DE OXÍGENO DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN <i>C. gigas</i>	74
V.4. EXCRECIÓN DE AMONIO DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN <i>C. gigas</i>	77
V.5. PROPORCIÓN OXÍGENO NITRÓGENO (O:N) DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN <i>C. gigas</i>	80
VI. CONCLUSIONES	84
LITERATURA CITADA.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Producción mundial de ostión <i>C. gigas</i> de 1950 a 2003. El volumen en millones de toneladas y el valor económico en billones de dólares americanos (FAO-FIGIS, 2005)	3
2.	Sistema de cultivo de microalgas y de las semillas de ostión del Pacífico <i>C. gigas</i> , durante los experimentos realizados en el laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE	13
3.	Respirómetro semi-abierto, provisto con 30 cámaras respirométricas de 50 ml, utilizado para evaluar el consumo de oxígeno y la excreción de amonio en semillas de ostión <i>C. gigas</i> expuestas a diferentes tratamientos de temperatura y alimentación (Experimentos 1 y 2)	22
4.	Crecimiento en longitud de la concha (mm) de las semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> cultivadas a 23, 26, 29 y 32°C; alimentadas con una mezcla de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i> (IP) y con la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Dt)	32
5.	Crecimiento en peso húmedo (mg) de las semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> , cultivadas a 23, 26, 29 y 32°C y alimentadas con una mezcla de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i> (IP) y con la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Dt)	33
6.	Peso seco total (mg) de semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> , cultivadas a 23, 26, 29 y 32°C; alimentadas con una mezcla de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i> (IP) y con la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Dt)	34
7.	Crecimiento en peso seco orgánico (mg) de las semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> , cultivadas a 23, 26, 29 y 32°C; alimentadas con una mezcla de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i> (IP) y la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Dt).....	35
8.	Supervivencia de semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> , cultivadas a 20, 23 y 26°C y alimentadas con tres dietas de microalgas, <i>Chaetoceros calcitrans</i> - <i>Isochrysis</i> sp. (CI), <i>C. calcitrans</i> - <i>Pavlova lutheri</i> (CP) e <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i> (IP)	36
9.	Supervivencia de semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> , cultivadas a 23, 26, 29 y 32°C y alimentadas con una mezcla de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i> (IP) y con la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Dt).....	37

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
10.	Porcentaje de proteínas de las semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con tres mezclas de microalgas <i>Chaetoceros calcitrans-Isochrysis</i> sp., <i>C. calcitrans-Pavlova lutheri</i> e <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i> , cultivadas a 20, 23 y 26°C, en la octava semana de cultivo.....	38
11.	Porcentaje de proteínas en las semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con una mezcla de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i> y con la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> , cultivadas a 23, 26, 29 y 32°C, durante la cuarta y octava semana de cultivo	39
12.	Comparaciones múltiples entre los porcentajes promedio de proteínas, carbohidratos y lípidos de las semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con una mezcla de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i> (IP) y con la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Dt), en la octava semana de cultivo a 23, 26, 29 y 32°C	40
13.	Porcentaje de carbohidratos de las semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con tres mezclas de microalgas <i>Chaetoceros calcitrans-Isochrysis</i> sp., <i>C. calcitrans-Pavlova lutheri</i> e <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i> , en la octava semana de cultivo a 20, 23 y 26°C	41
14.	Porcentaje de carbohidratos de las semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con una mezcla de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i> y con la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> , durante la cuarta y octava semana de cultivo a 23, 26, 29 y 32°C	42
15.	Porcentaje de lípidos de las semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con tres mezclas de microalgas <i>Chaetoceros calcitrans-Isochrysis</i> sp., <i>C. calcitrans-Pavlova lutheri</i> e <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i> , en la octava semana de cultivo a 20, 23 y 26°C	44
16.	Porcentaje de lípidos de las semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con una mezcla de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i> y con la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> , cultivadas a 23, 26, 29 y 32°C, durante la cuarta y octava semana de cultivo	45
17.	Comparaciones múltiples entre las medias del contenido de ácidos grasos saturados (AGS) y poliinsaturados (AGPI) en semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con una mezcla de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i> (IP) y con la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Dt), en la octava semana de cultivo a 23, 26, 29 y 32°C	53

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura	Página
<p>18. Consumo de oxígeno específico de las semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con tres mezclas de las microalgas, <i>Chaetoceros calcitrans-Isochrysis</i> sp., <i>C. calcitrans-Pavlova lutheri</i> e <i>Isochrysis</i> sp.-<i>P. lutheri</i>, cultivadas a 20, 23 y 26°C. El consumo de oxígeno se expresa en mg de oxígeno consumido por hora por gramo de peso seco orgánico de las semillas de ostión</p>	54
<p>19. Consumo de oxígeno individual de semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con tres mezclas de las microalgas, <i>Chaetoceros calcitrans-Isochrysis</i> sp., <i>C. calcitrans-Pavlova lutheri</i> e <i>Isochrysis</i> sp.-<i>P. lutheri</i>, cultivadas a 20, 23 y 26°C. El consumo de oxígeno se expresa en µg de oxígeno consumido por hora por semilla.....</p>	55
<p>20. Consumo de oxígeno específico de las semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con una mezcla de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp.-<i>Pavlova lutheri</i> (IP) y con la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Dt), a 23, 26, 29 y 32°C, a la cuarta y octava semana de cultivo. El consumo de oxígeno se expresa en mg de oxígeno consumido por hora por gramo de peso seco orgánico de las semillas de ostión</p>	57
<p>21. Consumo de oxígeno individual de las semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con una mezcla de las microalgas <i>Isochrysis</i> sp.-<i>Pavlova lutheri</i> (IP) y con la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Dt), a 23, 26, 29 y 32°C, durante la cuarta y octava semana de cultivo. El consumo de oxígeno se expresa en µg de oxígeno consumido por hora por semilla</p>	58
<p>22. Excreción de amonio específica, de las semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con tres mezclas de las microalgas, <i>Chaetoceros calcitrans-Isochrysis</i> sp., <i>C. calcitrans-Pavlova lutheri</i> e <i>Isochrysis</i> sp.-<i>P. lutheri</i> cultivadas a 20, 23 y 26°C. El amonio se expresa en µg de amonio excretado por hora por gramo de peso seco orgánico de ostión.....</p>	59
<p>23. Excreción de amonio individual de las semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con tres mezclas de las microalgas, <i>Chaetoceros calcitrans-Isochrysis</i> sp., <i>C. calcitrans-Pavlova lutheri</i> e <i>Isochrysis</i> sp.-<i>P. lutheri</i> cultivadas a 20, 23 y 26°C. El amonio se expresa en µg de amonio excretado por hora por semilla.....</p>	60

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
24	Excreción de amonio específica de semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con la mezcla de microalgas <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i> (IP) y con la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Dt), a 23, 26, 29 y 32°C	61
25	Excreción de amonio individual de semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con la mezcla de microalgas <i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i> (IP) y con la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Dt), a 23, 26, 29 y 32°C	62

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
<p>I. Peso seco orgánico ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de las mezclas de microalgas utilizadas durante los experimentos de crecimiento de semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i>. CI: <i>Chaetoceros calcitrans</i>- <i>Isochrysis</i> sp.; CP: <i>C. calcitrans</i>-<i>Pavlova lutheri</i>; IP: <i>Isochrysis</i> sp.-<i>P. lutheri</i>; Dt: <i>Dunaliella tertiolecta</i></p>	25
<p>II. Composición bioquímica porcentual de las dietas utilizadas para alimentar a las semillas de ostión <i>Crassostrea gigas</i>, en los experimentos 1 y 2. El porcentaje promedio se calculó con base en el peso seco orgánico.....</p>	26
<p>III. Composición de ácidos grasos (porcentaje con base en el total de los ácidos grasos) de las dietas utilizadas para alimentar a las semillas de ostión <i>Crassostrea gigas</i>, en los experimentos 1 y 2. CI: <i>Chaetoceros calcitrans</i>-<i>Isochrysis</i> sp.; CP: <i>C. calcitrans</i>-<i>Pavlova lutheri</i>; IP: <i>Isochrysis</i> sp.-<i>P. lutheri</i>; Dt: <i>Dunaliella tertiolecta</i>.....</p>	27
<p>IV. Contenido calórico (calorías g^{-1}) promedio de las mezclas de microalgas suministradas a las semillas de ostión <i>Crassostrea gigas</i></p>	29
<p>V. Crecimiento en longitud (mm) y peso (mg) de las semillas de ostión <i>Crassostrea gigas</i>, después de ocho semanas de cultivo a 20, 23 y 26°C y alimentadas con tres dietas de microalgas. CI: <i>Chaetoceros calcitrans</i>-<i>Isochrysis</i> sp. CP: <i>C. calcitrans</i>- <i>Pavlova lutheri</i> e IP: <i>Isochrysis</i> sp.- <i>P. lutheri</i></p>	30
<p>VI. Composición de ácidos grasos (porcentaje con base en el total de ácidos grasos) de semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea. gigas</i> mantenidas a 20, 23 y 26°C y alimentadas con tres dietas, combinaciones de las microalgas <i>Chaetoceros calcitrans</i>, <i>Isochrysis</i> sp.y <i>Pavlova lutheri</i></p>	47
<p>VII. Composición de ácidos grasos (porcentaje con base en el total de ácidos grasos) de semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con <i>Isochrysis</i> sp.-<i>Pavlova lutheri</i> y con <i>Dunaliella tertiolecta</i>, cultivadas a 23, 26, 29, y 32°C, a la cuarta semana de cultivo</p>	49
<p>VIII. Composición de ácidos grasos (porcentaje con base en el total de ácidos grasos) de semillas de ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> alimentadas con <i>Isochrysis</i> sp.-<i>Pavlova lutheri</i> y con <i>Dunaliella tertiolecta</i>, cultivadas a 23, 26, 29, y 32°C, a la octava semana de cultivo</p>	51

LISTA DE TABLAS (Continuación)

Tabla		Página
IX.	La proporción oxígeno nitrógeno (O:N) en semillas de ostión <i>Crassostrea gigas</i> , cultivadas a 20, 23 y 26°C, alimentadas con tres dietas de microalgas CI: <i>Chaetoceros calcitrans</i> - <i>Isochrysis</i> sp. CP: <i>C. calcitrans</i> - <i>Pavlova lutheri</i> e IP: <i>Isochrysis</i> sp.- <i>P. lutheri</i>	63
X.	La proporción oxígeno nitrógeno O:N de las semillas de ostión <i>Crassostrea gigas</i> . Semillas cultivadas a 23, 26, 29 y 32°C y alimentadas con las dietas de microalgas. IP: <i>Isochrysis</i> sp- <i>Pavlova lutheri</i> y Dt: <i>Dunaliella tertiolecta</i> ...	64
XI.	Consumo de oxígeno de moluscos bivalvos, publicados por diversos autores y los resultados promedio de los dos experimentos obtenidos en este estudio ..	78
XII.	Excreción de amonio de moluscos bivalvos, publicados por diversos autores y los resultados promedio de los dos experimentos obtenidos en este estudio ..	81

**EFFECTO COMBINADO DE LA TEMPERATURA Y LA ALIMENTACIÓN
SOBRE EL CULTIVO DE SEMILLAS DE OSTIÓN DEL PACÍFICO**
Crassostrea gigas (Thunberg).

I. INTRODUCCIÓN

Los moluscos bivalvos tienen una gran importancia en muchas partes del mundo, debido a que han representado una derrama económica significativa (Shpigel y Blaylock, 1991; Bayne, 2002). Para el año 2002 se obtuvieron producciones por acuicultura de 10.5 billones de dólares americanos (FAO-SOFIA, 2004). Estos moluscos son utilizados principalmente como alimento para consumo humano, como bioindicadores en la investigación ambiental marina y para ornato (Fidalgo *et al.*, 1994).

Dentro de este grupo, el cultivo del ostión es uno de los más atractivos, debido a que su tasa de crecimiento es rápida y porque tienen gran tolerancia a amplios intervalos de temperatura, salinidad y sedimentos en suspensión (Shpigel y Blaylock, 1991; Bayne, 2002). La ostricultura representa aproximadamente una cuarta parte de la producción acuícola de moluscos marinos a nivel mundial.

El ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* es una de las principales especies acuáticas de interés económico y cuenta con un sistema de cultivo bien establecido a nivel internacional. Es una especie nativa de Japón pero su cultivo se ha extendido en el mundo y se ubica en el segundo lugar entre las diez principales especies que sustentan la acuicultura mundial, ya que alcanzó una producción mundial de 4.4 millones de toneladas en el 2003 (FAOSTAT, 2003), con una derrama económica de 3.7 billones de dólares americanos (Fig.1) (FAO-FIGIS, 2005).

El ostión *C. gigas* se introdujo en México (Baja California), en 1972 y actualmente, los productores de la región tienen un completo dominio de su cultivo a nivel artesanal (Mazón, 1996; Garduño-Franco, 2001). En aguas del Pacífico mexicano, *C. gigas* puede alcanzar la talla comercial de 8-12 cm con un peso mayor de 90 g a los 6-9 meses de engorda (Palacios-Fest *et al.*, 1988; Mazón, 1996) y la talla para exportación de 12.5 cm a los 12 meses. La producción resultante de la Ostricultura en México es variable, pero se ha mantenido arriba de las 50,000 toneladas en peso vivo, con una derrama económica superior a los 100 millones de pesos (SIEAP, 2004).

La producción de *C. gigas* en Baja California (México) había mantenido un promedio de 500 toneladas, sin embargo esta producción tuvo una caída de casi el 50% después de 1998 y se mantuvo debajo de las 500 toneladas hasta el 2001. Aunque la producción se incrementó a 619 toneladas para el año 2003, contaba con 242 toneladas para el cuatrimestre enero-abril de 2004 (SIEAP, 2004). La derrama económica de esta actividad ostrícola también ha sido variable, pero fue superior a los 10 millones de pesos en el año 2001 (Garduño-Franco, 2001).

Una de las principales limitantes para el cultivo de esta especie ha sido la presencia de enfermedades en varias partes del mundo. En las costas del Pacífico, desde Alaska hasta California, se han presentado eventos de mortalidad masiva de ostiones en los meses de verano, de junio a septiembre. En Europa, las pérdidas de semilla de ostión, también se han atribuido a la mortalidad de verano (Perdue *et al.*, 1981; Cheney *et al.*, 1998).

En Washington, Oregon, California y Japón también se tuvieron mortalidades en los ostiones cultivados, mayores a las registradas desde los años 60's (Perdue *et al.*, 1981;

Renault *et al.* 1994, Cheney *et al.*, 1998). Renault *et al.* (1994), reportaron en Francia mortalidades del 80 al 90% en semillas de ostión con una infección viral tipo herpes.

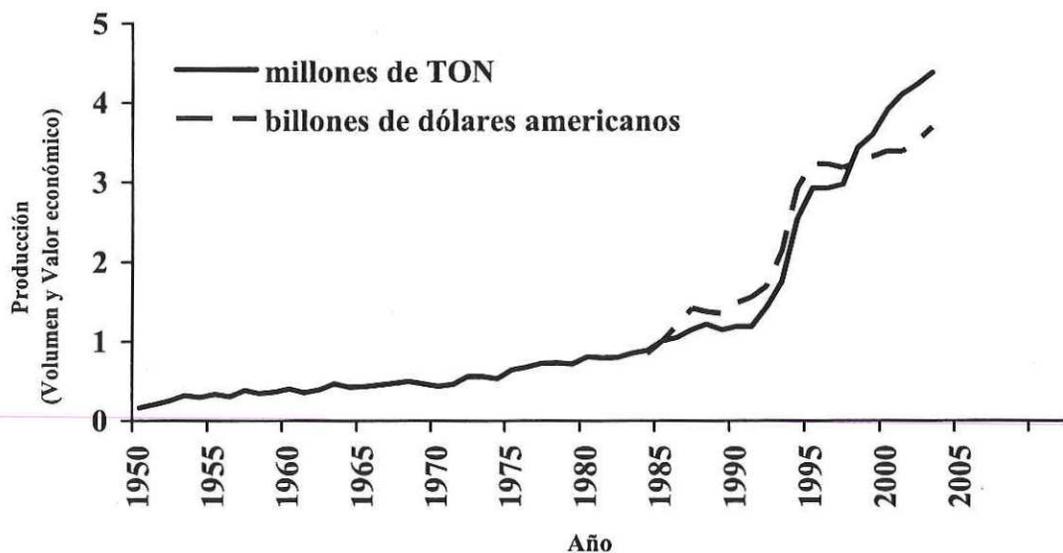


Figura 1.- Producción mundial de ostión *C. gigas* de 1950 a 2003. El volumen en millones de toneladas y el valor económico en billones de dólares americanos (FAO-FIGIS, 2005).

En México también se suscitaron altas mortalidades de *C. gigas*. En Sonora y Baja California Sur, en 1997, se detectaron eventos de mortalidad masiva de ostión en semillas, juveniles y adultos. En 1998 hubo una mortalidad inusual, mayor de 80%, de ostiones cultivados en Bahía Falsa, San Quintín B.C., lo que hizo que productores, autoridades acuícolas y académicos se reunieran para buscar las soluciones a este problema (Vázquez-Yeomans *et al.*, 2004).

Lo anterior, ha conducido a que se realicen estudios para identificar las posibles causas de este problema, desde la aparición de enfermedades por parásitos, bacterias y virus (Elston, 1993; Vázquez-Yeomans y Cáceres-Martínez, 2004; Vázquez-Yeomans *et al.*, 2004, Vázquez-Yeomans, 2006), hasta la posible reducción en la variabilidad genética,

relacionada con la producción de semilla (número reducido de reproductores) que podría propiciar los episodios de mortalidades extensas (Saavedra, 1997).

Adicionalmente, existen dos factores que también deben tomarse en cuenta y que pueden estar fuertemente relacionados con los episodios de mortalidad: 1) el alimento, su disponibilidad y tipo (Sara y Mazola, 1997), y 2) la temperatura (Cheney *et al.*, 2000), estos dos factores que interactúan en el medio pueden provocar un estrés nutritivo que aumente la susceptibilidad de los animales a las enfermedades y por lo tanto es importante evaluarlos en el cultivo, tanto del ostión como de otras especies de bivalvos.

Muchos estudios han evidenciado la importancia de la calidad del alimento suministrado a los organismos cultivados. A este respecto, durante la última década se han realizado trabajos relacionados con la composición bioquímica de las microalgas utilizadas como dieta para organismos acuáticos, sobre todo en lo que respecta al contenido de ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido eicosapentaenóico (20:5 n-3) y el docosahexaenóico (22:6 n-3) (Enright *et al.*, 1986; Napolitano *et al.*, 1988; Knauer y Southgate, 1997), considerados como esenciales para el crecimiento del ostión (Brown *et al.*, 1998). Por lo anterior, se ha encontrado que las dietas constituidas de mezclas de microalgas, utilizadas para algunas especies de bivalvos, generalmente resultan en un mayor crecimiento y mejor calidad de larvas y semillas (Berntsson *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1998; Leonardos y Lucas, 2000), en contraste con aquellos alimentados con dietas monoalgales (Epifanio, 1979), por lo cual, es recomendable la utilización de mezclas de dos o más microalgas. Se ha observado un efecto sinérgico positivo con las mezclas que han incluido *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Pavlova lutheri* y *Tetraselmis*

suecica (Brown *et al.*, 1998; Devakie y Ali, 2000; Laing, 2000; Cerón, 2000; Flores-Vergara *et al.*, 2004).

Otros aspectos, también relacionados con la dieta, que se deben considerar para que el cultivo de bivalvos sea eficiente, son: la calidad de la dieta y la ración ofrecida, la tasa de filtración, el estado fisiológico del organismo y otras variables como la temperatura.

En los moluscos bivalvos se ha demostrado el efecto de la temperatura sobre muchos procesos fisiológicos, como la filtración, la alimentación, el crecimiento, la composición bioquímica, la respiración y la reproducción (Bayne *et al.*, 1976; Malouf y Breeze, 1977; Incze *et al.*, 1980; Shpigel *et al.*, 1992; Laing, 2000).

Los valores óptimos de temperatura para el crecimiento del ostión del pacífico se encuentran entre 12 y 26 °C, mas allá de los límites de este intervalo, se presenta un estrés nutricional y el crecimiento se detiene a temperaturas cercanas a los 30 °C; cuando la temperatura se mantiene entre 33 y 37 °C se produce un choque térmico, dependiendo de la temperatura de aclimatación (Friedman *et al.*, 1998). Niveles altos de temperatura pueden causar estrés por calor y un cese de la síntesis proteica en los animales poiquilotermos. Aún las temperaturas extremas que se encuentran normalmente en periodos diarios o estacionales, pueden ocasionar una respuesta de choque calórico (Somero y Hoffman, 1996).

En los organismos estresados térmicamente, la evidencia más directa de que las proteínas son dañadas por la temperatura, es la aparición de concentraciones elevadas de proteínas de choque calórico (hsp, por sus siglas en inglés) (Lindquist y Craig, 1988; Parsell y Lindquist, 1993). Las hsp son miembros de una amplia familia de proteínas conocidas como chaperones moleculares, que tienen un papel vital en los procesos

normales de síntesis y maduración de las proteínas. Los chaperones moleculares son proteínas que asisten en el plegamiento, asignación y ensamble de otras proteínas, pero no permanecen como parte del complejo final (Ellis y Vander Vies, 1991; Craigh, 1993; Somero y Hoffman, 1996).

La respuesta al estrés calórico involucra una reducción inmediata o la eliminación de la síntesis de proteínas diferentes a las proteínas de choque calórico. La actividad de estas proteínas puede requerir cientos de equivalentes de ATP (Parsell y Lindquist, 1993). Así, la preservación de las proteínas celulares con relación a la temperatura puede representar un costo energético para la célula.

Varios estudios con bivalvos cultivados indican que los lípidos son la fuente principal de energía para el desarrollo larval (Marty *et al.*, 1992; Delaunay *et al.*, 1992) ya que proveen ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) de cadena larga (Ackman, 1983; Delaunay *et al.*, 1992), esenciales para el crecimiento de moluscos marinos (Langdon y Waldock, 1981; Delaunay *et al.*, 1992), una vez ingeridos, los lípidos son asimilados con alta eficiencia (Knauer y Souhtgate, 1997).

Los moluscos bivalvos contienen altos valores de PUFA's del tipo $\omega 3$ (n3) y $\omega 6$ (n6) (entre los principales se encuentran los ácidos 18:2 n6; 18:4 n3; 20:5 n3 y 22:6 n3), tanto en la fracción de lípidos neutros (energéticos) como polares (estructurales). Un incremento en la concentración de ácidos grasos saturados (SAFA) en los tejidos, indica un estado fisiológico no óptimo (Frolov y Pankov, 1992; Leonardos y Lucas, 2000).

Una de las herramientas para medir el efecto de la variación de los parámetros ambientales sobre los requerimientos energéticos de los organismos es la tasa del consumo

de oxígeno (VO_2). El VO_2 de un organismo (ml de O_2 $ejemplar^{-1}$ $hora^{-1}$) es una función exponencial del peso del animal y es afectado por la actividad y el estado de alimentación (factores bióticos) y por las variaciones de temperatura, salinidad (presión osmótica), presión parcial de O_2 disuelto en el medio y la iluminación (factores abióticos) (Winter, 1978).

El metabolismo oxidativo se puede expresar en términos de VO_2 , calor producido, CO_2 liberado o por la excreción nitrogenada. La medición del VO_2 provee una estimación razonable de la pérdida de calor metabólico en los moluscos (Lu *et al.*, 1999). El consumo de oxígeno se puede utilizar para evaluar el estado fisiológico de los bivalvos cultivados (Lucas y Beninger, 1985) y también se utiliza como indicador de estrés (Díaz-Herrera *et al.*, 1992).

El consumo de oxígeno cuantificado en los animales en un estado de reposo digestivo corresponde al costo energético del metabolismo estándar. El reposo digestivo o el estado de ayuno, se caracteriza por una menor actividad y por un costo fisiológico mínimo, que está asociado a la ausencia de alimento en el tracto digestivo (Bayne, 1973). El incremento en el VO_2 medido en mejillones sobrealimentados es causado por el proceso de digestión (costo fisiológico), mientras que en mejillones alimentados normalmente (metabolismo digestivo o incremento del calor aparente, ICA) el incremento está relacionado con la actividad filtradora (costos mecánicos) (Navarro y Winter, 1982).

La tasa del consumo de oxígeno se incrementa principalmente con la temperatura (Thompson y Newell, 1985; LeGall y Raillard, 1988; Van Erkom y Griffiths, 1992; Bougrier *et al.*, 1995); la talla (Lu *et al.*, 1999) y la ración alimenticia (Widdows, 1978; Beiras *et al.*, 1994). Sin embargo, en los estudios realizados con mejillones, el VO_2 varía

poco con respecto a la ración (Widdows, 1978). El VO_2 es mayor a niveles medios y altos de alimentación y disminuye cuando la ración es menor (Beiras *et al.*, 1994).

Los animales acuáticos excretan una variedad de productos nitrogenados de desecho, los predominantes son: el amonio, la urea y el ácido úrico. Otros desechos nitrogenados que se excretan pero son menos comunes son el oxido de trimetilamina, guanina, creatina, creatinina y diferentes aminoácidos. El principal factor que determina el modo de excreción nitrogenada es la disponibilidad de agua en el ambiente. Los animales acuáticos principalmente excretan amonio (amoniotélicos), mientras que los terrestres excretan urea (ureotélicos) o ácido úrico (uricotélicos) (Wright, 1995).

En la mayoría de los bivalvos, el amonio es el principal producto final del catabolismo proteico, comprende entre el 41 y el 94% de la excreción nitrogenada total (Bayne, 1976). La excreción nitrogenada ha sido utilizada para evaluar el estado fisiológico de bivalvos cultivados (Lucas y Beninger, 1985), es considerada como un indicador de estrés fisiológico (Díaz-Herrera *et al.*, 1992). En los moluscos bivalvos, la tasa de excreción se incrementa principalmente cuando se incrementa la temperatura (Thompson y Newell, 1985; Yukihiro *et al.*, 2000) en proporción directa con el tamaño o peso corporal (Navarro y Winter, 1982; Yukihiro *et al.*, 1998).

La proporción O:N es la razón de oxígeno consumido y nitrógeno excretado en equivalentes atómicos y se utiliza como indicador del balance en los tejidos animales, entre las tasas del catabolismo de los substratos metabólicos: proteínas, carbohidratos y lípidos (Bayne y Newell, 1983; Lucas y Beninger, 1985). Un valor bajo de esta relación O:N, indica que se están catabolizando principalmente las proteínas, mientras que un valor alto señala la utilización de carbohidratos o lípidos.

En los bivalvos marinos, valores menores que 30 significan una tasa considerable de catabolismo proteico, generalmente asociado con una condición de estrés, mientras que valores mayores que 50, sugieren una tasa alta en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. En la proporción O:N influye fuertemente la disponibilidad de alimento. Un estado de inanición o muy bajas raciones de alimento tienen como resultado valores de la tasa O:N de aproximadamente 20, pero estos valores se incrementan a 40 o 50 con altas concentraciones de alimento (Bayne, 1973; Widdows, 1978a; Lucas y Beninger, 1985).

La tasa O:N se ha utilizado como un índice de condición fisiológica y estrés (Bayne, 1973b). Walne y Mann (1975) experimentando con *C. gigas*, encontraron un incremento de la proporción O:N cuando se incrementaba la temperatura de 8°C a 30°C. Widdows (1978b) registró cambios estacionales en la tasa de consumo de oxígeno y en la tasa de excreción de amonio en mejillones, como resultado de un estrés térmico.

Por todo lo mencionado anteriormente, es evidente que existen diferentes factores que se deben considerar cuando se quiera desarrollar el cultivo de una especie. Debido a la importancia económica que representa el ostión *C. gigas*, es relevante conocer los diversos factores que afectan su cultivo (Cheney *et al.*, 1998), así como el impacto que esta actividad produce sobre las comunidades bentónicas de las que forma parte y sobre las características físicas y químicas de los cuerpos de agua que se utilizan para su cultivo.

Con la intención de analizar el efecto de la alimentación y la temperatura sobre la fisiología de *C. gigas*, en este estudio se analizó el efecto combinado de estos factores sobre el crecimiento y la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos totales y ácidos grasos) de semillas de ostión del pacífico *C. gigas*, mantenidas a diferentes

temperaturas y alimentadas con diversas dietas (mezclas de microalgas). También se estudiaron el consumo de oxígeno y la excreción de amonio en las diferentes condiciones experimentales con la finalidad de evaluar un posible estrés nutritivo.

II. OBJETIVOS

II.1. General

Evaluar el efecto interactivo de la temperatura y la alimentación sobre el crecimiento, composición bioquímica, consumo de oxígeno y excreción de amonio de semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*.

II.2. Específicos

- Evaluar la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos totales y ácidos grasos) de las dietas utilizadas, constituidas por mezclas de las microalgas, *Isochrysis* sp., *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros calcitrans* y *Dunaliella tertiolecta*, cultivadas en un sistema semicontinuo.
- Cuantificar el contenido calórico de las dietas de microalgas proporcionadas a las semillas de ostión.
- Evaluar el crecimiento y la supervivencia de las semillas de ostión *C. gigas* cultivadas a diferentes temperaturas (20 °C, 23 °C, 26 °C, 29 °C y 32 °C) y alimentadas con dietas de microalgas con diferente calidad nutricional.
- Evaluar la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos totales y ácidos grasos) de las semillas de ostión, *C. gigas*, cultivadas bajo diferentes tratamientos.

- Estimar el consumo de oxígeno y la excreción de amonio de semillas de ostión, *C. gigas*, cultivadas con diferentes temperaturas y dietas.
- Cuantificar la relación O:N (razón entre el consumo de oxígeno y la excreción de amonio) de las semillas de ostión cultivadas con diferentes temperaturas y dietas.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. Dietas para las semillas de ostión *C. gigas*

III.1.1. Microalgas utilizadas

Las cepas utilizadas en este estudio fueron las microalgas *Isochrysis* sp., *Pavlova lutheri*, *Dunaliella tertiolecta* y *Chaetoceros calcitrans*. Estas microalgas fueron proporcionadas por el Cepario de Microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE (Anexo 1).

Las dietas proporcionadas fueron resultado de la mezcla de dos microalgas: *Chaetoceros calcitrans-Isochrysis* sp.; *Chaetoceros calcitrans-Pavlova lutheri*; *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri*.

III.1.2. Condiciones de cultivo de microalgas

Las microalgas se cultivaron individualmente en botellones con 15 L de medio de cultivo "f" de Guillard y Ryther (1962). El agua de mar utilizada se pasó a través de una serie de filtros (10, 5 y 1 μm) y fue tratada con luz ultravioleta. Se esterilizó con cloro comercial (hipoclorito de sodio al 6%, Cloralex), utilizando 3 ml L⁻¹ de agua de mar y finalmente se neutralizó con tiosulfato de sodio para eliminar el cloro residual.

Los cultivos de microalgas se mantuvieron a una temperatura de 20 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$), salinidad de 35‰, pH entre 7.5-8.2 y a una intensidad de luz continua de 200 $\mu\text{Einsteins m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, luz que se proporcionó con lámparas fluorescentes de luz blanca fría (Fig. 2). La intensidad de luz se midió con un irradiómetro (QSL-100 Biospherical Instruments Inc.).

Los cultivos de microalgas se mantuvieron en sistema semi-continuo. La cosecha de los cultivos se inició una vez que alcanzaron la fase de crecimiento exponencial, con una tasa

de dilución diaria del 20%, excepto para *C. calcitrans* que se diluyó a una tasa del 25% diario.

La concentración celular (cél ml⁻¹) de los cultivos de microalgas se cuantificó en una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad y bajo un microscopio óptico adaptado con una reglilla micrométrica.

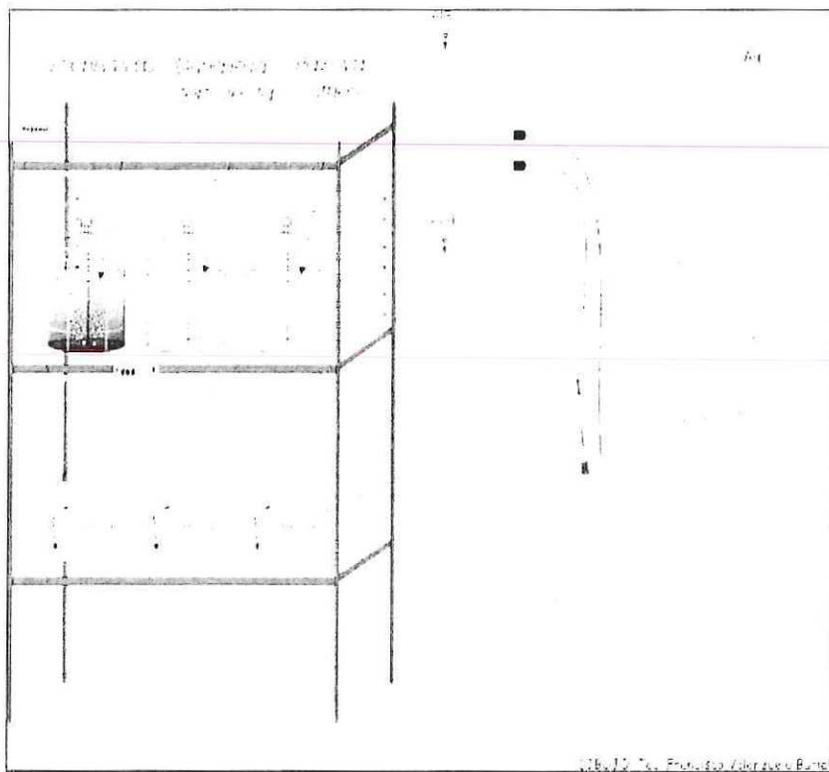


Fig. 2. Sistema de cultivo de microalgas y de las semillas de ostión del Pacífico *C. gigas*, durante los experimentos realizados en el laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE

III.1.3. Peso seco orgánico de las microalgas

Para obtener el peso seco de cada una de las dietas microalgales, cada diez días se filtraron por cuadruplicado, de 10 a 50 ml de cada mezcla de microalgas. Se utilizaron

filtros (Whatman GF/C) de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro, previamente lavados, pre-quemados en mufla a 490 °C y pesados en una balanza analítica (Mettler AE 240, precisión 0.0001 g). Posteriormente, las muestras de microalgas fueron lavadas con formiato de amonio al 3% para eliminar el exceso de sales, finalmente se colocaron en cajas de aluminio y se secaron en una estufa a 60 °C durante 24 horas para obtener el peso seco total (PST). Para cuantificar el contenido de cenizas, después de obtener el PST, las muestras de mezclas de microalgas se incineraron en una mufla a 490 °C durante 8 horas. Por diferencia entre el PST y el peso de las cenizas se obtuvo el peso seco orgánico (PSO) (Sorokin, 1973).

III.1.4. Composición bioquímica de las microalgas

III.1.4.1. Composición proximal de las microalgas

Cada diez días, se filtraron muestras de 5 a 10 ml de cada mezcla de microalgas, por triplicado, para analizar la composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos totales). Las muestras de microalgas fueron pasadas por filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C), con un diámetro de 25 mm. Los métodos utilizados para el análisis de la composición proximal fueron métodos colorimétricos comúnmente utilizados para microalgas.

Las proteínas se cuantificaron con el método de Lowry *et al.* (1951) previa extracción con hidróxido de sodio 0.1 N. Los carbohidratos con el método Dubois *et al.* (1956) y la extracción con ácido sulfúrico 1 M (Whyte, 1987). La extracción de los lípidos con el método Bligh y Dyer (1959) y la determinación con el método de Pande *et al.* (1963).

Para las curvas de calibración se utilizaron estándares comerciales, albúmina sérica de bovino para las proteínas, glucosa anhidra para los carbohidratos y tripalmitina para los lípidos. La absorbancia fue registrada en un espectrofotómetro (Shimatsu, Tokio Japón). Los valores obtenidos se expresaron con base en el PSO.

III.1.4.2. Ácidos grasos de las microalgas

Se cuantificaron los ácidos grasos de las mezclas de microalgas por triplicado. Para obtener los ácidos grasos primero se extrajeron los lípidos con el método de Bligh y Dyer (1959). La fase lipídica se seco con nitrógeno gaseoso una vez que se le agregaron 100 μl del estándar interno ácido triheptadecanoico ($\text{C}_{17:0}$). La derivatización (metanólisis) de los lípidos se hizo con una mezcla de ácido clorhídrico y metanol (5:95 v/v), durante 2.5 horas en termo-baño a 85°C (Sato y Murata, 1988).

Los ácidos grasos metil éster (fatty acid metil ester, FAME por sus siglas en inglés) fueron extraídos con hexano (grado HPLC). Los FAME fueron analizados con un Cromatógrafo de Gases-Espectrómetro de Masas (GC-MS, Hewlett Packard 1800C), equipado con una columna capilar de sílice fundida (30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de la película) (Omegawax TM 250 SUPELCO). Los análisis de los FAME se hicieron inyectando 1 μl de muestra, se utilizó helio como gas transportador (ultra pureza 99.999%) a un flujo de 0.9 ml min^{-1} . La temperatura del horno se incrementó a 110 °C (temperatura inicial) y se mantuvo así durante 3 min, después se elevó hasta 165 °C a una tasa de incremento de 30 °C min^{-1} y se mantuvo a esa temperatura por 2 min (nivel 1), finalmente se elevó hasta 220 °C a una razón de 2°C min^{-1} donde se mantuvo por 16 min (nivel 2).

Los FAME se identificaron comparando los espectros de masas de las muestras con aquellos espectros contenidos en la biblioteca de espectros de masas NIST75K-NBS y fueron confirmados comparando los tiempos de retención de los picos con los de un patrón de estándares comerciales de ácidos grasos metil éster (FAME, kit Sigma).

III.1.5. Análisis de calorimetría de las microalgas

Se realizaron análisis de calorimetría de las mezclas de microalgas utilizadas en los dos experimentos (*Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri*, *Chaetoceros calcitrans*-*Isochrysis* sp., *Chaetoceros calcitrans*-*Pavlova lutheri*) y de la dieta monoalgal (*Dunaliella tertiolecta*).

Se elaboraron pastillas de 0.15 a 0.20 g de las mezclas de microalgas liofilizadas, utilizadas en las diferentes dietas, se hicieron cinco repeticiones por muestra. Estas pastillas fueron quemadas en una bomba calorimétrica de oxígeno (semi-micro, Parr-1425). Los cálculos de los resultados obtenidos se realizaron con las siguientes fórmulas:

$$\Delta H_t = \frac{(Q-f)}{m}$$

Donde:

ΔH_t = Calor bruto de la combustión
 f = calorías del alambre
 m = peso de la muestra en gramos

$$Q = \Delta T (e)$$

Donde:

Q = Cambio de energía
 ΔT = Incremento de la temperatura
 e = energía equivalente promedio (constante = 536.15)

$$f = (A_i - A_f) c$$

Donde:

A_i, A_f = Alambre inicial y final
 c = factor de corrección (1400)

III.2. Diseño experimental para el cultivo de semillas de ostión *C. gigas*

Se realizaron 2 experimentos con el fin de seleccionar una dieta de alta calidad que consistiera en una mezcla de microalgas (de amplio uso en acuicultura) para alimentar semillas de ostión *C. gigas* y conocer la temperatura a la cual se obtenía un mejor crecimiento. En el experimento 1 se evaluó el crecimiento y la composición bioquímica de las semillas de ostión cultivadas a tres temperaturas diferentes y alimentadas con tres mezclas de microalgas de alta calidad (diseño, 3 x 3). En el experimento 2 se evaluó el efecto interactivo de las temperaturas y las dietas sobre las semillas de ostión cultivadas a cuatro temperaturas diferentes y alimentadas con dos dietas, una de baja y otra de alta calidad nutricia (diseño, 4 x 2).

III.2.1. Experimento 1 (selección de dietas de alta calidad nutricia para semillas de ostión *C. gigas*).

Se cultivaron semillas de ostión *C. gigas*, aproximadamente de 3 mm de longitud promedio, a tres temperaturas (20 °C, 23 °C y 26 °C) y se alimentaron una vez al día (durante dos meses), con cada una de las tres dietas (mezclas de microalgas) *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri* (IP), *Chaetoceros calcitrans*- *Isochrysis* sp. (CI) y *C. calcitrans*- *P. lutheri*- (CP),.

Grupos de semillas de *C. gigas*, a una densidad de 20 semillas L⁻¹, se colocaron aleatoriamente en cubetas de plástico de 3 L introducidas en cubetas de 8 L, provistas de un sistema de aireación “air lift” (Fig. 2). Se colocaron cuatro repeticiones por tratamiento.

Las dietas se proporcionaron en una misma ración. La proporción de las mezclas se determinó con base en el peso seco orgánico de cada una de las microalgas y fue en una proporción de 1:1 en las mezclas que contenían microalgas flageladas y de 2:1 en las

mezclas que contenían *C. calcitrans*, debido al bajo contenido orgánico resultante, ocasionado por los altos porcentajes de cenizas (hasta de un 50%) de esta microalga.

Cada dos semanas se evaluó el crecimiento en talla (mm) y en peso (g), así como la supervivencia de las semillas de ostión. También se cuantificó su composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos totales y ácidos grasos). Al final del experimento se hizo una evaluación del consumo de oxígeno y de la excreción de amonio de las semillas de ostión.

III.2. 2. Experimento 2 (efecto interactivo de la temperatura y de la dieta en las semillas de ostión *C. gigas*).

Se cultivaron semillas de ostión *C. gigas* de 3 mm de longitud promedio, a cuatro temperaturas diferentes (23 °C, 26 °C, 29 °C y 32°C) durante dos meses. Se escogieron estas temperaturas por ser representativas de la parte superior del ciclo termal, prevaleciente en la Bahía de San Quintín, región principal de cultivo de ostión del Pacífico en Baja California. Se proporcionaron dos dietas, una de alta calidad nutricia, constituida por la mezcla de las microalgas *Isochrysis* sp. y *Pavlova lutheri* (IP), que se eligió con base en los resultados obtenidos en el experimento 1 y la otra dieta de baja calidad nutricia, consistente en la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Dt).

El cultivo de las semillas se llevó a cabo en el mismo sistema y en las condiciones descritas anteriormente. Cada dos semanas, se midió el crecimiento en peso (g) y talla (mm) y se evaluó la supervivencia de las semillas. A la mitad y al final del experimento se cuantificó la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos totales y ácidos grasos) de las semillas de ostión y también se evaluó el consumo de oxígeno y la excreción de amonio.

III.3. Cultivo de las semillas de ostión *C. gigas*

III.3.1. Obtención de semillas

Las semillas de ostión fueron proporcionadas por el laboratorio MaxMar, ubicado en “El Rincón de Ballenas”, Ensenada, Baja California. Estas semillas fueron cultivadas en el laboratorio húmedo de las instalaciones del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

III.3.2. Condiciones de cultivo de las semillas de ostión

Las semillas se mantuvieron en un sistema cerrado con flujo de aire constante tipo “air lift” (Fig. 2). Para mantener las diferentes temperaturas en cada experimento se utilizaron calentadores para acuario de 250 Vatios, un calentador por cada unidad experimental. Se utilizaron reguladores de temperatura (Medusa, modelo TC-200), para mantener relativamente constantes las diferentes temperaturas (variación de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$). Se obtuvieron datos iniciales de longitud total, peso húmedo, peso seco total y orgánico.

El peso inicial promedio de las semillas de ostión fue de 4.8 mg de peso húmedo, 2.8 mg de peso seco total y 205 μg de peso seco orgánico.

La ración de microalgas, proporcionada inicialmente a los organismos, fue de 100,000 cél ml^{-1} y semanalmente se ajustó incrementando la ración con base en el 3% del peso seco de los ostiones. Las raciones ofrecidas a los animales se calcularon con base en el peso seco orgánico de las microalgas, en una proporción de 1:1 para las dietas con microalgas flageladas *Isochrysis* sp. y *Pavlova lutheri* y una proporción de 2:1 en el caso de las dietas que incluyeron la diatomea *C. calcitrans*.

III.4. Crecimiento y supervivencia de semillas de ostión *C. gigas*

El crecimiento en talla (longitud de la concha en mm) y peso (g) de las semillas de ostión se evaluó cada dos semanas. Se midieron aleatoriamente 30 semillas por tratamiento en un microscopio estereoscópico con ocular graduado (Modelo Wild Heerbrugg, Max Erb Ins. Company, Burbank CA, precisión de 0.01 mm). Posteriormente las semillas se pesaron en una balanza analítica (Mettler AE 240 con precisión 0.0001 g) para obtener el peso húmedo (PH), el peso seco total (PST) y el peso seco orgánico (PSO).

Para obtener el PH, las semillas se lavaron previamente con agua destilada para eliminar el exceso de sales. Para obtener el PST, las semillas se colocaron en cajas de aluminio y se secaron en una estufa de convección a 60°C durante 24 horas, se pesaron y posteriormente las muestras se incineraron en una mufla a 490°C durante 8 horas para la obtención de cenizas (Sorokin, 1973). El peso seco orgánico se obtuvo de la diferencia entre el PST y el peso de las cenizas.

El porcentaje de supervivencia acumulada (%S) de las semillas se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%S = \frac{N_t}{N_0} \times 100$$

Donde:

S= Supervivencia

N_0 = Número de ostiones al inicio

N_t = Número de ostiones al tiempo t

III.5. Composición bioquímica de las semillas de ostión *C. gigas*

Al final del experimento 1 se evaluó por triplicado la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos totales y ácidos grasos) del tejido de los organismos. En el experimento 2 la composición bioquímica se evaluó a la mitad y al final del ensayo.

Los métodos utilizados para el análisis de la composición bioquímica fueron los descritos anteriormente en la sección III.1.4. Los valores obtenidos se expresaron con base en el PSO.

III.6. Consumo de oxígeno de las semillas de ostión *C. gigas*.

Se evaluó el consumo de oxígeno de las semillas de ostión en los diferentes tratamientos de los dos experimentos. Se colocaron de 10 a 25 semillas, lo que dependió del tamaño de los ostiones. El consumo de oxígeno se evaluó al final del experimento 1 y a la mitad y al final del experimento 2.

Se utilizó un respirómetro semi-abierto, provisto con 30 cámaras respirométricas de 50 ml (Fig. 3), como el utilizado por Díaz-Herrera *et al.* (1992). Para proporcionar la temperatura de cada tratamiento se utilizó un calentador de titanio y para mantener esta temperatura constante se utilizó un regulador de temperatura (Medusa, modelo TC-200) (Fig. 2). En cada ensayo se colocaron 4 repeticiones por cada tratamiento.

Para evaluar el oxígeno disuelto del agua contenida en cada una de las cámaras respirométricas, se utilizó un oxímetro (modelo YSI #52 equipado con un sensor polarográfico). Las semillas de cada tratamiento permanecieron 24 horas en el respirómetro con un flujo de agua constante, no se proporcionó alimento durante los ensayos y éstos se llevaron a cabo a la misma temperatura que tenían en los diferentes tratamientos. Transcurrido ese tiempo se tomó la lectura del contenido de oxígeno inicial en el agua de cada una de las cámaras respirométricas, incluyendo 4 controles, y posteriormente se cerraron durante 1-2 horas, después de este tiempo se midió el contenido final de oxígeno en todas las cámaras respirométricas.

La tasa del consumo de oxígeno de las semillas se calculó obteniendo la diferencia entre la concentración inicial y final del oxígeno disuelto ($\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$). El consumo de oxígeno se expresó en $\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (con base en el peso seco orgánico del tejido de cada organismo) y en $\mu\text{gO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ semilla}^{-1}$.

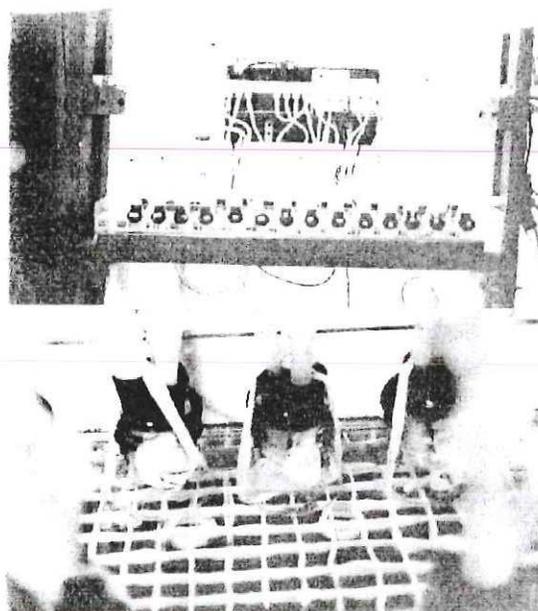


Figura 3. Respirómetro semi-abierto, provisto con 30 cámaras respirométricas de 50 ml, utilizado para evaluar el consumo de oxígeno y la excreción de amonio en semillas de ostión *C. gigas* expuestas a diferentes tratamientos de temperatura y alimentación (Experimentos 1 y 2).

III.7. Excreción de amonio de las semillas de ostión *C. gigas*.

Se evaluó la excreción de amonio de las semillas de ostión en los diferentes tratamientos de los dos experimentos. La concentración de amonio se cuantificó con el método de azul de indofenol (Rodier, 1978). Se obtuvieron muestras de 10 ml del agua

contenida en las cámaras respirométricas al mismo tiempo que se obtuvieron las muestras para medir el oxígeno disuelto de cada ensayo, y se fijaron con solución alcohólica de fenol. Previamente se hicieron curvas de calibración con cloruro de amonio, cuantificando las diferentes concentraciones de este estándar y de las muestras analizadas en un espectrofotómetro (ELYPTICA Mod. ELY-2000) a una longitud de onda de 640 nm.

La tasa de excreción de amonio de las semillas se calculó obteniendo la diferencia entre la concentración inicial y final de amonio del agua contenida en las cámaras respirométricas. La excreción de amonio se expresó en $\mu\text{gNH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (con base en el peso seco orgánico del tejido de cada organismo) y en $\mu\text{gNH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ semilla}^{-1}$.

III.8. Proporción oxígeno-nitrógeno O:N de las semillas de ostión *C. gigas*

La proporción O:N de las semillas de ostión se calculó en equivalentes atómicos. La tasa del consumo de oxígeno de las semillas, en $\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1}$, se dividió entre el peso atómico del oxígeno (16) y la tasa de excreción de amonio, en $\text{mgNH}_4 \text{ h}^{-1}$, se dividió entre el peso atómico del nitrógeno (14) (Widdows, 1985).

III.9. Análisis estadísticos

III.9.1. Evaluaciones de los cultivos de microalgas

Para evaluar las diferencias en el crecimiento y la composición bioquímica de las diferentes mezclas de microalgas utilizadas en los dos experimentos se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. La normalidad de los datos se evaluó por examen gráfico de los residuales y la homocedasticidad con la prueba de Hartley (Zar, 1984). El nivel de significancia para las pruebas fue de 0.05.

III.9.2. Evaluaciones del cultivo de semillas del ostión *C. gigas*

Para evaluar el efecto de las dietas y las temperaturas sobre el crecimiento, la supervivencia y el contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos totales y ácidos grasos de las semillas de ostión, se utilizó un ANOVA de dos vías, las dietas fueron tratadas como un factor aleatorio. La normalidad de los datos se evaluó examinando las gráficas de los residuales y la homocedasticidad con la prueba de Box M. Para el contenido de algunos ácidos grasos poliinsaturados se realizó una transformación, aplicando la raíz cuadrada a los datos antes de hacer el análisis.

También se utilizó un ANOVA de dos vías para evaluar el efecto de las dietas y las temperaturas sobre el consumo de oxígeno y excreción de amonio de las semillas de ostión. Se realizó una transformación logarítmica a los resultados del consumo de oxígeno (por peso) del experimento 2 y a los valores obtenidos de la excreción de amonio por semilla solo se realizó una transformación logarítmica negativa en el experimento 1.

Para las comparaciones múltiples entre los tratamientos se utilizó la prueba de Tukey de diferencia significativa (HSD), con un nivel de significancia de 0.05 (Zar, 1984).

IV. RESULTADOS

IV.1. Dietas para las semillas de ostión *C. gigas*

IV.1.1. Peso seco orgánico y composición proximal de las dietas de microalgas

Las dietas con las diferentes mezclas de microalgas mantuvieron el peso seco orgánico en valores similares, con promedios de 135.7 a 179.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, durante el tiempo que duraron los dos experimentos (Tabla I). No se encontraron diferencias significativas entre el peso seco orgánico de las dietas ($P=0.843$, $P=0.269$), ni durante el tiempo ($P=0.424$) que duraron ambos experimentos.

Tabla I. Peso seco orgánico ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de las mezclas de microalgas utilizadas durante los experimentos de crecimiento de semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*. CI: *Chaetoceros calcitrans*- *Isochrysis* sp.; CP: *C. calcitrans*-*Pavlova lutheri*; IP: *Isochrysis* sp.-*P. lutheri*; Dt: *Dunaliella tertiolecta*.

Mes	Experimento 1			Mes	Experimento 2	
	CI	CP	IP		IP	Dt
1	179.1 \pm 13.5	135.7 \pm 1.9	158.7 \pm 7.7	1	166.3 \pm 3.5	148.3 \pm 8.0
	171.3 \pm 14.1	143.6 \pm 9.4	156.7 \pm 2.9		169.9 \pm 9.2	175.1 \pm 12.6
2	166.1 \pm 15.4	148.8 \pm 36.2	141.1 \pm 2.3	2	163.8 \pm 16.3	154.8 \pm 14.2
	176.7 \pm 15.0	165.1 \pm 10.9	159.8 \pm 29.1		173.6 \pm 10.8	143.7 \pm 28.4

\pm = desviación estándar

En relación a la composición proximal de las diferentes dietas utilizadas para alimentar a las semillas de ostión, se tuvieron porcentajes similares de lípidos, carbohidratos y proteínas. El intervalo de porcentajes de las proteínas fue de 48.24 a 51.51%, de los carbohidratos de 12.74 a 15.38% y en los lípidos totales de 35.58 a 37.93% (Tabla II).

Tabla II. Composición bioquímica porcentual de las dietas utilizadas para alimentar a las semillas de ostión *Crassostrea gigas*, en los experimentos 1 y 2. El porcentaje promedio se calculó con base en el peso seco orgánico.

Dieta	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
Experimento 1			
<i>Chaetoceros calcitrans-Isochrysis</i> sp.	50.55 ± 3.3	13.88 ± 0.9	35.58 ± 1.0
<i>Chaetoceros calcitrans-Pavlova lutheri</i>	51.51 ± 0.4	12.74 ± 1.3	35.75 ± 0.2
<i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i>	49.32 ± 2.4	13.57 ± 0.6	37.11 ± 3.7
Experimento 2			
<i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i>	48.24 ± 2.2	13.83 ± 1.9	37.93 ± 1.6
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	48.39 ± 1.5	15.38 ± 2.9	36.21 ± 1.9

± = desviación estándar

Durante los dos meses que duró cada experimento, no se encontró diferencia significativa en el contenido de proteínas ($P=0.866$), de carbohidratos ($P=0.194$), ni de lípidos ($P=0.054$) entre las diferentes dietas.

IV.1.2. Ácidos grasos de las dietas de microalgas

En general se observó que la suma total los ácidos grasos saturados (AGS) de las cinco dietas utilizadas en los dos experimentos tuvieron valores muy cercanos entre sí (Tabla III), con intervalos de 70.3 a 89.9 %. Al analizar los ácidos grasos individualmente, se observó que el 14:0 y 16:0 fueron los que tuvieron las concentraciones más altas (28.2 a 43.3%) en las mezclas de las dietas CI, CP e IP. Sin embargo, en la dieta monoalgal (Dt) se encontraron valores extremos de 2.2% para el ácido graso 14:0 y de 80.5% para el ácido graso 16:0, mientras que el ácido graso 18:0 tuvo valores bajos en todas las dietas utilizadas, con valores de 3.1 a 7.2%. En los dos experimentos se encontraron algunas diferencias significativas en los AGS ($P<0.01$) de las dietas.

Tabla III. Composición de ácidos grasos (porcentaje con base en el total de los ácidos grasos) de las dietas utilizadas para alimentar a las semillas de ostión *Crassostrea gigas*, en los experimentos 1 y 2. CI: *Chaetoceros calcitrans-Isochrysis* sp.; CP: *C. calcitrans-Pavlova lutheri*; IP: *Isochrysis* sp.-*P. lutheri*; Dt: *Dunaliella tertiolecta*.

Ácido graso	Experimento 1			Experimento 2	
	CI	CP	IP	IP	Dt
AGS					
14:0	43.3 ±5.3	*33.5 ±2.7	38.2 ±5.4	*36.1 ±3.4	2.2 ±0.4
16:0	*28.2 ±4.1	35.7 ±5.8	37.2 ±4.5	*31.0 ±4.2	80.5 ±1.9
18:0	3.1 ±0.7	*4.2 ±1.2	3.3 ±0.5	3.2 ±0.6	7.2 ±1.2
Total	74.6	73.4	78.7	70.3	89.9
AGMI					
16:1 n9	9.6 ±1.7	11.4 ±1.0	*5.2 ±2.1	*4.5 ±0.4	0.6 ±0.4
18:1 n9	3.9 ±0.5	*1.2 ±0.2	4.5 ±1.3	*3.4 ±1.8	4.7 ±0.9
18:1 n11	2.4 ±1.2	1.6 ±0.2	2.6 ±1.5	*1.8 ±0.6	4.1 ±0.6
Total	15.9	14.2	12.3	9.8	9.4
AGPI					
18:2n6	0.7 ±0.4	*0.3 ±0.2	0.6 ±0.4	*0.8 ±0.4	0.7 ±0.2
18:3n3	2.7 ±1.8	*0.5 ±0.6	2.7 ±2.4	*5.1 ±2.1	t
18:4n3	0.2 ±0.2	0.1 ±0.1	0.2 ±0.2	*0.5 ±0.9	nd
20:4n6	0.02 ±0.03	0.3 ±1.0	t	1.6 ±2.6	nd
20:5n3	5.8 ±5.4	11.1 ±8.5	5.4 ±4.5	11.4 ±6.8	nd
22:6n3	0.1 ±0.2	0.2 ±0.3	0.2 ±0.4	0.5 ±0.9	nd
Total	9.5	12.5	9.1	20.0	0.7

AGS= Ácidos grasos saturados

AGMI= Ácidos grasos monoinsaturados

AGPI= Ácidos grasos poliinsaturados

t = trazas

nd = no detectados

*= diferencia significativa

± = desviación estándar

En relación con la suma total de los porcentajes de los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), también se observaron valores muy cercanos entre sí en ambos experimentos, de 9.4 a 15.9%. El ácido graso 16:1 n9 tuvo un intervalo de variación muy amplio, de 0.6 a 11.4% (Tabla III).

En el experimento 1 se encontró una diferencia significativa en los ácidos grasos 16:1 n₉ (IP) y 18:1 n₉ (CP) ($P < 0.001$). En el experimento 2 también se tuvo una diferencia significativa en los ácidos grasos monoinsaturados entre las dietas ($P < 0.05$).

La suma total de los AGPI de las dietas de las mezclas de microalgas proporcionadas en el experimento 1 tuvo un intervalo de 9.1 a 12.5%. En el experimento 2 se encontraron diferencias importantes entre las dietas (IP) y (Dt) (20% y 0.7% respectivamente). En esta última dieta se observó gran diferencia en la presencia y concentración de AGPI, no se detectaron los ácidos grasos 18:4n₃, 20:4n₆, 20:5n₃ y 22:6n₃ (Tabla III). El ácido graso esencial 20:5n₃, tuvo las concentraciones más altas en las otras cuatro dietas, con valores promedio de 5.4 a 11.4% mientras que el ácido 22:6n₃ tuvo porcentajes bajos, de 0.1 a 0.5 %.

Se encontró una diferencia significativa en los ácidos grasos 18:2n₆ y 18:3n₃ entre las dietas de los dos experimentos ($P < 0.05$). No se encontró diferencia significativa en los ácidos grasos 18:4n₃, 20:4n₆, 20:5n₃ y 22:6n₃ entre las dietas ($P > 0.05$). Los porcentajes de los ácidos grasos esenciales 20:5n₃ y 22:6n₃ fueron similares en todas las dietas, excepto para la dieta Dt.

IV.1.3. Análisis de calorimetría de las dietas de microalgas

El contenido calórico de las dietas proporcionadas a las semillas de *C. gigas* en ambos experimentos, fue similar en las tres dietas constituidas de mezclas de microalgas, con valores de 2,071 a 2,695 calorías g⁻¹, excepto con la dieta monoalgal de *D. tertiolecta* que tuvo un contenido calórico de 4,435 calorías g⁻¹ (Tabla IV). Se encontró una diferencia

significativa en el contenido calórico de la dieta Dt en relación con las otras dietas ($P < 0.001$).

Tabla IV. Contenido calórico (calorías g^{-1}) promedio de las mezclas de microalgas suministradas a las semillas de ostión *Crassostrea gigas*.

Mezcla de microalgas	Calorías g^{-1}
<i>Chaetoceros calcitrans</i> - <i>Isochrysis</i> sp.	2070.91 ± 677.15
<i>Chaetoceros calcitrans</i> - <i>Pavlova lutheri</i>	2694.72 ± 724.33
<i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i>	2658.89 ± 501.55
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	*4435.39 ± 54.40

* = diferencia significativa

± = desviación estándar

IV.2. FISIOLÓGIA DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN *C. gigas*.

IV.2.1. CRECIMIENTO DE LAS SEMILLAS DE OSTION *C. gigas*

IV.2.1.1. Experimento 1 (selección de dietas de alta calidad nutricia para semillas de ostión *C. gigas*).

A las ocho semanas de cultivo, el intervalo de la longitud promedio de las semillas de ostión cultivadas a 20, 23 y 26°C y alimentadas con las diferentes dietas fue de 5.26 a 8.52 mm (Tabla V). No se encontró un efecto significativo de las dietas ($P = 0.081$), ni de las temperaturas ($P = 0.204$); pero la interacción entre las temperaturas y las dietas tuvo un efecto significativo en el crecimiento ($P < 0.001$).

Las semillas cultivadas a 23°C y alimentadas con la dieta IP tuvieron el mayor crecimiento, mientras que las semillas con los otros tratamientos tuvieron un crecimiento similar en cada nivel de temperatura. Por último, las semillas que tuvieron el menor crecimiento fueron aquellas cultivadas a 26°C (Tabla V).

Tabla V. Crecimiento en longitud (mm) y peso (mg) de las semillas de ostión *Crassostrea gigas*, después de ocho semanas de cultivo a 20, 23 y 26°C y alimentadas con tres dietas de microalgas. CI: *Chaetoceros calcitrans-Isochrysis* sp. CP: *C. calcitrans-Pavlova lutheri* e IP: *Isochrysis* sp.- *P. lutheri*.

Temperatura	Dietas	Longitud (mm)	Peso Húmedo (mg)	Peso Seco Total (mg)	Peso Seco Orgánico (mg)
20°C	CI	6.54 ±1.01	113.1 ± 44	60.7 ± 24	4.7 ± 0.1
	CP	6.14 ±1.54	79.4 ± 33	44.2 ± 17	3.4 ± 0.5
	IP	6.04 ±1.33	101.2 ± 65	56.8 ± 33	4.1 ± 0.1
23°C	CI	6.43 ±1.47	69.6 ± 16	40.1 ± 11	2.3 ± 0.1
	CP	6.16 ±1.28	51.8 ± 20	29.2 ± 25	3.4 ± 0.4
	IP	*8.52 ±1.80	123.7 ± 29	70.0 ± 8	4.1 ± 0.2
26°C	CI	5.71 ±1.49	97.9 ± 2	54.8 ± 3	3.7 ± 0.1
	CP	5.50 ±1.34	118.7 ± 6	70.4 ± 4	4.5 ± 0.1
	IP	5.26 ±0.93	120.3 ± 12	70.3 ± 6	4.4 ± 0.4

* = diferencia significativa

± = desviación estándar

En relación al peso húmedo (PH) de las semillas de ostión, se tuvo un intervalo amplio de variación (de 51.8 a 123.7 mg). Las semillas alimentadas con la dieta IP tuvieron valores altos del PH en los tres niveles de temperatura (Tabla V). Se encontró diferencia significativa en el PH de las semillas con respecto a la dieta ($P<0.05$), a la temperatura ($P<0.05$) y en la interacción entre las temperaturas y las dietas ($P<0.05$).

El peso seco total (PST) de las semillas tuvo un intervalo de 29.2 a 70.4 mg (Tabla V). Se encontró diferencia significativa en el PST de las semillas con respecto a la temperatura ($P<0.05$), con las dietas ($P<0.05$) y con la interacción entre las temperaturas y dietas ($P<0.05$).

El peso seco orgánico (PSO) de las semillas de ostión cultivadas a las tres temperaturas y con las tres dietas tuvo valores similares, entre 2.3 y 4.7 mg. No se encontró diferencia significativa en el PSO de las semillas con respecto a la dieta ($P>0.05$), pero si en relación con la temperatura ($P<0.05$) y en la interacción entre las temperaturas y las dietas ($P<0.05$).

IV.2.1.2. Experimento 2 (efecto interactivo de la temperatura y de la dieta en semillas de ostión *C. gigas*).

El crecimiento de las semillas de ostión alimentadas con la dieta IP a 23, 26 y 29°C se incrementó a partir de la cuarta semana de cultivo, alcanzando en promedio 11.2 mm (Fig. 4), mientras tanto, las semillas alimentadas con la dieta a base de la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Dt) y aquellas cultivadas a 32°C alimentadas con la dieta IP tuvieron un crecimiento pobre durante todo el experimento, con un intervalo de talla entre 3.6 y 4.5 mm. Este experimento finalizó a la quinta semana, debido a la gran mortalidad de las semillas de ostión cultivadas a 32°C.

No se encontró un efecto significativo de la temperatura en la longitud de las semillas de ostión ($P=0.357$); pero entre las dietas si se observó una variación significativa ($P<0.001$), al igual que en la interacción entre las temperaturas y las dietas ($P<0.001$). En los tratamientos que incluyeron la dieta IP, excepto a 32°C, las semillas de ostión tuvieron las tallas mayores diferenciándose fuertemente del resto de los tratamientos.

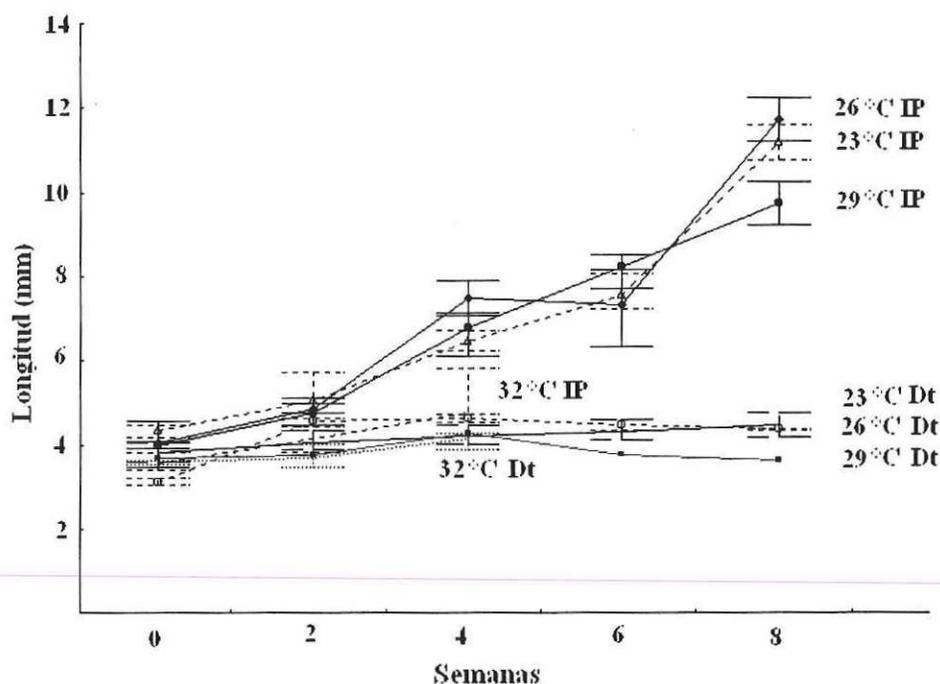


Figura 4. Crecimiento en longitud de la concha (mm) de las semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* cultivadas a 23, 26, 29 y 32°C; alimentadas con una mezcla de las microalgas *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri* (IP) y con la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Dt).

El peso húmedo (PH) de las semillas de ostión alimentadas con la dieta IP a 23, 26 y 29°C se incrementó desde la cuarta semana y alcanzó valores de 202.8 a 210.0 mg (Fig. 5), mientras que las semillas alimentadas con la dieta Dt y las semillas cultivadas a 32 °C y alimentadas con la dieta IP tuvieron un menor incremento en PH durante los dos meses que duró el experimento, de 21.0 a 92.7 mg.

No se encontró diferencia significativa en el PH de las semillas de ostión entre las temperaturas ($P=0.335$), pero si se encontró diferencia altamente significativa entre las dietas y en la interacción ($P<0.001$).

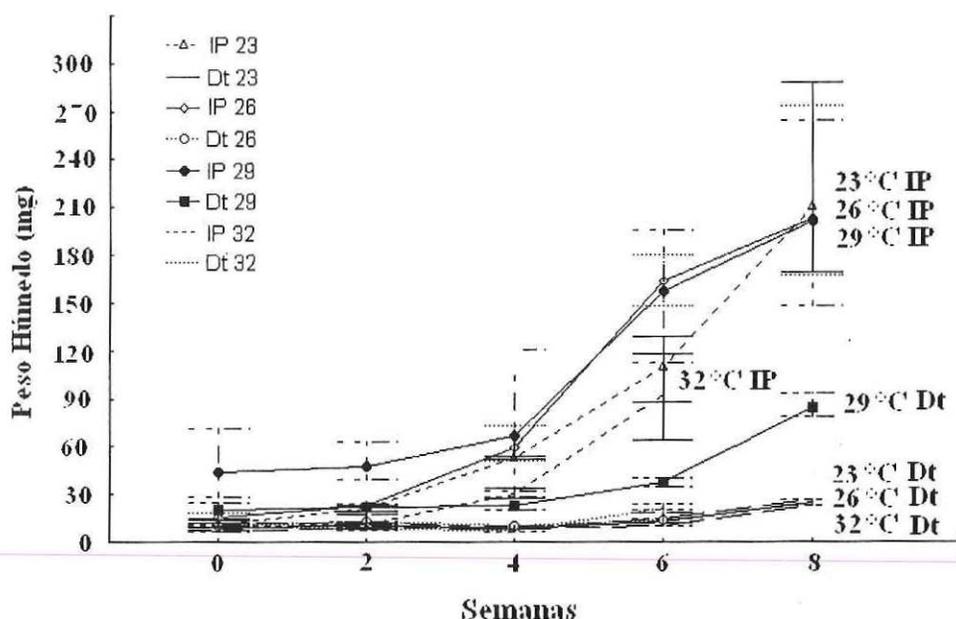


Figura 5. Crecimiento en peso húmedo (mg) de las semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*, cultivadas a 23, 26, 29 y 32°C y alimentadas con una mezcla de las microalgas *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri* (IP) y con la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Dt).

Durante la cuarta semana del experimento, el crecimiento en PST de las semillas de ostión alimentadas con la dieta IP a 23, 26 y 29°C se incrementó rápidamente (Fig. 6), aumentando entre cinco y diez veces su peso inicial (50-100 mg). Para la octava semana, las semillas presentaron un PST de hasta 35 veces su peso inicial (350 mg), mientras que las semillas alimentadas con la dieta Dt y las semillas cultivadas a 32°C y alimentadas con la dieta IP tuvieron un crecimiento pobre durante todo el experimento (~10 mg).

No se encontró diferencia significativa en el PST de las semillas de ostión entre las temperaturas ($P=0.343$), aunque si se encontró una diferencia significativa en relación con las dietas y con la interacción entre ambos factores ($P<0.001$).

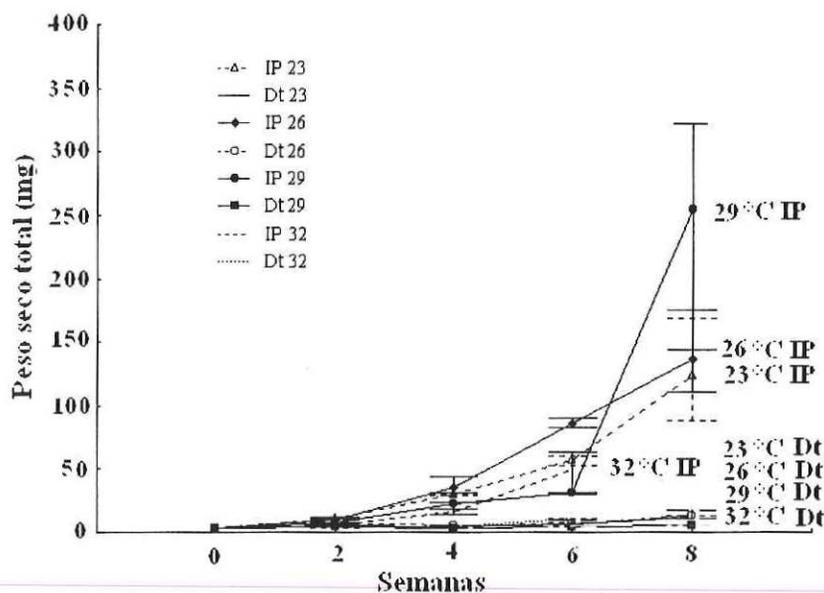


Figura 6. Peso seco total (mg) de semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*, cultivadas a 23, 26, 29 y 32°C; alimentadas con una mezcla de las microalgas *Isochrysis sp.-Pavlova lutheri* (IP) y con la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Dt).

El incremento en el PSO de las semillas obtenido con la dieta IP se aceleró a partir de la cuarta semana, registrándose el doble, triple y hasta cinco veces el peso inicial (2-5 mg), dependiendo del tratamiento (Fig. 7). Al finalizar el experimento, las semillas registraron un incremento mayor de diez veces el peso inicial (12.3 mg). Por otro lado, las semillas alimentadas con la dieta Dt y las cultivadas a 32°C y alimentadas con la dieta IP presentaron un PSO muy pobre (~1 mg).

No se encontró diferencia significativa en el PSO de las semillas de ostión, en relación a la temperatura ($P=0.416$), pero si hubo diferencia significativa en relación con las dietas ($P<0.001$) y con respecto a la interacción entre las temperaturas y dietas ($P<0.001$).

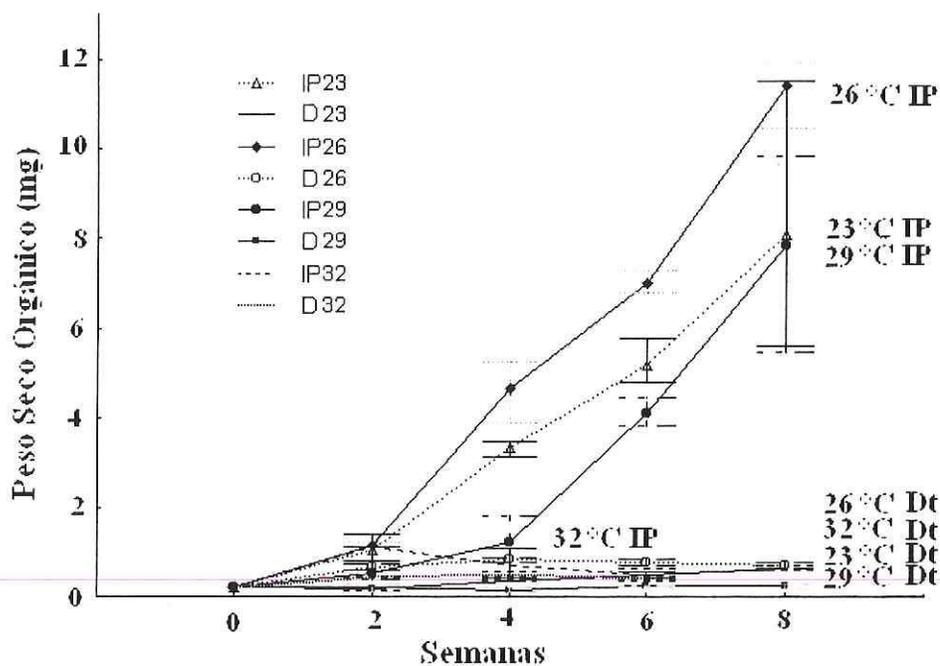


Figura 7. Crecimiento en peso seco orgánico (mg) de las semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*, cultivadas a 23, 26, 29 y 32°C; alimentadas con una mezcla de las microalgas *Isochrysis sp.-Pavlova lutheri* (IP) y la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Dt).

IV.2.2. SUPERVIVENCIA DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN *C. gigas*

En el experimento 1, las semillas de ostión cultivadas a 23°C y alimentadas con las dietas CI y CP tuvieron los menores porcentajes de supervivencia (Fig. 8), de 75.0 a 75.8%, en el resto de los tratamientos la supervivencia se mantuvo entre 80.8 y 89.2%, excepto para las semillas cultivadas a 20°C alimentadas con las dietas CI y CP, donde se obtuvieron los porcentajes de supervivencia más altos, de 94.2 y 97.5%.

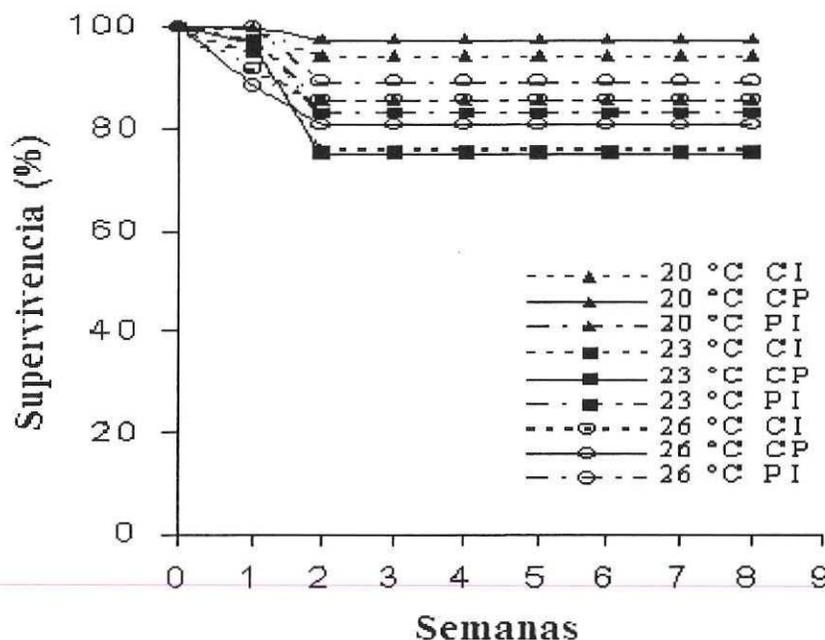


Figura 8. Supervivencia de semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*, cultivadas a 20, 23 y 26°C y alimentadas con tres dietas de microalgas, *Chaetoceros calcitrans*-*Isochrysis* sp. (CI), *C. calcitrans*-*Pavlova lutheri* (CP) e *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri* (IP).

En el experimento 2, las semillas de ostión cultivadas a 23, 26 y 29°C y alimentadas con las dietas *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri* (IP) y *Dunaliella tertiolecta* (Dt), la supervivencia fue de 88.3 (29°C, dieta Dt) a 100% (23°C, dieta IP) (Fig. 9), al finalizar las ocho semanas del experimento. Por otro lado, en las semillas de ostión cultivadas a 32°C y alimentadas con ambas dietas, la supervivencia sólo fue de 33 a 62.5%. Las semillas cultivadas a 32°C y alimentadas con la dieta Dt tuvieron una mortalidad mayor al 50% después de 5 semanas de cultivo, por lo que el experimento finalizó para este tratamiento y las semillas restantes fueron utilizadas para los diferentes análisis bioquímicos.

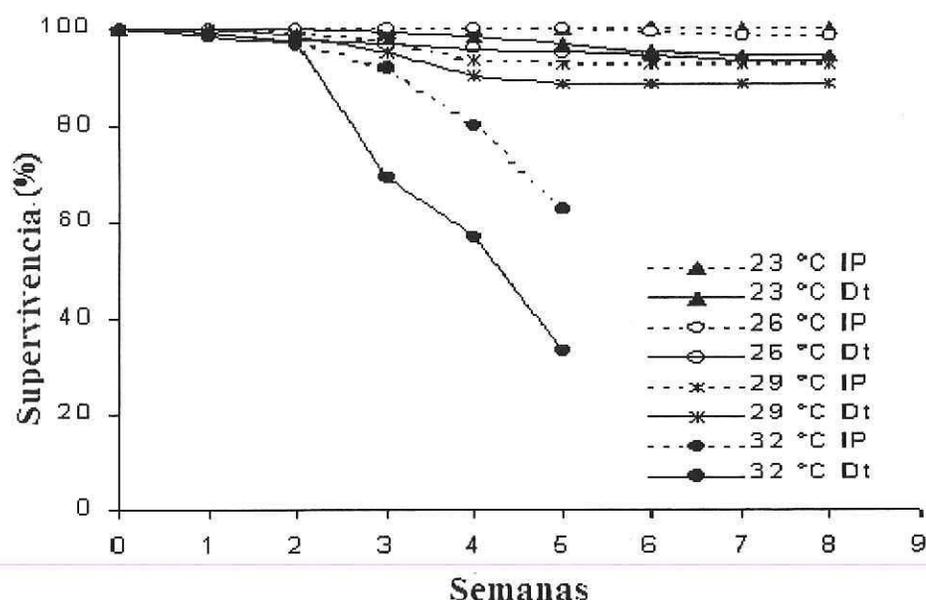


Figura 9. Supervivencia de semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*, cultivadas a 23, 26, 29 y 32°C y alimentadas con una mezcla de las microalgas *Isochrysis sp.-Pavlova lutheri* (IP) y con la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Dt).

IV.2.3. COMPOSICION PROXIMAL DE SEMILLAS DE OSTIÓN *C. gigas*

IV.2.3.1. Proteínas

En el experimento 1, el contenido proteico de las semillas de ostión, bajo los diferentes tratamientos, fue de 52.3 a 84.2% (Fig. 10). Se observó una tendencia general de disminución en el contenido de proteínas de las semillas de ostión con respecto al incremento de la temperatura de 20 a 26°C. Asimismo, los porcentajes de proteínas fueron mayores en las semillas cultivadas a 20°C.

Se observó un mayor contenido de proteínas en las semillas alimentadas con la dieta IP, de 62.6 a 67.1%, excepto en las semillas cultivadas a 20°C, donde el porcentaje mayor se obtuvo con las dietas CI y CP. No se encontró diferencia significativa en los porcentajes de

proteínas entre las dietas ($P=0.692$), pero si se encontró diferencia entre las temperaturas ($P=0.002$), los porcentajes mayores correspondieron a las semillas cultivadas a 20°C.

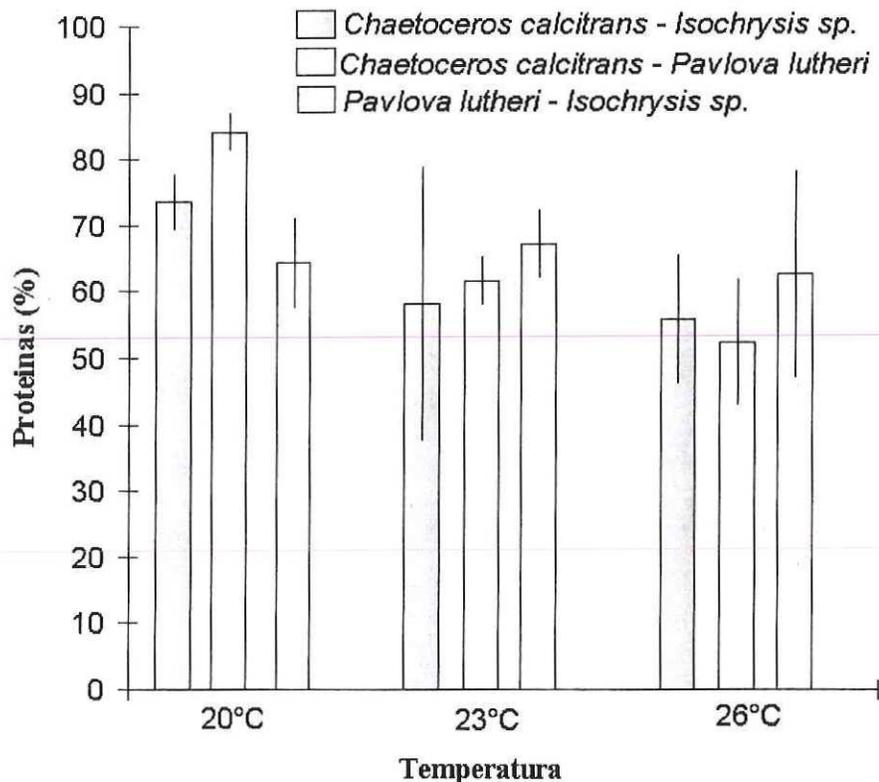


Figura 10. Porcentaje de proteínas de las semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con tres mezclas de microalgas *Chaetoceros calcitrans*-*Isochrysis* sp., *C. calcitrans*-*Pavlova lutheri* e *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri*, cultivadas a 20, 23 y 26°C, en la octava semana de cultivo.

En el experimento 2, el contenido de proteínas de las semillas a la cuarta semana, fue de 48.2 a 83.5% y en la octava semana de 36.6 a 70.7% (Fig. 11). El mayor contenido de proteínas se obtuvo en las semillas alimentadas con la dieta IP, en contraste con las semillas alimentadas con la dieta Dt, en las diferentes temperaturas ensayadas. Se observó una tendencia general en la que el porcentaje de proteínas de las semillas alimentadas con la

dieta IP disminuyó al aumentar la temperatura de cultivo, mientras que en las semillas alimentadas con la dieta Dt a 23, 26 y 29°C el porcentaje de proteínas fue similar, >50 %. Luego este porcentaje disminuyó en las semillas cultivadas a 32°C

En la cuarta semana se encontró una diferencia significativa en el contenido promedio de proteínas de las semillas de ostión con respecto a las dietas ($P < 0.001$) y no se encontró diferencia significativa en relación con la temperatura ni con respecto a la interacción ($P > 0.05$).

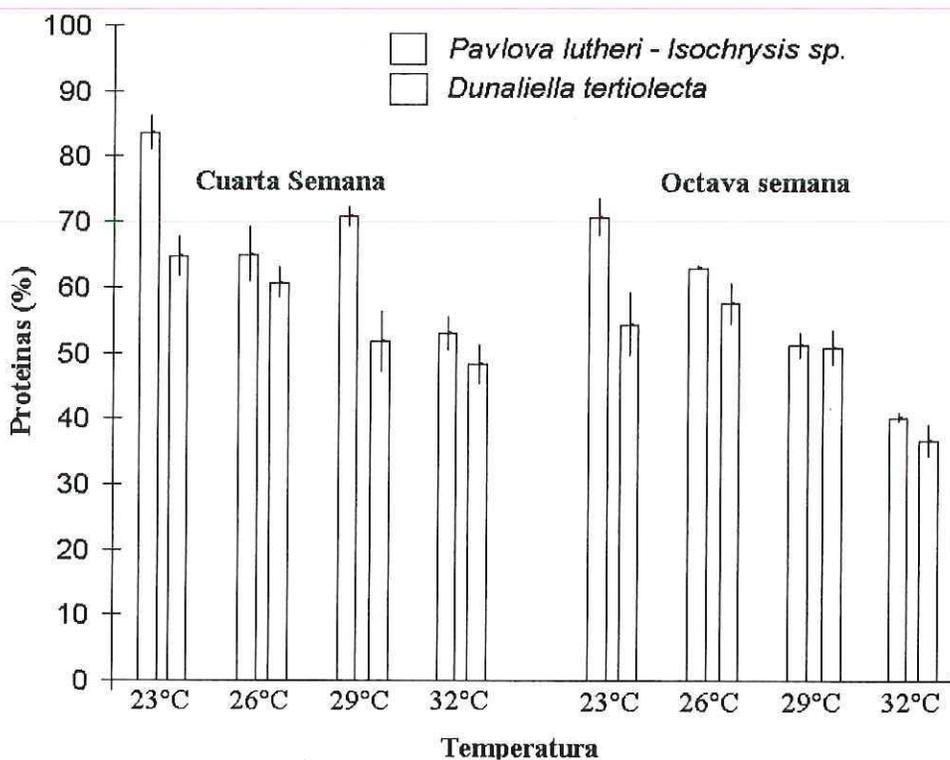


Figura 11. Porcentaje de proteínas en las semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con una mezcla de las microalgas *Isochrysis sp-Pavlova lutheri* y con la microalga *Dunaliella tertiolecta*, cultivadas a 23, 26, 29 y 32°C, durante la cuarta y octava semana de cultivo.

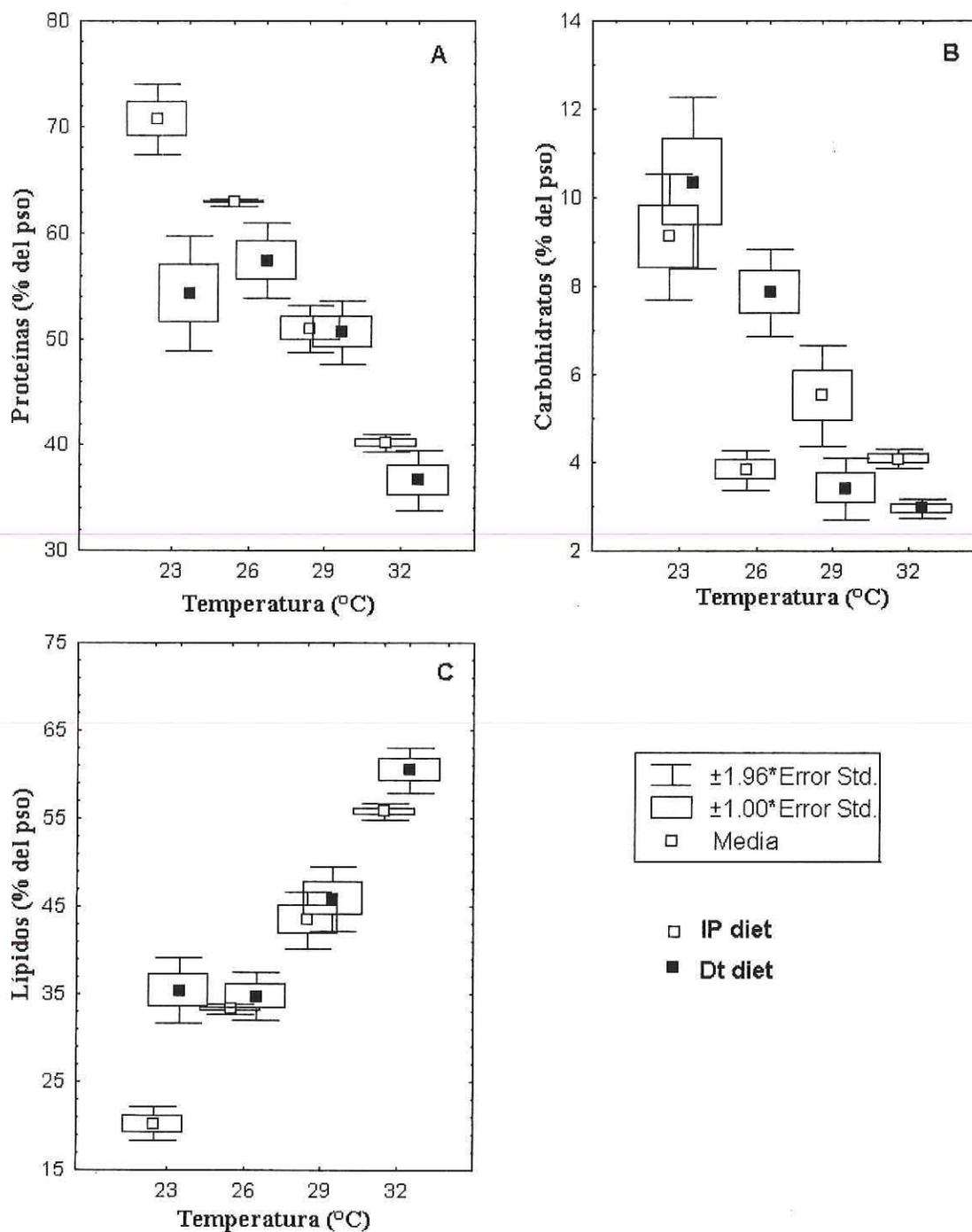


Figura 12. Comparaciones múltiples entre los porcentajes promedio de proteínas, carbohidratos y lípidos de las semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con una mezcla de las microalgas *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri* (IP) y con la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Dt), en la octava semana de cultivo a 23, 26, 29 y 32°C.

En la octava semana se encontró una diferencia significativa en el contenido de proteínas en relación con la temperatura ($P=0.046$), entre las dietas y en la interacción entre las temperaturas y las dietas ($P<0.001$) (Fig. 12).

IV.2.3.2. Carbohidratos

En el experimento 1, el porcentaje de carbohidratos varió de 1.6 a 10.4% (Fig. 13). No se encontraron diferencias significativas en relación con las dietas ($P=0.104$), entre temperaturas ($P=0.056$), ni en la interacción entre las dietas y las temperaturas ($P=0.100$).

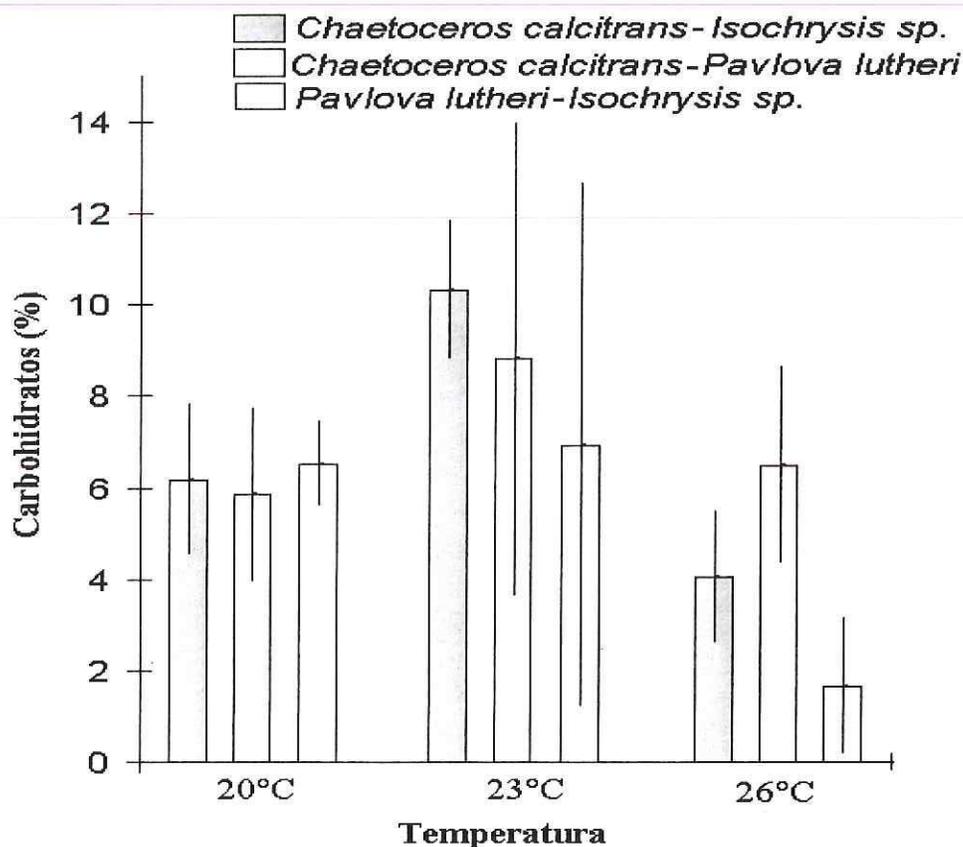


Figura 13. Porcentaje de carbohidratos de las semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con tres mezclas de microalgas *Chaetoceros calcitrans*-*Isochrysis* sp., *C. calcitrans*-*Pavlova lutheri* e *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri*, en la octava semana de cultivo a 20, 23 y 26°C,

En el experimento 2, a la cuarta semana de cultivo, el porcentaje de carbohidratos en las semillas de ostión varió de 4.2 a 14.2% y en la octava semana de 2.9 a 10.3% (Fig. 14). En general, el porcentaje de carbohidratos disminuyó al incrementarse la temperatura; sin embargo, a la cuarta semana no se observó este patrón. El contenido de carbohidratos, en general, fue mayor en las semillas alimentadas con la dieta Dt.

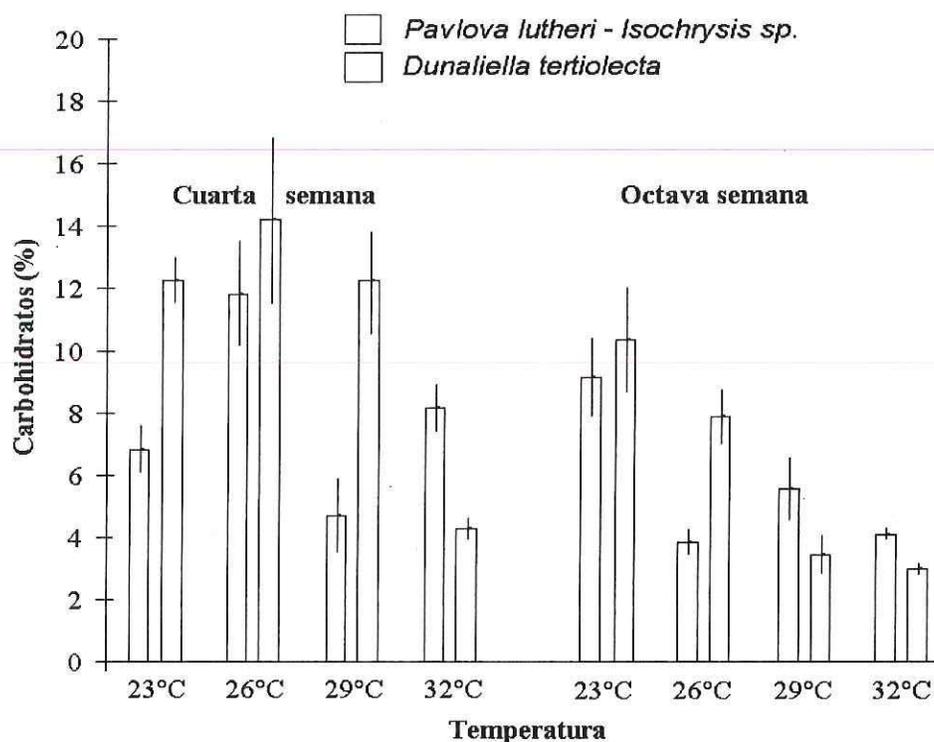


Figura 14. Porcentaje de carbohidratos de las semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con una mezcla de las microalgas *Isochrysis sp.*-*Pavlova lutheri* y con la microalga *Dunaliella tertiolecta*, durante la cuarta y octava semana de cultivo a 23, 26, 29 y 32°C, .

No se encontró diferencia significativa en el contenido de carbohidratos de las semillas de ostión, con respecto a la temperatura, en la cuarta ($P=0.416$) ni en la octava semana ($P=0.142$) del experimento. Tampoco se encontraron diferencias en el contenido de

carbohidratos a la octava semana del cultivo con respecto a las dietas ($P=0.199$); sin embargo, si se encontró diferencia significativa a la cuarta semana en relación con la dieta y la interacción de los dos factores ($P<0.001$).

IV.2.3.3. Lípidos

En el experimento 1, el porcentaje de lípidos de las semillas de ostión varió de 9.9 a 41.1% (Fig. 15). En general, el porcentaje de lípidos en las semillas de ostión aumenta al incrementarse la temperatura, con un máximo de 35.7 a 41.1% a 26°C. Se encontraron contenidos similares de lípidos en las semillas alimentadas con las tres dietas y cultivadas a 23°C y 26°C, en contraste, en aquellas cultivadas a 20°C, se observó una diferencia marcada en los lípidos de las semillas alimentadas con la dieta CP (9.9%). No se encontró diferencia significativa en los porcentajes de lípidos entre dietas ($P=0.757$); sin embargo, si hubo diferencia significativa en relación con las temperaturas ($P=0.000$).

En el experimento 2, el contenido lipídico de las semillas de ostión a la cuarta semana de cultivo fue de 9.6 a 47.6% y de 20.2 a 60.4% a la octava semana. En general, el porcentaje de lípidos en las semillas de ostión tiene una tendencia clara, ya que se acumula en mayor cantidad en niveles de temperatura superiores. También es notable un mayor contenido de lípidos en las semillas alimentadas con la dieta Dt, en contraste con las semillas alimentadas con la dieta IP (Fig. 16).

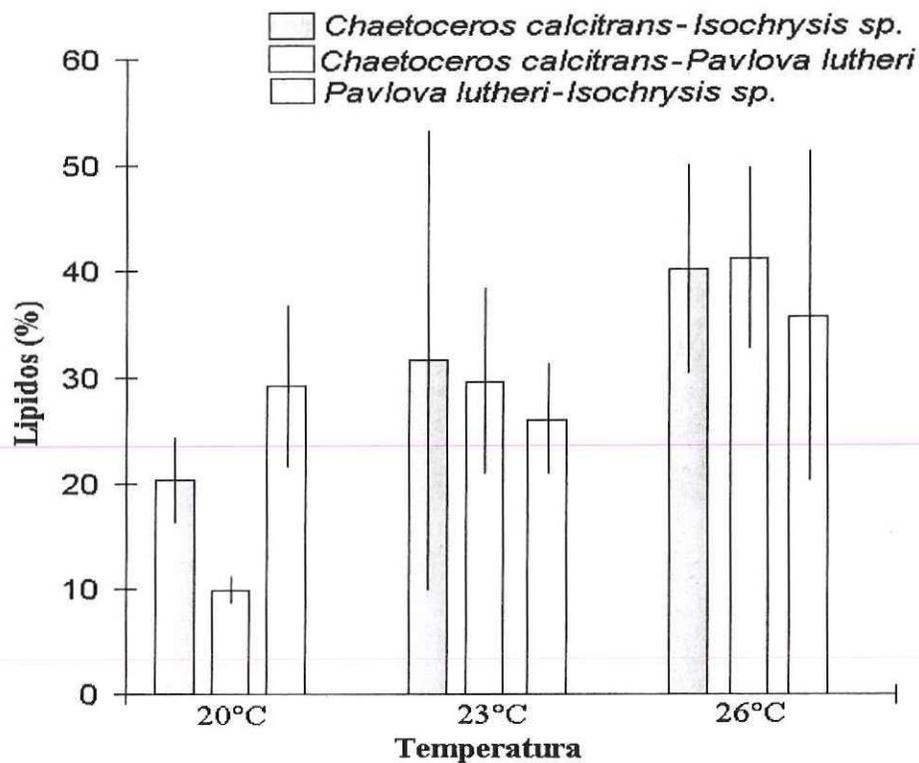


Figura 15. Porcentaje de lípidos de las semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con tres mezclas de microalgas *Chaetoceros calcitrans-Isochrysis* sp., *C. calcitrans-Pavlova lutheri* e *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri*, en la octava semana de cultivo a 20, 23 y 26°C.

Al finalizar la cuarta y octava semana de cultivo, se encontraron diferencias significativas en el contenido de lípidos de las semillas de ostión, con respecto a la temperatura ($P=0.017$), entre las dietas ($P<0.001$) y con respecto a la interacción entre las temperaturas y las dietas ($P=0.027$).

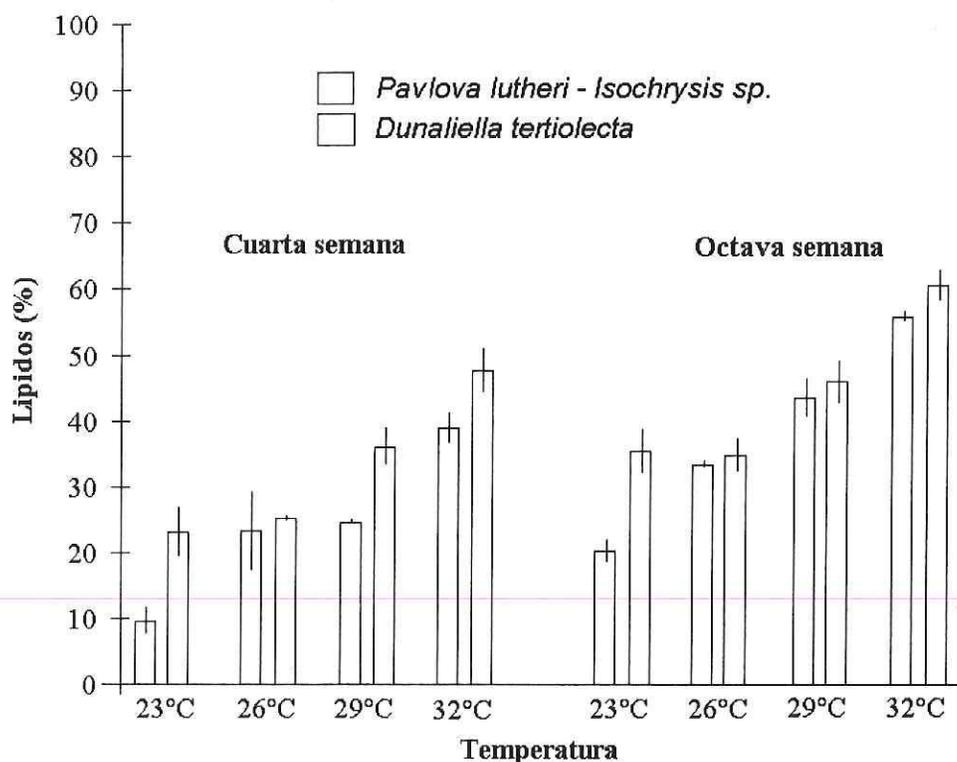


Figura 16. Porcentaje de lípidos de las semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con una mezcla de las microalgas *Isochrysis sp.*-*Pavlova lutheri* y con la microalga *Dunaliella tertiolecta*, cultivadas a 23, 26, 29 y 32°C, durante la cuarta y octava semana de cultivo.

IV.2.3.4. Ácidos grasos de las semillas de ostión *C. gigas*

En el experimento 1, el porcentaje total de ácidos grasos saturados (AGS) de las semillas de ostión cultivadas con las tres dietas y bajo las tres temperaturas varió de 43.7% a 82.7%. Se observó un incremento proporcional de los AGS de las semillas de ostión, con respecto al incremento en los niveles de temperatura (Tabla VI). El ácido graso 16:0 se encontró en mayor concentración en las semillas expuestas a los diferentes tratamientos, con porcentajes de 29.0 a 53.3%. El ácido graso 14:0 tuvo porcentajes similares entre los

diferentes tratamientos, con avalores de 3.1 a 8.5%. Finalmente, el ácido graso 18:0 tuvo porcentajes de 9.9 a 21.6% (Tabla VI).

El porcentaje total de los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) de las semillas de ostión mantenidas bajo los diferentes tratamientos fue de 5.3 a 10.1%, el ácido graso 16:1n9 tuvo los porcentajes menores, de 0.3 a 1.5% (Tabla VI).

El porcentaje total de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de las semillas de ostión en los diferentes tratamientos fue de 10.2 a 49.8 %. Los porcentajes de AGPI en las semillas fueron similares en todos los tratamientos, excepto en las semillas alimentadas con las dietas CP e IP a 26°C. En los AGPI de las semillas de ostión alimentadas con las tres dietas, se observó una tendencia clara, en la cual los porcentajes de ácidos grasos disminuyeron al incrementarse la temperatura (Tabla VI).

Se encontraron diferencias significativas en los contenidos de los ácidos grasos 16:0, 16:1n9, 18:0, 18:1n9, 18:2n6, 20:4n6 y 20:5n3 de las semillas de ostión, con respecto a las dietas ($P<0.05$), en los ácidos grasos 16:0, 18:0 y 20:5n3 en relación con las temperaturas ($P<0.05$) y para la interacción entre dietas y temperaturas ($P<0.05$) en los ácidos grasos 14:0, 16:0, 16:1n9, 18:0, 20:4n6 y 22:6n3.

Tabla VI. Composición de ácidos grasos (porcentaje con base en el total de ácidos grasos) de semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* mantenidas a 20, 23 y 26°C y alimentadas con tres dietas, combinaciones de las microalgas *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis* sp.y *Pavlova lutheri*.

Ácido graso	<i>C. calcitrans- Isochrysis</i> sp.			<i>C. calcitrans-P. lutheri</i>			<i>Isochrysis</i> sp.- <i>P. lutheri</i>		
	20°C	23°C	26°C	20°C	23°C	26°C	20°C	23°C	26°C
AGS									
14:0	7.5±0.7	5.0±1.3	5.9±1.2	3.1±0.7	5.0±2.0	7.6±2.4	5.5±0.5	3.7±0.1	8.5±2.5
16:0	29.5±1.9	31.9±4.2	39.9±3.9	29.0±3.8	37.3±1.7	50.6±2.1	33.5±3.5	34.3±2.4	53.3±5.1
18:0	9.9±1.9	13.9±1.1	14.9±2.4	11.6±1.4	17.6±1.7	21.6±2.0	11.3±0.8	15.2±2.0	20.9±1.4
Total	46.9	50.8	60.7	43.7	59.9	79.8	50.3	53.2	82.7
AGMI									
16:1n9	1.5±0.1	0.9±0.3	0.5±0.2	0.7±0.2	0.8±0.3	0.8±0.3	0.4±0.2	0.6±0.1	0.3±0.1
18:1n9	2.8±1.7	2.7±1.2	3.4±0.3	2.1±1.7	3.9±1.5	4.6±0.4	1.9±0.6	4.3±0.4	2.8±0.7
18:1n11	3.8±0.7	4.1±0.5	3.5±0.2	3.8±0.3	4.5±0.6	4.7±0.5	3.0±0.4	4.4±0.4	3.6±1.0
Total	8.1	7.7	7.4	6.6	9.2	10.1	5.3	9.3	6.7
AGPI									
18:2n6	0.8±0.1	0.9±0.3	0.9±0.1	0.4±0.2	1.1±0.1	t	0.9±0.1	0.6±0.2	0.1±0.2
18:3n3	2.3±1.4	2.0±1.5	2.1±1.4	1.5±2.8	1.5±1.2	0.6±0.3	2.4±0.5	t	0.6±0.5
18:4n3	2.5±0.3	2.6±0.3	2.4±0.4	3.0±0.3	2.5±0.3	2.2±0.4	2.7±0.4	2.6±0.1	2.1±0.5
20:4n6	1.8±0.2	2.7±1.0	2.9±0.9	1.1±0.7	2.0±1.1	t	1.7±1.0	1.7±0.8	0.01±0.0
20:5n3	28.5±3.8	16.6±3.4	13.3±5.1	20.9±7.6	9.5±2.1	t	23.9±4.8	15.1±3.0	t
22:6n3	9.3±3.6	16.5±2.0	10.3±4.3	22.9±2.3	14.3±4.5	7.4±5.0	12.9±1.5	17.6±2.8	7.8±5.5
Total	45.2	41.3	31.9	49.8	30.9	10.2	44.5	37.6	10.6

AGS= Ácidos grasos saturados

AGMI= Ácidos grasos monoinsaturados

AGPI= Ácidos grasos poliinsaturados

t = trazas

En el experimento 2, durante la cuarta semana, el porcentaje total de AGS en las semillas de ostión alimentadas con la dieta IP fue de 63.0 a 84.9% y el de las semillas alimentadas con la dieta Dt fue de 82.2 a 90.3%. Los AGS fueron mayores en las semillas alimentadas con la dieta Dt que en las semillas alimentadas con la dieta IP (Tablas VII). Los AGS que se encontraron en mayor porcentaje en las semillas de ostión fueron el 16:0 con valores de 25.7 a 69.3% y el 18:0 con valores de 12.9 a 14.3%, en las semillas alimentadas con la dieta IP y de 6.1 a 48.3 % con la dieta Dt respectivamente (Tablas VII).

El porcentaje total de AGMI en las semillas de ostión alimentadas con la dieta IP fue de 8.0 a 8.8% y de las semillas alimentadas con la dieta Dt fue de 3.9 a 7.1%. Los AGMI de las semillas de ostión alimentadas con la dieta IP se mantuvieron en valores cercanos en los diversos niveles de temperatura, con ambas dietas, excepto a 26 y 29°C en las semillas alimentadas con la dieta Dt (Tabla VII).

El porcentaje total de los AGPI de las semillas de ostión cultivadas a las cuatro temperaturas y alimentadas con la dieta IP fue de 5.91 a 29.8% y en las semillas alimentadas con la dieta Dt de 4.4 a 11.6%. En las semillas mantenidas a 26, 29 y 32°C y alimentadas con la dieta Dt no se detectaron los ácidos grasos 18:3n3, 18:4n3 y 20:4n6, tampoco se encontraron los ácidos 20:5n3 y 22:6n3 en los cuatro niveles de temperatura. Para las semillas alimentadas con la dieta IP, los ácidos grasos esenciales 20:5n3 y 22:6n3 se mantuvieron con valores cercanos, excepto a 32°C (Tabla VII).

Tabla VII. Composición de ácidos grasos (porcentaje con base en el total de ácidos grasos) de semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri* y con *Dunaliella tertiolecta*, cultivadas a 23, 26, 29, y 32°C, a la cuarta semana de cultivo.

Ácido graso	<i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i>			<i>Dunaliella tertiolecta</i>		
	23°C	26°C	32°C	23°C	26°C	32°C
AGS						
14:0	8.6 ±0.3	7.6 ±0.6	7.4 ±1.9	6.8±1.3	8.5±4.7	16.0±5.3
16:0	40.4 ±2.8	43.9 ±3.0	64.4 ±16.5	39.1±1.1	53.3±12.6	25.7±39.6
18:0	12.9 ±2.3	13.7 ±0.9	14.3 ±19.2	36.3±1.2	28.5±19.4	48.3±38.8
Total	69.1	65.2	84.9	82.2	90.3	85.9
AGMI						
16:1n9	0.6±0.1	0.5±0.1	3.1±3.7	1.5±0.9	t	t
18:1n9	3.6±1.2	4.0±0.4	3.7±0.7	3.7±2.7	3.1±1.5	3.9±2.3
18:1n11	4.1±0.4	4.0±0.4	1.1±1.8	1.8±0.6	2.1±0.3	t
Total	8.3	8.5	8.8	7.0	5.2	7.1
AGPI						
18:2n6	0.9±0.1	0.8±0.3	0.1±0.2	4.8±0.8	4.4±2.3	5.3±0.9
18:3n3	2.2±0.5	1.5±0.3	t	5.3±2.9	nd	nd
18:4n3	2.3±0.1	2.7±0.4	t	0.3	nd	nd
20:4n6	2.3±0.2	2.8±0.3	t	1.2	nd	nd
20:5n3	13.8±2.5	9.0±2.3	0.03±0.06	nd	nd	nd
22:6n3	8.3±3.2	9.2±2.0	4.8±0.6	nd	nd	nd
Total	29.8	26.0	5.91	11.6	4.4	5.6

AGS= Ácidos grasos saturados

AGMI= Ácidos grasos monoinsaturados

AGPI= Ácidos grasos poliinsaturados

t= Trazas

nd= no detectados

Las semillas de ostión alimentadas con la dieta Dt en todas las temperaturas ensayadas tuvieron porcentajes de los AGPI muy similares a los ácidos grasos de las semillas de ostión cultivadas a 32°C y alimentadas con la dieta IP (Fig. 17).

A la octava semana de cultivo, el porcentaje total de AGS en las semillas de ostión alimentadas con la dieta IP fue de 67.0 a 93.1% y en las semillas alimentadas con la dieta Dt fue de 86.2 a 94.1%. Los AGS que se encontraron en mayor porcentaje fueron el 16:0, de 42.3 a 59.5% y el 18:0 de 13.7 a 27.1% con la dieta IP y de 35.2 a 40.4% con la dieta Dt. Los AGS de las semillas alimentadas con la dieta Dt fueron altos en todos los niveles de temperatura y similares a los AGS de las semillas a 32°C y alimentadas con la dieta IP (Tabla VIII).

No se encontró diferencia significativa en los contenidos de AGS de las semillas de ostión cultivadas a las diferentes temperaturas ($P=0.318$), pero se observó diferencia significativa entre las dietas ($P<0.001$) y en relación con la interacción entre temperaturas y las dietas ($P=0.011$) (Fig. 17 A y B).

El porcentaje total de AGMI en las semillas de ostión alimentadas con la dieta IP fue de 3.6 a 9.7% y de las semillas alimentadas con la dieta Dt fue de 3.0 a 5.7%. En general, se observó una disminución de los AGMI al incrementarse la temperatura (Tabla VIII).

Se encontró diferencia significativa en el porcentaje de los AGMI de las semillas de ostión entre dietas ($P<0.001$), con los porcentajes más altos en las semillas alimentadas con la dieta IP, pero no se observó diferencia entre los niveles de temperatura ($P=0.240$), ni en relación con las temperaturas y las dietas ($P=0.166$).

Tabla VIII. Composición de ácidos grasos (porcentaje con base en el total de ácidos grasos) de semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri* y con *Dunaliella tertiolecta*, cultivadas a 23, 26, 29, y 32°C, a la octava semana de cultivo.

Ácido Graso	<i>Isochrysis</i> sp.- <i>Pavlova lutheri</i>				<i>Dunaliella tertiolecta</i>			
	23°C	26°C	29°C	32°C	23°C	26°C	29°C	32°C
AGS								
14:0	11.0±0.5	9.1±3.2	6.5±2.2	9.1±3.3	5.1±1.3	6.2±0.9	6.8±2.1	8.2±0.8
16:0	42.3±1.8	47.3±3.2	42.5±2.0	59.5±20.2	46.8±1.6	46.7±2.1	44.2±5.5	45.5±2.1
18:0	13.7±0.8	23.9±3.5	27.1±5.3	24.5±27.7	37.7±1.5	36.2±3.3	35.2±5.7	40.4±2.7
Total	67.0±2.3	80.3±2.0	76.1±8.4	93.1±4.2	89.6±3.4	89.1±1.9	86.2±7.5	94.1±1.6
AGMI								
16:1n9	0.8±0.1	0.6±0.5	0.9±0.6	0.34±0.48	0.6±0.7	0.4±0.2	0.7±0.5	0.3±0.07
18:1n9	4.5±0.2	4.1±1.7	3.8±1.4	3.6±3.1	3.0±0.4	2.8±0.9	1.8±0.6	2.7±0.4
18:1n11	4.4±0.2	4.9±0.5	3.4±0.1	t	1.7±1.4	1.4±0.07	2.2±1.6	t
Total	9.7±0.3	9.6±2.4	8.1±2.0	3.6±2.6	5.7±1.9	4.6±2.0	4.7±0.9	3.0±1.2
AGPI								
18:2n6	1.4±0.5	0.5±0.2	1.0±0.6	2.9±1.7	2.5±0.5	3.0±0.6	3.1±1.0	2.6±0.7
18:3 n3	3.1±1.2	0.3±0.3	t	0.88±0.11	nd	0.7±0.6	5.2±8.4	0.4±0.3
18:4 n3	2.1±0.1	2.3±0.1	0.02±0.2	nd	0.8±0.7	0.3±0.5	t	nd
20:4n6	1.4±1.1	0.2±0.3	1.5±2.5	nd	nd	0.7±0.4	0.4±0.7	nd
20:5n3	7.7±2.0	0.03±0.02	1.7±3.0	nd	nd	nd	nd	nd
22:6n3	7.6±2.0	8.7±4.2	11.6±5.0	nd	1.8±1.8	1.9±1.3	0.15	nd
Total	23.3±2.5	11.8±3.9	15.8±10.3	3.8±1.6	5.0±1.6	6.6±0.9	8.8±7.1	3.0±0.6

AGS= Ácidos grasos saturados

AGMI= Ácidos grasos monoinsaturados

AGPI= Ácidos grasos poliinsaturados

t = trazas

nd = no detectados

La suma del porcentaje de los AGPI de las semillas de ostión cultivadas a 23, 26 y 29°C y alimentadas con la dieta IP tuvieron porcentajes altos de 11.8 a 23.3%. Para las semillas alimentadas con la dieta Dt en todos los niveles de temperatura y a 32°C alimentadas con la dieta IP, los porcentajes fueron muy similares, de 3.0 a 8.8%. No se detectaron los AGPI 18:4n3, 20:4n6, 20:5n3 y 22:6n3 en las semillas de ostión cultivadas a 32°C y alimentadas con ambas dietas (IP y Dt). En las semillas alimentadas con la dieta Dt, el ácido graso 20:5n3 no se encontró en ninguno de los niveles de temperatura ensayados y el ácido graso 22:6n3 tuvo valores bajos.

No se encontraron diferencias significativas entre los contenidos de los AGPI de las semillas de ostión cultivadas a las diferentes temperaturas ($P=0.316$), pero se observó diferencia significativa entre las dietas ($P=0.002$) (Fig. 17 C y D) con valores más altos en las semillas alimentadas con la dieta IP, y en relación con la interacción entre temperaturas y dietas ($P=0.037$).

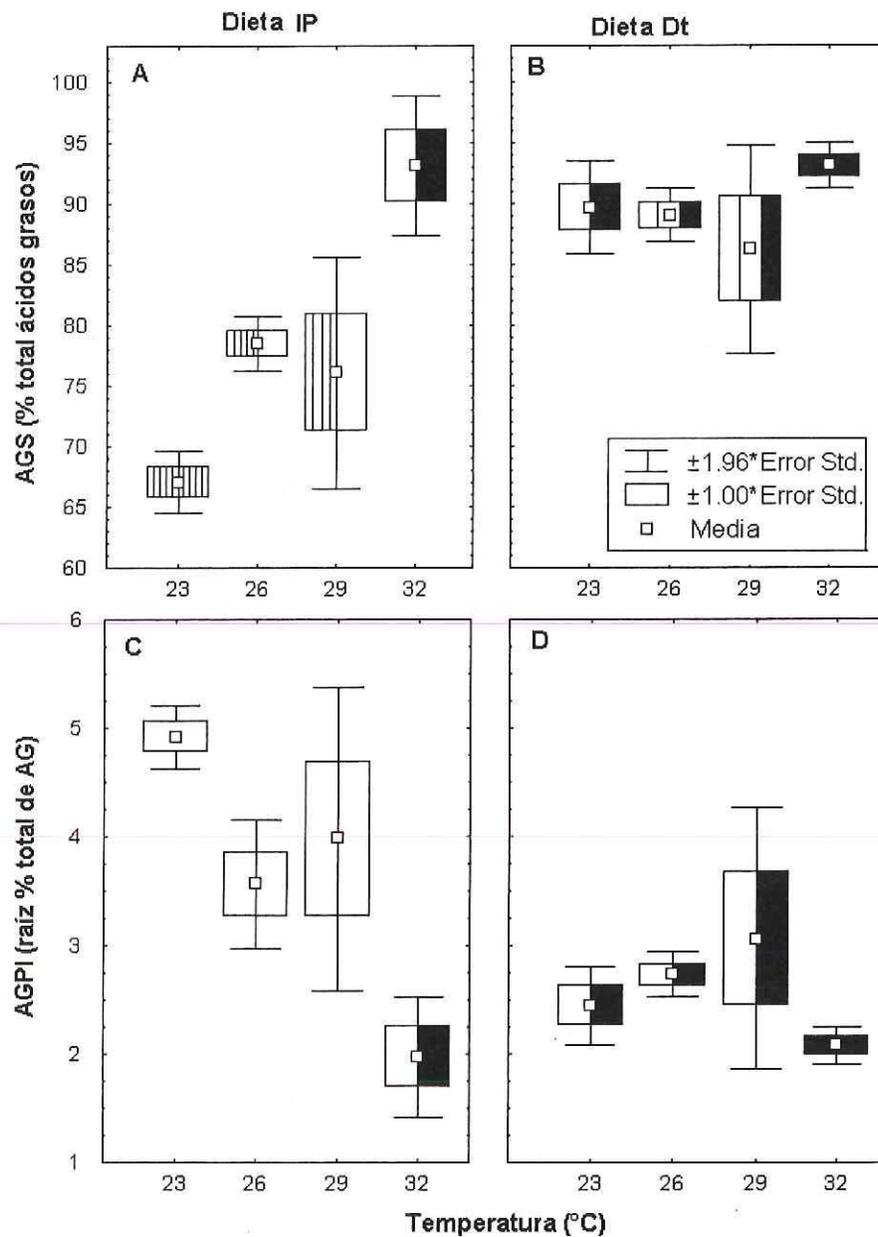


Figura 17. Comparaciones múltiples entre las medias del contenido de ácidos grasos saturados (AGS) y poliinsaturados (AGPI) en semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con una mezcla de las microalgas *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri* (IP) y con la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Dt), en la octava semana de cultivo a 23, 26, 29 y 32°C,.

IV.2.4. CONSUMO DE OXIGENO DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN *C. gigas*

En el experimento 1, el consumo de oxígeno específico (por unidad de peso) en las semillas de ostión fue similar entre dietas y temperaturas en todos los tratamientos, varió de 0.97 a 1.89 mg O₂ h⁻¹ g⁻¹ (Fig. 18). No se encontró diferencia significativa en el consumo de oxígeno de las semillas de ostión en relación con la temperatura (P=0.77), con la dieta (P=0.26), ni en la interacción entre temperatura y dieta (P>0.05).

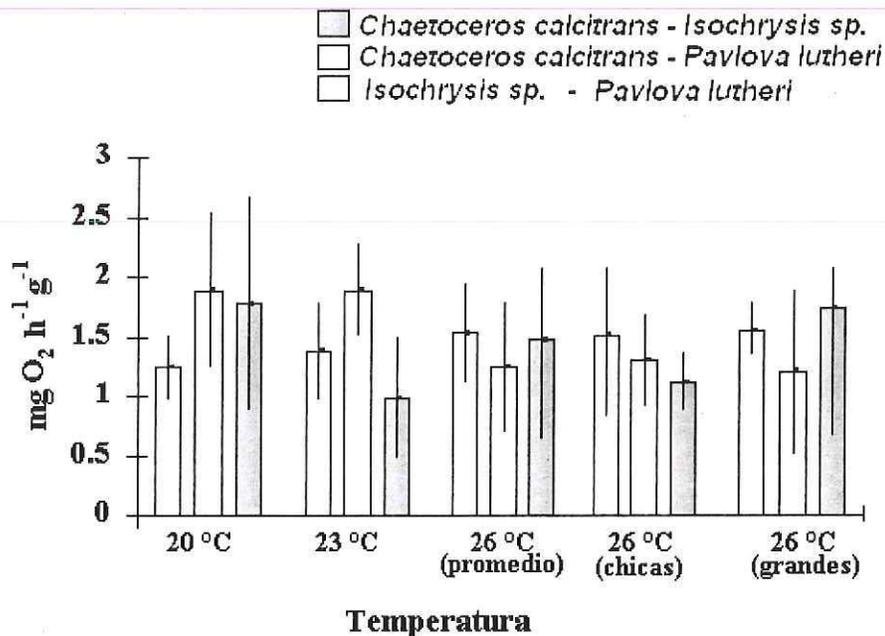


Figura 18. Consumo de oxígeno específico de las semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con tres mezclas de las microalgas, *Chaetoceros calcitrans*-*Isochrysis* sp., *C. calcitrans*-*Pavlova lutheri* e *Isochrysis* sp.-*P. lutheri*, cultivadas a 20, 23 y 26°C. El consumo de oxígeno se expresa en mg de oxígeno consumido por hora por gramo de peso seco orgánico de las semillas de ostión.

El consumo de oxígeno individual tuvo valores similares en las temperaturas de 20 y 23°C, de 1.96 a 2.67 $\mu\text{gO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ semilla}^{-1}$ (Fig.19) y valores notablemente menores en las semillas mantenidas en la temperatura más elevada (26°C), de 0.62 a 1.01 $\mu\text{gO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ semilla}^{-1}$. El consumo de oxígeno fue mayor en las semillas alimentadas con la dieta IP a 20°C y menor en las semillas alimentadas con la dieta IP a 26°C. Se tuvo un mayor consumo de oxígeno en las semillas grandes y los valores menores se tuvieron a 26°C con la dieta IP tanto en semillas grandes como en chicas.

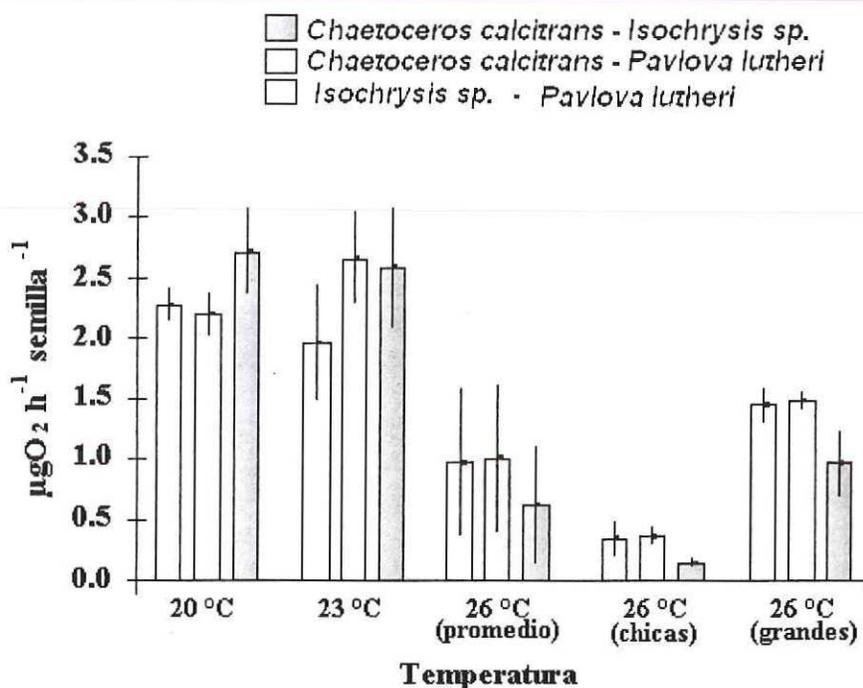


Figura 19. Consumo de oxígeno individual de semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con tres mezclas de las microalgas, *Chaetoceros calcitrans*-*Isochrysis* sp., *C. calcitrans*-*Pavlova lutheri* e *Isochrysis* sp.-*P. lutheri*, cultivadas a 20, 23 y 26°C. El consumo de oxígeno se expresa en μg de oxígeno consumido por hora por semilla.

Se encontró diferencia significativa en el consumo de oxígeno de las semillas de ostión, en relación con la temperatura ($P < 0.05$), pero no se encontró diferencia significativa entre dietas ($P = 0.30$). En referencia al tamaño, también se encontró diferencia significativa en el consumo de oxígeno entre las semillas grandes y las chicas ($P < 0.05$).

En el experimento 2, el consumo de oxígeno específico de las semillas de ostión alimentadas con la dieta IP fue de 0.40 a 6.26 $\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1} \text{g}^{-1}$ y para las semillas alimentadas con la dieta Dt fue de 1.11 a 5.88 $\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1} \text{g}^{-1}$. Este consumo de oxígeno fue menor en las semillas de ostión mantenidas a 26°C y se encontraron valores mayores en las semillas mantenidas a 29 y 32°C. El consumo de oxígeno fue menor en las semillas alimentadas con la dieta IP en casi todos los niveles de temperatura, excepto a 29°C (Fig. 20).

Se encontró diferencia significativa en el consumo de oxígeno de las semillas de ostión, en relación con las temperaturas ($P < 0.05$), con las dietas ($P < 0.001$) y con respecto a la interacción entre las dietas y las temperaturas ($P < 0.001$).

El consumo de oxígeno individual de las semillas de ostión alimentadas con la dieta IP, tuvo un valor promedio de 1.69 a 8.01 $\mu\text{gO}_2 \text{ h}^{-1} \text{semilla}^{-1}$ y para las semillas alimentadas con la dieta Dt fue de 1.20 a 2.50 $\mu\text{gO}_2 \text{ h}^{-1} \text{semilla}^{-1}$ (Fig. 21). El consumo de oxígeno fue mayor en las semillas alimentadas con la dieta IP que en aquellas semillas alimentadas con la dieta Dt, excepto a 32°C. Este consumo de oxígeno, disminuye ligeramente en los niveles de temperatura superiores, en las semillas

alimentadas con la dieta IP, mientras que en las semillas alimentadas con la dieta Dt el consumo de oxígeno es similar en las diferentes temperaturas.

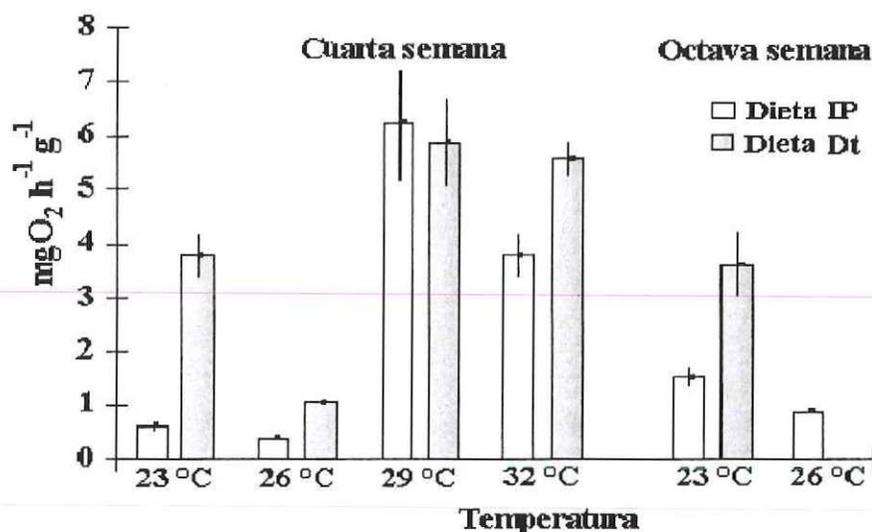


Figura 20. Consumo de oxígeno específico de las semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con una mezcla de las microalgas *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri* (IP) y con la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Dt), a 23, 26, 29 y 32 $^{\circ}\text{C}$, a la cuarta y octava semana de cultivo. El consumo de oxígeno se expresa en mg de oxígeno consumido por hora por gramo de peso seco orgánico de las semillas de ostión.

Se encontró diferencia significativa en el consumo de oxígeno, en relación con las dietas ($P < 0.001$) y con la interacción entre las dietas y las temperaturas ($P < 0.001$); pero no se encontró diferencia significativa entre temperaturas ($P > 0.800$).

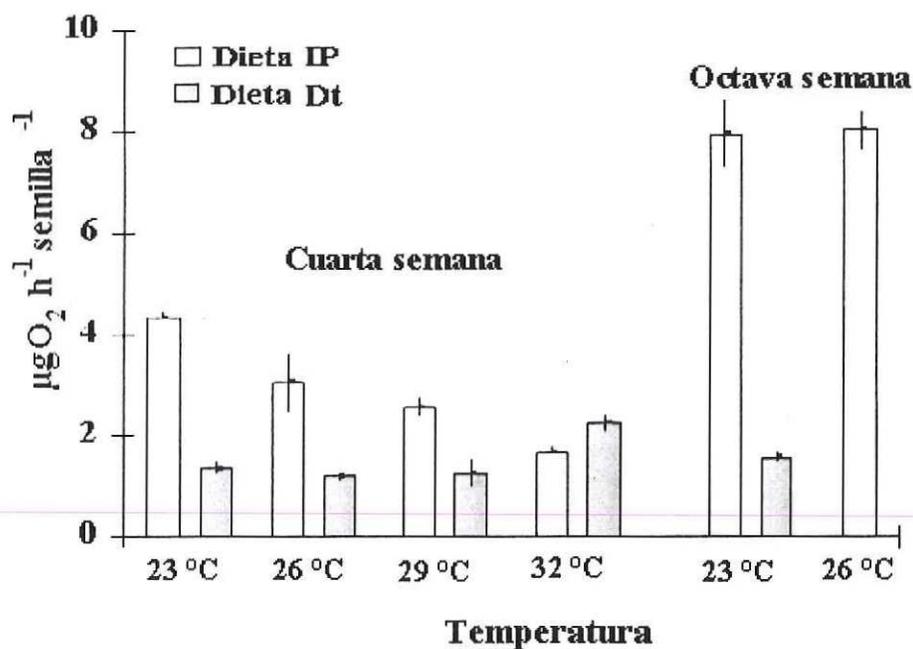


Figura 21. Consumo de oxígeno individual de las semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con una mezcla de las microalgas *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri* (IP) y con la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Dt), a 23, 26, 29 y 32 $^{\circ}\text{C}$, durante la cuarta y octava semana de cultivo. El consumo de oxígeno se expresa en μg de oxígeno consumido por hora por semilla.

No se contó con un número suficiente de semillas para realizar los experimentos de consumo de oxígeno del tratamiento a 26 $^{\circ}\text{C}$ y con la dieta Dt, ni para los ensayos a 29 $^{\circ}\text{C}$ y 32 $^{\circ}\text{C}$ con ambas dietas a la octava semana de cultivo, razón por la cual estos datos no se indican en las figuras 20 y 21.

IV.2.5. EXCRECIÓN DE AMONIO DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN *C. gigas*.

En el experimento 1, la excreción de amonio específica (por peso) de las semillas de ostión fue de 14.5 a 76.5 $\mu\text{gNH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ en los diferentes tratamientos (Fig. 22). La excreción de amonio fue similar en las semillas grandes y chicas, alimentadas con las tres dietas. No se encontraron diferencias significativas en la excreción de amonio en relación con la temperatura ($P=0.67$), con las dietas ($P=0.16$), ni el tamaño ($P=0.76$).

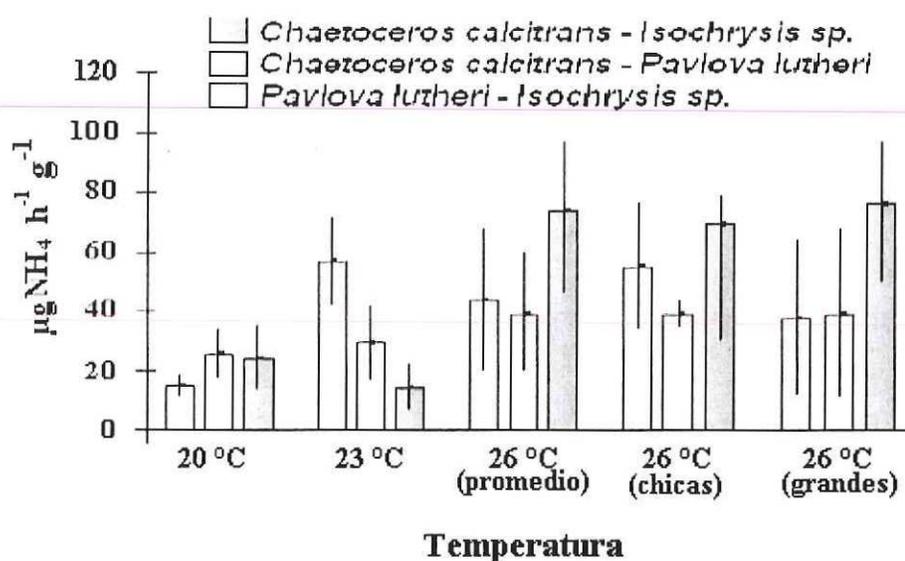


Figura 22. Excreción de amonio específica, de las semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con tres mezclas de las microalgas, *Chaetoceros calcitrans*-*Isochrysis* sp., *C. calcitrans*-*Pavlova lutheri* e *Isochrysis* sp.-*P. lutheri* cultivadas a 20, 23 y 26°C. El amonio se expresa en μg de amonio excretado por hora por gramo de peso seco orgánico de ostión.

La excreción de amonio individual de las semillas de ostión fue de 0.020 a 0.094 $\mu\text{gNH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ semilla}^{-1}$ en los diferentes tratamientos. La excreción de amonio fue mayor en las semillas cultivadas a 23 y 26°C. En general, la excreción de amonio fue similar en las semillas mantenidas con las tres dietas en los tres niveles de temperatura

(Fig. 23). No hubo diferencia significativa en la excreción de amonio en relación con la temperatura ($P=0.09$), con las dietas ($P=0.47$), ni con el tamaño ($P=0.98$).

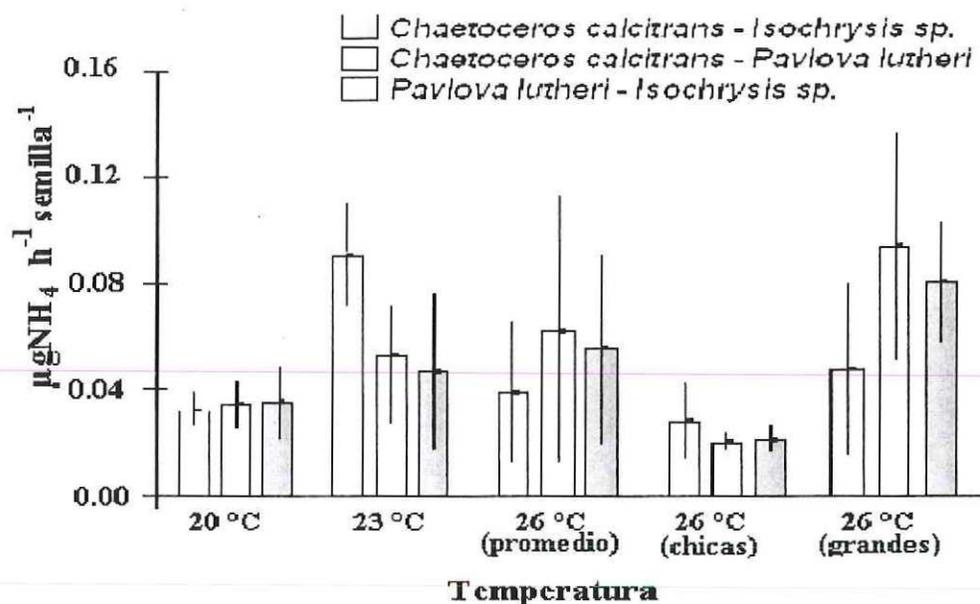


Figura 23. Excreción de amonio individual de las semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con tres mezclas de las microalgas, *Chaetoceros calcitrans*-*Isochrysis* sp., *C. calcitrans*-*Pavlova lutheri* e *Isochrysis* sp.-*P. lutheri* cultivadas a 20, 23 y 26°C. El amonio se expresa en µg de amonio excretado por hora por semilla.

En el experimento 2, la excreción de amonio específica de las semillas de ostión, en los diferentes tratamientos fue de 4.02 a 152.0 µg NH₄ h⁻¹g⁻¹ (Fig. 24). Con la dieta IP a 23, 26 y 32°C la excreción de amonio fue de 4.22 a 22.03 µgNH₄ h⁻¹g⁻¹, mientras que con la dieta Dt fue de 4.02 a 42.10 µgNH₄ h⁻¹g⁻¹. Se observó un gran incremento en la excreción de amonio en las semillas cultivadas a 29°C, con valores de 152.0 µg NH₄ h⁻¹g⁻¹ para las semillas alimentadas con la dieta IP y 122 µg NH₄ h⁻¹g⁻¹ para las semillas con la dieta Dt.

No se encontró diferencia significativa en la excreción de amonio de las semillas, entre dietas ($P=0.18$), pero si se encontró diferencia significativa entre las temperaturas, y en la interacción de las temperaturas y las dietas ($P<0.001$).

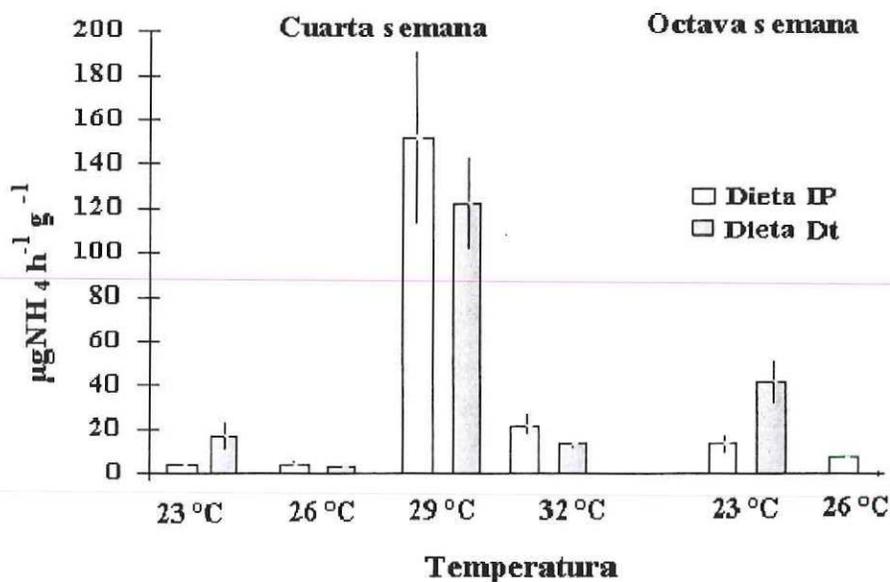


Figura 24. Excreción de amonio específica de semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con la mezcla de microalgas *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri* (IP) y con la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Dt), a 23, 26, 29 y 32°C.

La excreción de amonio individual en las semillas de ostión en los cuatro niveles de temperatura fue de 0.010 a 0.078 $\mu\text{gNH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ semilla}^{-1}$ (Fig. 25), en las semillas alimentadas con la dieta IP y en las semillas alimentadas con la Dt fue de 0.005 a 0.028 $\mu\text{gNH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ semilla}^{-1}$. En general, se observó un aumento en la excreción de amonio de las semillas a mayores temperaturas, excepto a 32°C. La excreción de amonio fue mayor en las semillas alimentadas con la dieta IP.

Se encontró diferencia significativa en la excreción de amonio de las semillas de ostión, entre dietas ($P<0.001$) y en relación con la interacción entre las dietas y las temperaturas ($P<0.001$); pero no se encontró diferencia significativa con respecto a las temperaturas ($P=0.10$).

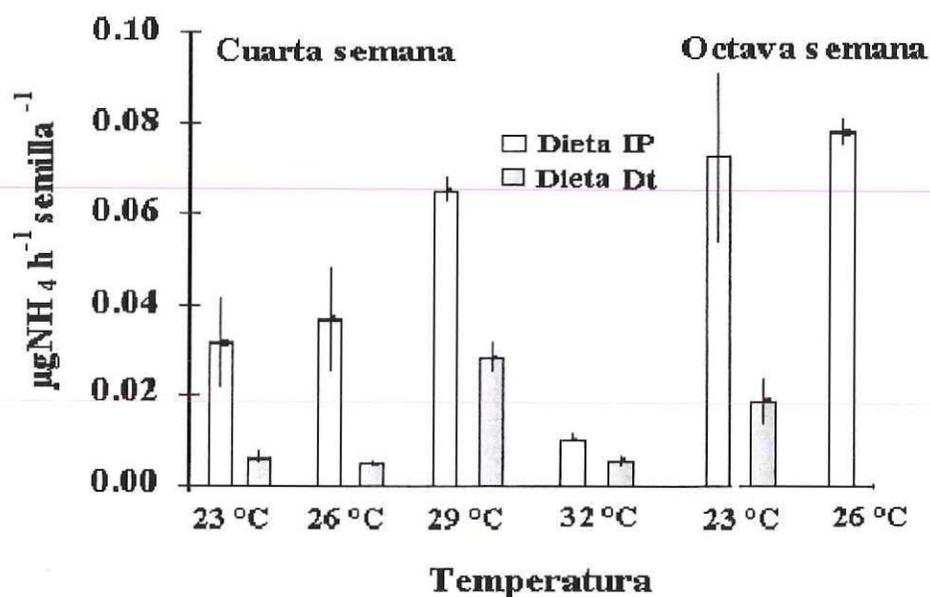


Figura 25. Excreción de amonio individual de semillas de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* alimentadas con la mezcla de microalgas *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri* (IP) y con la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Dt), a 23, 26, 29 y 32 $^{\circ}\text{C}$.

IV.2.6. PROPORCIÓN O:N DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN *C. gigas*

En el experimento 1, las mayores proporciones O:N (por peso y por individuo), fueron las de las semillas mantenidas en la temperatura menor (20 $^{\circ}\text{C}$), con valores de

56.3 a 71.0 y las tasas menores fueron las de las semillas mantenidas en la temperatura mayor (26°C), con valores de 6.3 a 35.8. Las mayores proporciones de O:N fueron obtenidas en las semillas alimentadas con la dieta CI y las tasas menores con la dieta IP (Tabla IX).

Tabla IX. La proporción oxígeno nitrógeno (O:N) en semillas de ostión *Crassostrea gigas*, cultivadas a 20, 23 y 26°C, alimentadas con tres dietas de microalgas CI: *Chaetoceros calcitrans*-*Isochrysis* sp. CP: *C. calcitrans*-*Pavlova lutheri* e IP: *Isochrysis* sp.- *P. lutheri*.

Semana	Temperatura	dieta	Talla	Proporción O:N		
				Por gramo	Por semilla	
8a	20 °C	CI		71.0	62.1	
		CP		65.2	56.3	
		IP		63.5	68.3	
	23 °C	CI		18.4	15.1	
		CP		56.3	44.4	
		IP		58.6	48.3	
	26 °C	promedio	CI		30.8	21.9
			CP		27.6	14.1
			IP		17.4	9.8
chicas		CI		24.0	11.0	
		CP		28.8	16.2	
		IP		14.1	6.3	
grandes		CI		35.8	26.7	
		CP		26.7	13.8	
		IP		19.8	10.5	

En el experimento 2, la mayor proporción O:N (por peso y por individuo) fue la de las semillas mantenidas en la temperatura de 32°C, con valores de 142.6 a 362.9 y las menores proporciones de la O:N se obtuvieron en semillas cultivadas a 29°C, con valores de 34.6 a 42.0 (Tabla X). Las mayores de la proporciones O:N se tuvieron en las semillas alimentadas con la dieta Dt, en la cuarta semana del experimento.

Tabla X. La proporción oxígeno nitrógeno O:N de las semillas de ostión *Crassostrea gigas*. Semillas cultivadas a 23, 26, 29 y 32°C y alimentadas con las dietas de microalgas. IP: *Isochrysis sp-Pavlova lutheri* y Dt: *Dunaliella tertiolecta*.

Semana	Temperatura	dieta	Proporción O:N	
			Por gramo	Por semilla
4a	23 °C	IP	124.4	121.5
		Dt	191.7	194.6
	26 °C	IP	66.2	73.7
		Dt	224.4	224.6
	29 °C	IP	36.0	34.6
		Dt	42.0	39.9
	32 °C	IP	149.7	142.6
		Dt	362.9	361.0
8a	23 °C	IP	96.1	96.5
		Dt	75.0	74.0
	26 °C	IP	90.3	90.0

V. DISCUSIÓN

V.1 CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN *C. gigas*

El cultivo de moluscos filtradores constituye, en peso, la contribución más importante de la producción acuicultural a nivel mundial. A pesar de la importancia que esto representa, se han desarrollado pocos estudios para investigar los requerimientos nutricionales de los bivalvos, por lo que se conoce poco acerca de su alimentación y la interacción con otros factores ambientales, como la temperatura, tal es el caso del ostión *Crassostrea gigas*, organismo de estudio de esta investigación.

En el experimento 1 se tuvo el mejor crecimiento, tanto en peso como en talla en la temperatura de 23°C, esto concuerda con los resultados de Bayne (2002), quien reporta que *C. gigas* tiene su mayor crecimiento a temperaturas mayores de 20°C, alimentados con agua del medio natural. Asimismo, el crecimiento (en mm) de las semillas de ostión *C. gigas* alimentada con la dieta IP y mantenidas a 23°C fue mayor, esto probablemente se debe a que esta temperatura se acerca a 24°C, temperatura a la cual esta especie tiene un crecimiento más rápido (Friedman *et al.*, 1998).

Por otro lado, no se obtuvo diferencia en el crecimiento de las semillas de ostión debido a que las tres dietas proporcionadas consistieron de una mezcla de microalgas, que al complementarse nutricionalmente, promueven un mayor crecimiento, en contraste con las dietas monoalgales (Whyte *et al.*, 1990; O'Connor *et al.*, 1992; Fidalgo *et al.*, 1994; Patarpekar *et al.*, 2000; Chávez *et al.*, 2002; Milke *et al.*, 20004). Las mezclas de microalgas, como las dietas proporcionadas en este experimento, se han utilizado con éxito como alimento para diferentes moluscos bivalvos (Kobayashi *et al.*, 1997; McCausland *et*

al., 1999; Hyun *et al.*, 2001; Bayne, 2002, Cerón, 2006).

El éxito de las mezclas de microalgas radica en su composición bioquímica. Los valores de proteínas de las dietas utilizadas en este estudio fueron altos (promedios cercanos al 50%). Estos altos niveles de proteínas promueven un mejor crecimiento de los mejillones *Mytilus trossulus* (Kreeger y Langdon, 1993).

Los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) 20:5n₃ y 22:6n₃, son componentes esenciales en la dieta de moluscos (Brown, 1991; Chu y Greaves, 1991; Knauer y Southgate, 1997). Para obtener altas tasas de crecimiento en *C. gigas*, es más importante el 20:5n₃ que el 22:6n₃ en la dieta (Enright *et al.*, 1986; Knauer y Southgate, 1997). Waldock y Holland (1984) encontraron que *C. gigas* crece bien con dietas de microalgas deficientes en 22:6n₃, esto fue corroborado en el experimento 1, donde las dietas elaboradas mezclas de microalgas tuvieron bajos niveles de 22:6n₃ y los ostiones crecieron satisfactoriamente, esto sugiere que la concentración de 20:5n₃ satisface los requerimientos de AGPI de esta especie.

En los bivalvos, el crecimiento es afectado por la densidad, medida como el número de organismos por unidad de volumen (Heasman *et al.*, 2002) y decrece a medida que la densidad se incrementa (Harvey y Vincent, 1991; Vincent *et al.*, 1994; Honkoop y Bayne 2002), posiblemente como resultado de la limitación de alimento resultante de la competencia (Hadley y Manzi, 1984).

En el experimento 2, la variación en el crecimiento de las semillas de ostión cultivadas a 23°C, 26°C y 29°C y alimentadas con la dieta IP y la dieta monoalgal *Dunaliella tertiolecta* (Dt) fue similar, este crecimiento dependió fuertemente de la dieta. En las semillas de *C. gigas* (Knauer y Southgate, 1997) y *Pinctada maxima* (Mills, 2002), se

observaron resultados de crecimiento adecuados en los organismos cultivados 29°C como máximo; por el contrario, en el presente estudio, la temperatura si causó un efecto negativo en los organismos, ya que a 32°C el crecimiento y supervivencia de las semillas fue afectado fuertemente, independientemente de la dieta que recibieron, ya que aunque fueron alimentadas con dietas de alta y baja calidad nutricia, no se observó una diferencia en el crecimiento. Esta ausencia de crecimiento en las semillas de ostión se puede explicar debido a que estos organismos utilizaron su energía sólo para sobrevivir. Bougrier *et al.* (1995) mostraron que la energía necesaria para sobrevivir, sin un crecimiento neto, debe ser dos veces mayor cuando los organismos se cultivan a 32°C, en comparación con la energía requerida a 23°C.

En este estudio, las diferencias de crecimiento entre las semillas de ostión alimentadas con dietas diferentes, muestran que estas dietas difieren ampliamente en su calidad. Aunque la composición bioquímica gruesa es similar en ambas dietas, la diferencia radica en el perfil y concentración de ácidos grasos, en especial los ácidos grasos poliinsaturados, que es similar a lo reportado por diversos autores (Okuyama *et al.*, 1992; Liu y Lin, 2001; Tonon *et al.*, 2002). Los ácidos grasos esenciales se acumulan selectivamente a partir de la dieta, en diferentes estadios de desarrollo y en diferentes especies de bivalvos (Soudant *et al.*, 1996; Caers *et al.*, 1998, 1999 b,c 2000, 2002).

En la microalga *D. tertiolecta* (Dt), fue evidente la carencia de los ácidos grasos de cadena larga, superiores a 18 carbonos, lo que es característico de esta especie (Waldock y Holland, 1984; McCausland *et al.*, 1999). Es posible que esta deficiencia se reflejara en el poco crecimiento de las semillas de ostión observado en este trabajo, sobre todo porque fue evidente la carencia de los ácidos grasos 20:5n3 y 22:6n3 en esta microalga y que son

considerados esenciales para el crecimiento de las semillas de ostión (Brown *et al.*, 1998)., La adición de los ácidos grasos 20:5n3 y 22:6n3 a una dieta con *D. tertiolecta*, para semillas de ostión del Pacífico, resultó en un incremento en el crecimiento (peso seco orgánico) de los organismos . (Knauer y Southgate, 1997)

La supervivencia de las semillas de *C. gigas*, obtenida en este trabajo con los diferentes tratamientos, pero con temperatura de hasta 29°C, fue alta,, debido a que las temperaturas y dietas no fueron limitantes para el crecimiento. La supervivencia de las semillas expuestas a 32°C, empezó a declinar a la tercera semana del cultivo y a la quinta semana se observó una mortalidad mayor al 50%. Esta temperatura fue muy alta, Gribben *et al.* (2002) y Mills (2000), mencionan que una exposición prolongada a altas temperaturas afecta fuertemente la supervivencia, incrementa la tasa metabólica y el costo energético, que conllevan una pérdida de tejido corporal rápida y consecuentemente sobreviene la muerte.

Las semillas de *P. maxima* crecen bien a una temperatura inferior o igual a 29°C, por arriba de ésta, el crecimiento declina Mills (2002) y a 32°C se registran mortalidades significativas. (Bougrier *et al.*, 1995), por lo que se puede considerar que la temperatura de 29°C es el límite superior del intervalo de resistencia. Para el ostión del Pacífico, el crecimiento cesa alrededor de los 30°C y cuando la temperatura se encuentra entre 33 y 37°C esta especie experimenta un choque térmico, dependiendo de la temperatura de aclimatación (Friedman *et al.*, 1998).

Los resultados del presente estudio mostraron que cualquiera de las dietas proporcionadas (excepto *D. tertiolecta*) tienen las características idóneas para ser utilizadas como alimento para las semillas de ostión *C. gigas* a temperaturas menores de 29°C.

V.2. COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN *C. gigas*

Los requerimientos óptimos de proteínas, carbohidratos y lípidos en la dieta de los animales cultivados son influenciados por diversos factores, genéticos, ambientales y por la calidad nutricional de cada componente de la dieta. En este sentido, uno de los principales factores limitantes para el desarrollo de un organismo cultivado es la nutrición, principalmente en los estadios iniciales de la vida, donde el alimento vivo es la mejor opción, porque conserva las propiedades nutritivas de las proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales (Luna, 2002).

Para muchos bivalvos, los requerimientos de proteínas varían de 30 a 60 % (Webb y Chu, 1983, Brown *et al.*, 1989), del 5 al 30 % de carbohidratos (Enright *et al.*, 1986, Brown *et al.*, 1989) y del 5 al 23 % de lípidos (Brown *et al.*, 1989). Aunque en lo general, la información relacionada con la composición proximal de *C. gigas* y de otros bivalvos depende de las diferentes condiciones del medio en que viven o son cultivados.

Con referencia a la composición proximal de *C. gigas*, diversos autores reportan que el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos varía en un intervalo de 60 a 80%, 6 a 29% y 9 a 20% respectivamente (Laing y Earl, 1998; Almeida *et al.*, 1999; Berthelin *et al.*, 2000; Soletchnik *et al.*, 2001). La composición proximal de las semillas de ostión *C. gigas* cultivadas en este estudio es similar a los valores reportados en estudios previos.

En general, el porcentaje de proteínas de las semillas de *C. gigas* disminuyó a temperaturas elevadas, en los dos experimentos realizados, debido a que la temperatura tiene una gran influencia sobre la fisiología y composición bioquímica de los ostiones (Newell *et al.*, 1977; Mann, 1979; Newell y Branch, 1980; Child y Laing, 1998).

A 32°C se tuvieron los valores de proteínas más bajos, quizá debido a que en esta temperatura se detuvo la síntesis de proteínas. Se ha registrado que altos niveles de temperatura pueden causar estrés térmico e inclusive detener la síntesis proteica en organismos acuáticos poiquilotermos (Somero y Hoffman, 1996).

El ostión *C. gigas* sintetiza proteínas de shock por calor (HSP) y exhibe una prolongada inducción a la termo-tolerancia, por lo menos 3 semanas después de exponerlos a un shock térmico (Friedman *et al.*, 1998). En ostiones mantenidos a 12 °C se requirió que la temperatura se elevara a más de 21 °C para inducir la producción de HSPs, en tanto que aquellos animales aclimatados a 22 °C, las produjeron después de una exposición a 37 °C. Así, es posible que la temperatura necesaria para inducir una respuesta al estrés, esté relacionada con el límite térmico superior del ostión (43.5-44 °C) y con la magnitud del shock térmico (Friedman *et al.*, 1998).

Se desconoce si las semillas de ostión del experimento dos, mantenidas a 32 °C, empezaron la síntesis de HSP, aunque esto es muy probable, ya que las semillas no tuvieron buen crecimiento y empezaron a morir a la quinta semana de exposición.

Los carbohidratos son constituyentes estructurales y de almacenamiento de organismos marinos (Bhosle *et al.*, 1993). En general, en este estudio los contenidos de carbohidratos tuvieron una tendencia a disminuir a temperaturas elevadas, tendencia similar a la observada por Shpigel *et al.* (1992) para *C. gigas*. El costo energético se incrementa rápidamente en las semillas de ostión cultivadas a altas temperaturas, por lo que se espera una disminución de las reservas, tales como el glicógeno. Esto puede explicar los bajos

contenidos de carbohidratos en los organismos expuestos a altas temperaturas, en ambos experimentos.

En semillas de *O. edulis*, el glicógeno es más importante que los lípidos como reserva energética, en especial bajo condiciones de estrés nutricional (Beninger y Lucas, 1984; Kang *et al.*, 2000). El glicógeno es acumulado principalmente a partir del alimento obtenido en el medio (Thompson *et al.*, 1996; Chávez *et al.*, 2002). En el experimento 2 de este estudio, la disminución principal de carbohidratos fue registrada desde los 26°C, indicando que la demanda energética empieza a esa temperatura y que esta demanda es mayor a 32°C donde se observó un efecto negativo más importante en el crecimiento.

Los lípidos son de gran importancia en el acondicionamiento y en la acumulación de reservas de energía o como precursores de tejido estructural (Swift *et al.*, 1980; Martínez *et al.*, 2000) y en los bivalvos marinos, su disponibilidad depende de diversos factores, entre ellos, la temperatura (Freites *et al.*, 2002), la dieta (Napolitano *et al.*, 1992, Freites *et al.*, 2002), la reproducción (Napolitano y Ackman, 1992; Pazos *et al.*, 1997), el sexo (Lubet *et al.*, 1986) y como consecuencia de periodos de inanición (Fraser, 1989; Caers *et al.*, 2000).

En los experimentos 1 y 2 de este estudio, el patrón de acumulación de los lípidos de *C. gigas* tuvo una tendencia inversa al de las proteínas y los carbohidratos, los lípidos fueron abundantes a las temperaturas más elevadas, una tendencia similar fue observada en ...por Shpigel *et al.* (1992). Cuando los organismos poiquiloterms se exponen a altas temperaturas, la fluidez de sus membranas se incrementa desestabilizandolas. Entre los mecanismos que pueden actuar contra esta pérdida de funcionalidad ocasionado por el aumento de la fluidez,, están el incremento en el contenido de colesterol (lípidos neutros)

(Robertson y Hazel, 1996), o un incremento en la proporción de ácidos grasos saturados (Hazel, 1988).

El incremento en el contenido de los ácidos grasos saturados (AGS), sobre todo el ácido graso 16:0, que se encontró en mayor concentración en las semillas de ostión, puede estar asociado con una respuesta compensatoria para regular la fluidez de la membrana, al incrementarse la temperatura una respuesta similar a la registrada en ostiones aclimatados a temperaturas cálidas por Chu y Greaves, (1991), quienes encontraron que el ácido graso 16:0 es el componente principal de los lípidos polares. Un incremento en los AGS indica un estado fisiológico no óptimo (Leonardos y Lucas, 2000). En este estudio se observó un incremento en el contenido de los AGS en las semillas que se mantuvieron a temperaturas más elevadas en ambos experimentos, lo que significa que estas temperaturas estresan a las semillas de ostión.

Los ácidos grasos 18:1n9 y 18:2n6 se depositan principalmente en los lípidos neutros, donde se pueden utilizar como sustrato energético para la síntesis de nuevos ácidos grasos (Caers *et al.*, 2000). En las semillas de ostión *C. gigas* con y sin alimento, se ha observado un incremento en el contenido del 18:1 n11 (Cotteau *et al.*, 1996; Knauer y Southgate, 1997), aún cuando este ácido graso no está presente como un componente mayor de la dieta, es posible que estos ácidos grasos sean intermediarios en la biosíntesis de ácidos grasos de 22 carbonos (Whyte, 1988; Thompson y Harrison, 1992). En el experimento 2, se observó un incremento similar en el contenido del ácido graso 18:1 n11 en las semillas alimentadas con la mezcla IP, pero no en las semillas alimentadas con la dieta Dt.

Solo los organismos fotosintéticos son capaces de sintetizar de novo los ácidos 18:3n3 y 18:2n6 y son metabolizados por los animales, en diferentes medidas, para producir ácidos

de cadena más larga (n_3 18:3—18:4—20:4—20:5—22:6 y n_6 18:2—18:3—20:4—22:4—22:5) (Chu y Greaves, 1991). En particular, *Crassostrea gigas* tiene una capacidad limitada para desaturar y elongar los ácidos grasos linoléico (18:2 n_6) y linolénico (18:3 n_3) y por lo tanto, para producir suficientes cantidades de AGPI C20 y C22, que sean suficientes para soportar un crecimiento óptimo (Waldock y Holland, 1984; Chu y Greaves, 1991).

Coutteau *et al.* (1996), observaron una disminución en los ácidos grasos n_3 principalmente de los ácidos 18:3 y 18:4 en semillas de *Placopecten magellanicus* mantenidas en inanición. En el experimento 2 de este estudio, también se observó un decremento de estos dos ácidos grasos en las semillas de ostión alimentadas con la dieta de baja calidad (*D. tertiolecta*), de la cuarta a la octava semana de cultivo. Esto probablemente indujo un incremento en el contenido total de los AGS. Lo anterior no sucedió con las semillas de ostión alimentadas con las dietas de alta calidad nutricia.

Las prostaglandinas (PGs) son conocidas como eicosanoides (C20), estos compuestos son biosintetizados por oxigenación enzimática del homo- γ -linolenato (20:3 n_6), del ácido araquidónico (20:4 n_6) y del ácido eicosapentaenóico (20:5 n_3).

El ácido araquidónico (20:4 n_6) se encuentra en bajo porcentaje de muchas microalgas marinas (Araki *et al.*, 1990; Bigogno, 2002). En general, los C20 se encuentran frecuentemente en niveles muy bajos (en cantidades menores a 0.1%) (Stanley-Samuelson y Howard, 1998). En nuestro estudio, el ácido graso 20:4 n_6 , no se detectó en las semillas de *C. gigas*, en los tratamientos con temperaturas altas (32 °C), lo que podría significar que las semillas lo utilizaron para soportar las condiciones adversas que se presentaron en estas temperaturas, esto probablemente también indujo los menores crecimientos en estos tratamientos.

Cuando se presenta un aumento de la temperatura, se incrementa la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) presentes en los organismos (Chu y Greaves, 1991). En los organismos ectotermos, los cambios en la temperatura provocan una perturbación importante en la función de las membranas, celulares, en esta condición, un ajuste en la composición de los ácidos grasos que la componen participan en el control de la fluidez de la misma (Hall *et al.*, 2002). En este estudio, el alto contenido de AGS de *C. gigas*, en las temperaturas altas y los bajos porcentajes de los AGPI, muestran que la desaturación de éstos AGPI o su sustitución, ocurre a temperaturas elevadas.

En los tejidos de los animales se retiene el ácido graso 22:6 más que el 20:5 (Caers, 1999). En el experimento 2 (del presente estudio), se encontró que el ácido graso 22:6 estuvo presente en mayor porcentaje que el 20:5 en las semillas de *C. gigas* (en la mayoría de los tratamientos), lo que coincide con la hipótesis de Caers (1999). El ácido graso 20:5 está involucrado en la respuesta a los cambios en la fluidez de la membrana a bajas temperaturas (Hall *et al.*, 2002); sin embargo, en temperaturas altas el ácido graso 22:6 puede tener un papel activo más importante en la regulación de la fluidez de la membrana, debido a que su punto de fusión es 10°C mayor que el punto de fusión del ácido graso 20:5 (Hall *et al.*, 2002).

V.3. CONSUMO DE OXÍGENO DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN *C. gigas*

El consumo de oxígeno de un animal depende principalmente del peso corporal o talla (Yukihira *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1999), de la alimentación (Widdows, 1978; Beiras *et al.*, 1994) y de la temperatura (Bougrier *et al.*, 1995). Diversos autores han documentado una gran variación en la tasa de consumo de oxígeno de diferentes especies de moluscos

bivalvos, cuando se incrementa la temperatura (Shumway y Koehn, 1982; Bougrier *et al.*, 1995; Ren y Ross, 2001).

El consumo de oxígeno tanto por unidad de peso ($\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) como por individuo ($\mu\text{gO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ semilla}^{-1}$) de las semillas de ostión, en el experimento 1, tuvo valores muy cercanos entre sí en las tres temperaturas evaluadas; pero se observó una disminución en el consumo de oxígeno en las semillas mantenidas en la temperatura más alta (26°C). En el experimento 2, también se observó un decremento en el consumo de oxígeno en las semillas de ostión mantenidas a 26°C . Esto pudo deberse a que los ostiones redujeron su tasa metabólica y empezaron a cerrar sus valvas en las temperaturas elevadas. Este mecanismo de compensación metabólica se ha documentado ampliamente en el caso de los moluscos bivalvos.

El consumo de oxígeno en las semillas de ostión mantenidas a 29°C y 32°C , debió ser menor, ya que se esperaba una respuesta similar a la registrada en 26°C , el la que los ostiones cerraban sus valvas. Sin embargo, en esas temperaturas se tuvieron valores mayores a los obtenidos a 26°C , esto se pudo deber a que los experimentos se llevaron a cabo en diferentes tiempos y con diferentes organismos. Estos ensayos se realizaron empezando con la temperatura más elevada (32°C), después se ensayó la temperatura de 29°C y así sucesivamente, por lo que posiblemente, cuando se realizaron los ensayos a las temperaturas más altas, los organismos aún no se encontraban en condiciones de enfrentar los efectos adversos de temperatura.

El consumo de oxígeno de los ostiones fue influenciado fuertemente por las temperaturas elevadas, sobre todo en la temperatura extrema de 32°C , temperatura cercana a la temperatura crítica máxima (TCM) para *C. gigas*, aunque esta TCM varía dependiendo

de la temperatura de aclimatación. Friedman *et al.* (1998) reportan que *C. gigas* experimenta un choque térmico cuando la temperatura se encuentra entre 33°C y 37°C, dependiendo de la temperatura de aclimatación.

Los animales de talla pequeña consumen proporcionalmente más oxígeno que los animales más grandes (Bougrier *et al.*, 1995). En el experimento 1 del presente estudio, el consumo de oxígeno de las semillas *C. gigas* ($\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) que se mantuvieron a 26°C, tanto chicas como grandes (organismos de la misma edad, pero de diferente talla), tuvieron un consumo de oxígeno similar. Al comparar el consumo de oxígeno individual ($\mu\text{gO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ semilla}^{-1}$), entre las semillas chicas y grandes, los resultados tuvieron una diferencia marcada, el consumo de oxígeno fue mayor en las semillas grandes.

Kinne (1971) describió como algunos invertebrados marinos tienen la capacidad de modificar su respuesta a la temperatura, por la aclimatización o aclimatación, incrementando su capacidad de sobrevivir, reproducirse o competir bajo nuevas condiciones. *Mytilus edulis* y *Ostrea edulis* entre otros bivalvos, se aclimatan a la temperatura de tal manera que procesos como la respiración se mantiene relativamente independiente de la temperatura.

Con referencia a las dietas en el experimento 1, tanto el consumo de oxígeno específico ($\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) como el individual ($\mu\text{gO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ semilla}^{-1}$) de las semillas de ostión, , fue similar en todos los tratamientos, esta similitud se debió a la alta calidad nutricia de las tres dietas que fueron suministradas a las semillas, consistentes en mezclas de microalgas (*Chaetoceros calcitrans*-*Isochrysis* sp. CI, *C. calcitrans*-*Pavlova lutheri* CP e *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri* IP) que son consideradas adecuadas para la alimentación de bivalvos marinos (Kobayashi *et al.*, 1997; McCausland *et al.*, 1999; Hyun *et al.*, 2001; Bayne, 2002).

La diferencia en los valores del consumo de oxígeno obtenidas en este estudio para las semillas de ostión, se deben a la diferencia en la calidad nutritiva de las dietas, ya que la mezcla IP presentó en este estudio un mejor perfil de ácidos grasos esenciales comparada con la dieta monoalgal Dt. Caers *et al.* (2002) utilizaron una mezcla similar encontrando también un perfil óptimo de ácidos grasos esenciales.

Los resultados publicados por diversos autores en relación con el consumo de oxígeno del ostión y de otros bivalvos, muestran una gran variación, posiblemente asociadas con las diferentes condiciones en las que realizaron sus experimentos y que incluyen diferencias en la temperatura, en alimentación y en la talla de los animales, entre otras (Tabla XI), por lo que es difícil realizar comparaciones. Los valores del consumo de oxígeno en las semillas del ostión *C. gigas*, fueron más cercanos a los obtenidos por Klumpp y Griffiths (1994) en *Argopecten irradian concentricus* que tuvieron una talla similar a la de las semillas de ostión utilizadas en este trabajo.

V.4. EXCRECIÓN DE AMONIO DE SEMILLAS DE OSTIÓN *C. gigas*

La tasa de excreción de amonio de un organismo depende principalmente del peso corporal o talla (Navarro y Winter, 1982; Carvalho y Phan, 1997; Yukihiro *et al.*, 1998) de la temperatura (Chen y Kou, 1996; Crear y Forteach, 2002) y de la alimentación (Dall y Smith, 1986; Yukihiro *et al.*, 2000; Crear y Forteach, 2002).

En el experimento 1, tanto la excreción específica de amonio ($\mu\text{gNH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) como la individual ($\mu\text{gNH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ semilla}^{-1}$), de las semillas de ostión, tuvieron valores cercanos en las tres temperaturas ensayadas, pero se observó un aumento en las semillas mantenidas a 26°C, lo que implica un incremento en el gasto energético metabólico de las semillas de

Tabla XI. Consumo de oxígeno de moluscos bivalvos, publicados por diversos autores y los resultados promedio de los dos experimentos obtenidos en este estudio.

Especie	Talla	ml O ₂ h ⁻¹ g ⁻¹	Temperatura	dieta	Autor(es)
<i>C. gigas</i>	1.0-11.5 mg y	1.10-1.66	20°C	Microalgas <i>ma</i>	Este estudio
	4.0-12.0 mm	0.32-2.50	23°C		
		0.26-1.10	26°C		
		4.12-4.38	29°C		
		2.64-3.89	32°C		
	1 g	0.68	17°C	Medio natural <i>nat.</i> y <i>ma</i>	Ropert y Gouletquer, 2000
	9 g	0.5-0.6	8-15°C		Sphigel <i>et al.</i> , 1992
	30 g	1.4-1.5	30°C		Bayne 2002
	semillas	0.658	Marzo		
		0.192	Julio		
		0.54	15-18°C	<i>nat</i>	Barillé <i>et al.</i> , 1997
	0.261-0.392 mg	0.41-0.72	20 °C	<i>nat</i>	Gouletquer <i>et al.</i> , 1999
	semillas 44 mg	0.29 a 2.7	25 °C	<i>I.galbana</i> + <i>C.calcitrans</i>	Gerdes, 1983
<i>C. angulata</i>	340 mg	0.40	20 °C	<i>nat</i>	Gouletquer <i>et al.</i> , 1999
<i>C. virginica</i>		0.24	21 °C	<i>I.galbana</i> + <i>T.fluviatilis</i>	Hartwell <i>et al.</i> , 1991
<i>O. edulis</i>	1g	0.36	5°C		Rodhouse, 1978
<i>P. maxima</i>		0.86			
<i>P. margaritifera</i>		1.04	28 °C	<i>Isochrysis</i> sp.	Yukihira <i>et al.</i> , 1998
<i>P. maxima</i>		0.9-0.99			
<i>P. margaritifera</i>	100 mm	1.1	23-32°C	<i>Isochrysis</i> sp.	Yukihira <i>et al.</i> , 2000
		1.2			
		1.3			
		1.5			
Ostras gigantes		0.1 a 1.6	24-27°C	<i>Nat</i> o <i>D. tertiolecta</i>	Kluimpp y Griffiths, 1994
<i>Argopecten irradian</i>	3.5 a 5 mm	1.24	15°C		Lu <i>et al.</i> , 1999
<i>concentricus</i>		1.77	20°C		
		2.33	25°C		
		2.74	30°C		
		1.2-5.14			
<i>M. galloprovincialis</i>	Individuo	0.43-0.50			
<i>Dreissena polymorpha</i>	1g	1.62 mg	20°C		Navarro <i>et al.</i> , 1991
		2.45	24°C		Aldridge <i>et al.</i> , 1995
		4.21	28°C		
		5.92	32°C		

ostión, aún cuando las dietas microalgas fueron de alta calidad nutricional (CI, CP e IP). Se ha observado un relación directa entre el incremento en la temperatura (de 8°C a 30°C) y la excreción de amonio de *C. gigas* (Walne y Mann 1975).

La excreción de amonio cuantificada en este estudio debió ser mayor a medida que la temperatura se incrementó, particularmente en la temperatura de 32°C, sin embargo, al igual que con el consumo de oxígeno la diferencia en los tiempos en que se realizaron los experimentos pudo ser la causa de la respuesta obtenida.

La disminución en la excreción de amonio de las semillas de ostión expuestas a 32°C, pudo estar asociada con el hecho que los organismos comenzaron a cerrar sus valvas en respuesta al estrés térmico al que fueron sometidos. A niveles extremos de temperatura, la excreción de amonio aumenta, como consecuencia de un incremento en el catabolismo de proteínas, cuya energía se utiliza para compensar el incremento en la demanda de energía metabólica (Widdows, 1978a).

En relación con las dietas del experimento 1, la tasa de excreción amoniacal específica ($\mu\text{gNH}_4 \text{ h}^{-1}\text{g}^{-1}$) y la individual ($\mu\text{gNH}_4 \text{ h}^{-1}\text{semilla}^{-1}$), no tuvieron un resultado consistente bajo las tres temperaturas ensayadas. Lo mismo se observó para las semillas grandes y chicas, cultivadas a 26°C, la excreción de amonio fue similar, debido a que las tres dietas proporcionadas a las semillas fueron de buena calidad nutricional, lo que significa que se puede obtener una excreción de amonio menor a temperaturas menores de 26°C.

En el experimento 2 se tuvo una diferencia muy marcada tanto en la excreción de amonio específica ($\mu\text{gNH}_4 \text{ h}^{-1}\text{g}^{-1}$), como en la individual ($\mu\text{gNH}_4 \text{ h}^{-1}\text{semilla}^{-1}$), las semillas de ostión alimentadas con la dieta Dt, tuvieron valores muy bajos en las cuatro diferentes

temperaturas. Esto pudo deberse a que quizá las semillas no tuvieron las condiciones necesarias para llevar a cabo sus funciones metabólicas, lo que también se vio reflejado en el escaso crecimiento que tuvieron estas semillas durante el experimento.

La excreción de amonio de un animal está influenciada fuertemente por su talla (Yukihira *et al.*, 1998), esta condición se corrobora con los resultados obtenidos en el presente estudio. Son pocos los autores que reportan los resultados de la excreción de amonio expresados por individuo. Lu *et al.* (1999) reportan valores de 0.12 a 0.42 $\mu\text{NH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ en *Argopecten irradian concentricus* en temperaturas de 15 a 20°C (Tabla XII), valores muy diferentes a los encontrados en este estudio.

V.5. PROPORCIÓN OXÍGENO NITRÓGENO (O:N) DE LAS SEMILLAS DE OSTIÓN *C. gigas*

Navarro *et al.* (1991) mencionan que en los mejillones, *M. galloprovincialis*, los valores de la proporción O:N menores de 40, indican que el sustrato metabólico catabolizado son las proteínas y que valores mayores a 60 indican que el sustrato catabolizado en mayor proporción son los carbohidratos. Valores bajos de la tasa O:N reflejan altas tasas de excreción de nitrógeno, lo que indica un estado de estrés en los animales (Aldridge *et al.*, 1995).

En este estudio, se observó una tendencia general de disminución en la proporción O:N (por unidad de peso y por individuo) de *C. gigas* a niveles de temperatura superiores. Con valores alrededor de 60 en las semillas mantenidas en las temperaturas bajas hasta valores menores de 40 en semillas expuestas a temperaturas mayores de 26°C. Esta tendencia es similar a la observada en el mejillon *Dreissena polymorpha* (Aldridge *et al.*, 1995).

Tabla XII. Excreción de amonio de moluscos bivalvos, publicados por diversos autores y los resultados promedio de los dos experimentos obtenidos en este estudio.

Especie	Talla	$\mu\text{gNH}_4\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$	Temperatura	dieta	Autor(es)
<i>C. gigas</i>	1.0-11.5 mg y	15.24-25.33	20°C	Microalgas <i>ma</i>	Este estudio
	4.0-12.0 mm	4.22-56.69	23°C		
		4.02-73.82	26°C		
		122.5 -152.0	29°C		
		13.41-22.03	32°C		
	1 g		17°C		Ropert y Goulletquer, 2000
	9 g	8-9	8-15°C	Medio natural <i>nat. y ma</i>	Sphigel <i>et al.</i> , 1992
		16-17	30°C		
<i>P. maxima</i>		72.8	28 °C	<i>Isochrysis</i> sp.	Yukihira <i>et al.</i> , 1998
<i>P. margaritifera</i>		81.4			
<i>P. maxima</i>	100 mm	55.0	23°C	<i>Isochrysis</i> sp.	Yukihira <i>et al.</i> , 2000
		65.0	26°C		
		75.0	29°C		
		110.0	32°C		
		55.0	23°C		
<i>P. margaritifera</i>		60.0	26°C	<i>Isochrysis</i> sp.	Yukihira <i>et al.</i> , 2000
		65.0	29°C		
		70.0	32°C		
		0.17-0.23	15-30°C		
<i>Argopecten irradian</i> <i>concentricus</i>	3.5 a 5 mm				Lu <i>et al.</i> , 1999
<i>M. gallopro-vincialis</i> <i>Dreissena polymorpha</i>	Individuo	0.12-0.42			Navarro <i>et al.</i> , 1991 Aldridge <i>et al.</i> , 1995
	1g	0.89-0.99			
		0.039	20°C		
		0.045	24°C		
		0.135	28°C		
		0.191	32°C		

La tendencia anterior es contraria a la observada por algunos autores, donde la proporción O:N de los ostiones aumenta en relación directa con el incremento en la temperatura. Sphigel *et al.* (1992), encontraron que la proporción O:N calculada en ostiones se incrementó de 11.3 (8-15 °C) a 17.7 (30 °C). Walne y Mann (1975) encontraron un incremento de la proporción O:N en *C. gigas*, con incrementos en la temperatura, de 8° y 30°C. Sin embargo, estos autores solo ensayaron valores extremos de temperatura, lo que puede explicar la diferencia en los resultados.

Los valores de la proporción O:N de las semillas de ostión expuestas a 20 y 23°C, en el experimento 1, pueden indicar que el principal sustrato catabolizado fueron los carbohidratos y los lípidos. Mientras que las semillas expuestas a 26°C, tanto en el experimento 1 como en el experimento 2, ya empezaban a catabolizar las proteínas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Aldridge *et al.* (1995), donde la proporción O:N del mejillon *D. polymorpha* fue mayor de 60 a 20-24°C y menor de 40 a 28-32°C. Otros autores reportan resultados similares en *Modiolus modiolus*, *M. edulis*, *O. edulis*, *Pinctata maxima* y *P. margaritifera* (Navarro y Thompson, 1996; Widdows, 1978a; Beiras *et al.*, 1995; Yukihiro *et al.*, 2000).

El decremento en la tasa O:N de las semillas de ostión a temperaturas elevadas muestra que las semillas se encontraban en un estado de estrés por efecto de la temperatura, debido a que empezaron o estaban utilizando proteínas como sustrato para el catabolismo, situación similar a la observada en el *Mytilus galloprovincialis* (Navarro *et al.*, 1991), por lo tanto, se puede aseverar que las condiciones óptimas para el cultivo de las semillas de ostión se presentan a niveles de temperatura alrededor de 23 °C.

En el experimento 2, la proporción O:N de las semillas se incrementó a los 32 °C con

ambas dietas, algunos autores mencionan que este incremento de la proporción O:N se da cuando los ostiones se exponen a temperaturas alrededor de los 30°C (Mann, 1979; Sphigel *et al.*, 1992). Este aumento de la proporción O:N en las semillas de ostión es la respuesta que tienen los ostiones al estrés térmico al cerrar sus valvas. Algunos autores mencionan que a 30°C, el ostión del Pacífico utiliza los carbohidratos para satisfacer sus demandas energéticas, lo que indica que los ostiones están metabólicamente estresados a altas temperaturas (Mann 1979, Sphigel *et al.* 1992).

En relación con las dietas, la proporción O:N (por unidad de peso y por individuo) de las semillas que se alimentaron con las mezclas de microalgas (experimento 1) son muy similares, debido a que las tres dietas tienen una alta calidad nutricional, mientras que en el experimento 2, la mayor proporción O:N de las semillas alimentadas con la dieta Dt, esta relacionada con las deficiencias nutricionales que de esta microalga.

VI. CONCLUSIONES

- La ración de 150,000 cél ml⁻¹ proporcionada a las semillas de ostión *C. gigas* fue suficiente para obtener un buen crecimiento.
- El efecto combinado de la temperatura y la dieta afectan el crecimiento y supervivencia de semillas de ostión *C. gigas*, en especial, alrededor de 24°C.
- Las semillas de ostión *C. gigas* cultivadas a 32°C se ven afectadas fuertemente en su crecimiento y supervivencia, independientemente de la dieta suministrada
- La dieta es el factor principal que afecta el crecimiento de las semillas de ostión *C. gigas* a temperaturas inferiores de 32°C

- La composición bioquímica de las semillas de ostión *C. gigas* es afectada principalmente por cambios en la temperatura. En general, los porcentajes de proteínas y carbohidratos de las semillas son bajos, mientras que los porcentajes de lípidos son altos en los niveles de temperatura superiores.
- El contenido de ácidos grasos saturados de las semillas de ostión *C. gigas* se incrementan cuando se eleva la temperatura, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados disminuyen.
- El ácido graso 22:6n3, en las semillas de ostión *C. gigas* tuvo mayor presencia (%) que el ácido graso 20:5 en las temperaturas elevadas.
- El consumo de oxígeno de las semillas de ostión *C. gigas* es mayor en niveles de temperatura superiores, a partir de 26°C.
- La excreción de amonio de las semillas de ostión *C. gigas* es mayor en las temperaturas más altas, después de 23°C.
- La proporción O:N en las semillas de ostión *C. gigas* es menor en las temperaturas más altas.

- Las semillas de ostión *C. gigas* se estresan cuando la temperatura es superior a los 26°C. Los valores bajos de la proporción O:N calculados en esta temperatura sugieren que las proteínas fueron el sustrato metabólico principal.

LITERATURA CITADA

- Ackman, R. G. 1983. Fatty acid metabolism of bivalves. 358-375. En: Pruder; C.J. Langdon y D.E. Conklin (eds.). Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition. Spec. Publ., Vol. 2, G.D. Louisiana State Univ.
- Aldridge, D.W., B.S. Payne y A.C. Miller. 1995. Oxygen consumption, nitrogenous excretion, and filtration rates of *Dreissena polymorpha* at acclimation temperatures between 20 and 32 °C. Can. J. Fish. Aquatic. Sci 52: 1761-1767
- Almeida, M. J., J. Machado y J. Coimbra. 1999. Growth and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) and *Ostrea edulis* (Linné) in two estuaries from the North of Portugal. J. Shellfish. Res. 18: 139-146.
- Araki, S., T. Sakurai, T. Ohusa, M. Kayama y K. Niizawa. 1990. Content of arachidonic and eicosapentaenoic acids in polar lipids from *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta). Hidrobiología 204/205:513-519
- Barillé, L., J. Prou, M. Heral y D. Razet. 1997. Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 212:149-172
- Bayne, B.L. 1973. Physiological changes in *Mytilus edulis* L. induced by temperature and nutritive stress. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 53: 39-58.
- Bayne, B.L. 1973. Aspects of the metabolism of *Mytilus edulis* during starvation. Netherlands J. of Sea Res. 7: 399-410.
- Bayne, B.L. 1976. The biology of mussel larvae. 81-120. En: Bayne B.L. (ed.) Marine Mussels: Their ecology and physiology. Cambridge University Press, London.
- Bayne, B.L., R. J. Thompson y J. Widdows. 1976. Physiology. 121-206. En: B. L. Bayne (ed.). Marine mussels. Their ecology and physiology. Cambridge University Press, Cambridge, MS, USA
- Bayne, B.L. y R.C. Newell. 1983. Physiological energetic of marine molluscs. 407-515 En: K.M. Wilber, A.S. Saleuddin (eds.). The Mollusca, Vol. 4, Academic Press, New York.
- Bayne, B.L. 2002. A physiological comparison between Pacific oysters *Crassostrea gigas* and Sydney Rock oysters *Saccostrea glomerata*: food, feeding and growth in a shared estuarine habitat. Mar. Ecol. Prog. Ser. 232: 163-178.
- Beiras, R., A. Pérez-Camacho y M. Albentosa. 1994. Comparison of the scope for growth with the growth performance of *Ostrea edulis* seed reared at different food concentrations in an open-flow system. Marine Biology 119: 227-233.

- Beiras, R., A. Pérez-Camacho y M. Albentosa .1995. Short-term and long-term alterations in the energy budget of young oyster *Ostrea edulis* L. in response to temperature change. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 186: 221-236
- Beninger, P. G. y A. Lucas. 1984. Seasonal variation in condition, reproductive activity and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussates* L. (Jeffrey) and *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 79: 19-37.
- Berntsson, K.M., P.R. Jonsson, S.A. Wangberg y A.S. Carlsson. 1997. Effects of broodstock diets on fatty acid composition survival and growth rates in larvae of the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 154: 139-153.
- Berthelin, C., K. Kellner y M. Mathieu. 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp. Biochem. Physiol Part B* 125: 359-369
- Bhosle, N. B., L.V. Evans y G.J. Edyvean. 1993. Carbohydrate production by *Amphora coffeaeformis*, a marine fouling diatom. *Biofouling* 7: 81-91.
- Bigogno, C., I. Khozin-Goldberg, S. Boussiba, A. Vonshak y Z. Cohen. 2002. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry* 60: 497-503
- Blight, E.G. y W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Bougrier, S., P. Geairon, J. M. Deslous-Paoli, C. Bacher y G. Jonquieres. 1995. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 134: 143-154.
- Brown, M.R., S.W. Jeffrey y C.D. Garland. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture, a literature review. CSIRO. Marine Lab. Rep. 205 pp.
- Brown, M.R.1991. The aminoacid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 145: 79-99
- Brown, M. R., M. A. McCausland y K. Kowalski. 1998. The nutritional value of four Australian microalgae strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture* 165: 281-293.
- Caers, M., P.Coutteau, P. Lombeida y P. Sorgueloos. 1998. The effect of lipid supplementation on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. *Aquaculture* 162:287-299.

- Caers, M., P.Coutteau, K. Cure, V. Morales, G. Gajardo y P. Sorgeloos. 1999a. The Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819): I. Fatty acid composition and lipid content of six organs. *Comp. Biochem. Physiol.* 123B:89-96.
- Caers, M., P.Coutteau, K. Cure, V. Morales, G. Gajardo y P. Sorgeloos. 1999b. The Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819): II. Manipulation of the fatty acid composition and lipid content of the eggs via lipid supplementation of the broodstock diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 123B: 97-103
- Caers, M., P.Coutteau y P. Sorgeloos. 1999c. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. *Aquaculture* 170: 307-322
- Caers, M., P.Coutteau y P. Sorgeloos. 2000. Incorporation of different fatty acids, supplied as emulsions or liposomes, in the polar and neutral lipids of *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture* 186:157-171.
- Caers, M., S.D. Utting, P.Coutteau, P.F. Millican y P. Sorgeloos. 2002. Impact of the supplementation of a docosahexaenoic acid-rich emulsion on the reproductive output of oyster broodstock, *Crassostrea gigas*. *Marine Biology* 140: 1157-1166
- Carvalho, P.S.M. y V.N. Phan. 1997. Oxygen consumption and ammonia excretion of *Xiphopenaeus kroyeri* Heller (Penaeidae) in relation to mass, temperature and experimental procedures. Shrimp oxygen uptake and ammonia excretion. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 209: 143-156.
- Cerón-Ortiz, A.N. 2000. Evaluación de tres mezclas bialgales sobre el crecimiento de la almeja mano de león *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus*. Tesis de Maestría en Ciencias. C.I.C.E.S.E. 99 pp.
- Cerón-Ortiz, A.N. 2006. Efecto interactivo de la temperatura y la calidad nutrimental de microalgas sobre algunas variables fisiológicas en semillas de mano de león *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus*. Tesis de Doctorado en Ciencias. C.I.C.E.S.E. Departamento de Acuicultura. 97 pp.
- Chavez-Villalba, J., J. Pommier, J. Andriamiseza, S. Pouvreau, J Barret, J-C. Cochard y M. Le Penec. 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas* : origin and temperature effect. *Aquaculture* 214: 115-130.
- Chen, J.C. y T.T. Kou. 1996. Effects of temperature on oxygen consumption and nitrogenous excretion of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 145: 295-303
- Cheney, D.P., R. Elston y B. MacDonnald. 1998. Summer mortality in pacific oyster: observations on the influence of water quality and culture methods. Abstracts ICSR. Hilton Head Island. South Carolina, November 18-21, 1998. *J. Shellfish. Res.* 17(4): 1295.

- Cheney, D. P., B. F. MacDonald y R. A. Elston. 2000. Summer mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial Findings on Multiple Environmental Stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *J. Shellfish. Res.* 19: 353-359.
- Child, A. R. e I. Laing. 1998. Comparative low temperature tolerance of small juvenile European, *Ostrea edulis* L., and Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquaculture Research* 29: 103-113.
- Chu, F. E. y J. Greaves. 1991. Metabolism of palmitic, linoleic and linolenic acids in adult oysters, *Crassostrea virginica*. *Marine Biology* 110: 229-236
- Coutteau P., J.D. Castell; R.G. Ackman, y P. Sorgeloos. 1996. The use of lipid emulsions as carriers for essential fatty acids in bivalves: a test case with juvenile *Placopecten magellanicus*. *J. Shellfish. Res.* 15: 259-264.
- Craigh, E.A. 1993. Chaperones: helpers along the pathways to protein folding. *Science* 260: 1902-3.
- Crear, B.J. y G.N.R. Forteach. 2002. Feeding has the largest effect on the ammonia excretion rate of the southern rock lobster, *Jasus edwardsii*, and the western rock lobster, *Panulirus cygnus*. *Aquacultural Engineering* 26: 239-250
- Dall, W. y D.M. Smith. 1986. Oxygen consumption and ammonia-N excretion in fed and starved tiger prawns, *Penaeus esculentus* Haswell. *Aquaculture* 55: 23-33
- Delaunay, F., Y. Marty, J. Moal y J.F. Samain. 1992. Growth and lipid class composition of *Pecten maximum* (L.) larvae grown under hatchery conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163:209-219.
- Devakie, M.N. y A.B. Ali. 2000. Salinity-temperature and nutritional effects on the setting rate of larvae on the tropical oyster, *Crassostrea iredalei* (Faustino). *Aquaculture* 184:105-114.
- Díaz-Herrera, F., C.E. Pérez, F.J. Luna, G.A. Tapia y V.C. Rosas. 1992. Consumo de oxígeno, excreción de amonio y osmorregulación de juveniles de *Callinectes similis* Williams (Crustacea: Portunidae) expuestos a salinidades fluctuantes. *Ciencias Marinas.* 18(3): 93-104.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Ellis, R.J. y S.M. Vander Vies. 1991. Molecular chaperones. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 321-347.

- Elston, R.A. 1993. Infectious diseases of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Annu. Rev. Fish. Dis. 259-276
- Enright, C. T., G. F. Newkirk, J. S. Craigie y J. D. Castel. 1986. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilis* Schutt of varied chemical composition. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 96: 15-26.
- Epifanio C. 1979. Growth in bivalve molluscs: nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L). Aquaculture 18: 1-12.
- FAO-FIGIS. 2005. Fisheries Global Information System. <http://www.fao.org/figis>
- FAO-SOFIA. 2004. The state of World fisheries and aquaculture. Editorial Group, FAO Inf. Div. FAO, Rome (Italy).
- Fidalgo, J.P., A. Cid, I. López-Muñoz, J. Abalde y C. Herrero. 1994. Growth and biochemical profile of juvenile mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) fed on different algal diets. J. Shellfish. Res. 13(1): 67-75.
- Flores-Vergara, C., B. Cordero-Esquivel, A.N. Cerón-Ortiz y B.O. Arredondo-Vega. 2004. Combined effects of temperature and diet on growth and biochemical composition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) spat. Aquaculture Research. 35: 1131-1140.
- Fraser, J.A. 1989. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve and crustacean larvae. Can. J. Fish. Aquatic. Sci. 46: 1868-1873.
- Freites, L., M.J. Fernández-Reiriz y U. Ubarta. 2002. Lipid classes of mussel seeds *Mytilus galloprovincialis* of subtidal and rocky shore origin. Aquaculture 207: 97-111.
- Friedman, C.S., G.N. Cherr, J.S. Clegg, A.H. Hamdoun, J.L. Jacobsen, S.A. Jackson y K.R. Uhlinger. 1998. Investigations of the stress response, summer mortality and disease resistance of oysters, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*. Abstracts ICSR. Hilton Head Island. South Carolina, November 18-21. J. Shellfish. Res. 17(4): 1300.
- Frolov, A.V. y S.L. Pankov. 1992. The reproduction strategy of oyster *Ostrea edulis* L. from the biochemical point of view. Comp. Biochem. Physiol. 103B: 161-182
- Garduño-Franco, J.C. 2001. Situación Actual de la Acuicultura en Baja California. Subdelegación de Pesca, Departamento de Acuicultura. SAGARPA, 2001.
- Gerdes, D. 1983. The pacific oyster *Crassostrea gigas*. Part II. Oxygen consumption of larvae and adults. Aquaculture 31: 221-231
- Gouletquer, P., M. Wolowicz, A. Latala, P. Geairon, A. Huvet y P. Boundry. 1999. Comparative analysis of oxygen consumption rates between cupped oyster spat of

- Crassostrea gigas* French, Japanese, Spanish and Taiwanese origins. *Aquat. Liv. Resour.* 12 (4): 271-277.
- Gribben, P.E., R.G. Creese y S.H. Hooker. 2002. Growth rates of the venus clam *Ruditapes largillierti* grown under experimental culture conditions in New Zealand. *Aquaculture* 213: 187-197
- Guillard, R. L. y J. H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.
- Hadley, N.H. y J.J. Manzi. 1984. Growth of seed clams, *Mercenaria mercenaria*, at various densities in a commercial scale nursery system. *Aquaculture* 36: 369-378
- Hall, J. M., C. C. Parrish y R. J. Thompson. 2002. Eicosapentaenoic acid regulates scallop (*Placopecten magellanicus*) membrane fluidity in response to cold. *Biological Bulletin* 202: 201-203.
- Hartwell, S.I. D.A. Wright, R. Takacs y R. Hocutt. 1991. Relative respiration and feeding rates of oyster and brackish water clam in variously contaminated waters. *Mar. Pollut. Bull.* 22: 191-197
- Harvey, M. y B. Vincent. 1991. Spatial variability of length-specific production in shell, somatic tissue and sexual products of *Macoma baltica* in the lower St. Lawrence estuary. I. Small and mesoscale variability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 75: 55-66
- Hazel, J.R. 1988. Homeoviscous adaptation in animal cell membrane. 149-188. En: R. C. Aloia, C. C. Curtain y L. M. Gordon (eds.). *Advances in membrane fluidity-physiological regulation of membrane fluidity* 6. New York.
- Heasman, M. P., W.A. O'Connor, A.W. Frazer, Y. Languet y S. J. O'Connor. 2002. Alternative means or nursery culture for commercial scallop (*Pecten fumatus* Reeve) spat. *Aquaculture* 213: 323-338.
- Honkoop, P.J.C. y B.L. Bayne. 2002. Stocking density and growth of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) in Port Stephens, Australia. *Aquaculture* 213: 171-186
- Hyun, K.-H., I.-C. Pang, J.M. Klinck, K.-S. Choi, J.-B. Lee, E.N. Powell, E.E. Hofmann y E.A. Bochenek. 2001. The effect of food composition on Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) growth in Korea: a modeling study. *Aquaculture* 199: 41-62
- Incze, L. S., R.A. Lutz y L. Watling. 1980. Relationships between effects of environmental temperature and seston on growth and mortality of *Mytilus edulis* in a temperature northern estuary. *Marine Biology* 57:147-156.

- Kang, C.K., M.S. Park, P.Y. Lee, W.J. Choi y W.C. Lee. 2000. Seasonal variation in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in suspended culture in two coastal bays of Korea. *J. Shellfish. Res.* 19(2): 771-778.
- Kinne, O. 1971. Temperature. *Animals: Invertebrates.* 407-514. En O. Kinne (ed.). *Environmental factors, Marine ecology.* vol.1 part 1. Wiley-Interscience., London.
- Klumpp, D.W. y C. L. Griffiths. 1994. Contribution of phototrophic and heterotrophic nutrition to the metabolic and growth requirements of four species of giant clam (Tridacnidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 115: 103-115.
- Knauer, J. y P. C. Southgate. 1997a. Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a spray-dried freshwater microalga (*Spongiococcum excentricum*) and microencapsulated lipids. *Aquaculture* 154: 293-303.
- Knauer, J. y P.C. Southgate. 1997b. Growth and fatty acid composition of pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a microalgae and microcapsules containing varying amounts of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid. *J. Shellfish. Res.* 16(2): 447-453.
- Kobayashi, M., E.E. Hofmann, E.N. Powell, J.M. Klinck y K. Kusaka. 1997. A population dynamics model for the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 149: 285-321
- Kreeger, D.A. y C.J.Langdon. 1993. Effects of dietary protein content on growth of juvenile mussels *Mytilus trossulus* (Gould, 1850). *Biological Bulletin* 185:123-139
- Laing, I. Y N. H. Earl. 1998. The lipid content, spatfall and subsequent growth of early and late settling hatchery-reared Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, larvae. *Aquaculture Research* 29: 19-35.
- Laing, I. 2000. Effect of temperature and ration on growth and condition of king scallop (*Pecten maximus*) spat. *Aquaculture* 183: 325-334.
- Langdon C.J. y M.J. Waldock. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 61:431-448.
- Le Gall, J.L. y O. Raillard. 1988. Influence of temperature on the physiology of the oyster *Crassostrea gigas*. *Oceanis* 14: 603-608
- Leonardos, N. y I.A.N. Lucas. 2000. The use of larval fatty acids as an index of growth in *Mytilus edulis* L. Larvae. *Aquaculture* 184: 155-166.
- Leonardos, N. y I.A.N. Lucas. 2000. The nutritional value of algae grown under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. Larvae. *Aquaculture* 182: 301-315.

- Lindquist, S. y E.A. Craig. 1988. The heat shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* 22: 631-677.
- Liu C-P y L.P. Lin. 2001. Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42: 207-214
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, F. A. Lewis y R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lu, Y.T., N. J. Blake y J.J. Torres. 1999. Oxygen consumption and ammonia excretion of larvae and juveniles of the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (SAY). *J. Shellfish. Res.* 18 (2): 419-423.
- Lu, Y.T., N. J. Blake y J.J. Torres. 1999. Biochemical utilization during embryogenesis and metamorphosis in the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (SAY). *J. Shellfish. Res.* 18(2):425-429
- Lubet, P., G. Brichon, J.Y. Besnard y G. Zwingelstein. 1986. Sexual differences in the composition and metabolism of lipids in the mantle of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk (Mollusca:Bivalvia). *Comp. Biochem. Physiol.* 84B: 279-285
- Lucas, A. y P.G. Beninger, 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 44:187-200.
- Luna-Figueroa, J. 2002. Alimento vivo. Importancia y valor nutritivo. *Ciencia y Desarrollo* 166: 71-77
- Malouf, R.E. y W.P. Breeze, 1977. Seasonal changes in the effects of temperature and water flow rate on the growth of juvenile pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Tunberg). *Aquaculture* 12: 1-13.
- Mann, R. 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 59: 95-110.
- Martínez, G., C. Aguilera y L. Mettifogo. 2000. Interactive effects on diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture* 183: 149-159.
- Marty, Y., F. Delaunay, J. Moal y J.F. Samain. 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163: 221-234.
- Mazón S.J.M. 1996. Cultivo de Ostión Japonés *Crassostrea gigas*. 625-650. En: Casas Valdez, M. Y G. Ponce Díaz (eds.) Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur.

- McCausland, M.A., M. R. Brown, S.M. Barrett, J.A. Diemar y M. P. Heasman. 1999. Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 174: 323-342
- Milke, M.L., V.M. Bricelj y C. C. Parrish. Growth of postlarval sea scallops, *Placopecten magellanicus*, on microalgal diets, with emphasis on the nutritional role of lipids and fatty acids. *Aquaculture* 234: 293-317
- Mills, D. 2000. Combined Effects of temperature and algal concentration on survival, growth and feeding physiology of *Pinctada maxima* (Jameson) spat. *J. Shellfish. Research* 19 (1): 159-166.
- Napolitano, G. E., W. M. N. Ratnayake y R. G. Ackman. 1988. Fatty acid components of larval *Ostrea edulis* (L.): Importance of triacylglycerols as a fatty acid reserve. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B(4): 875-883.
- Napolitano G.E. y R.G. Ackman. 1992. Fatty acid dynamics in sea scallops *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791) from Georges Bank, Nova Scotia. *J. Shellfish. Res.* 12 (2): 267-277
- Napolitano, G. E., B.A. MacDonald, R.J. Thompson y R. G. Ackman. 1992. Lipid composition of eggs and adductor muscle in giant scallops (*Placopecten magellanicus*) from different habitats. *Marine Biology* 113: 71-76
- Navarro, J.M. y J.E. Winter. 1982. Ingestion rate, assimilation efficiency and energy balance in *Mytilus chilensis* in relation to body size and different algal concentrations. *Marine Biology* 67: 255-266.
- Navarro, E., J.I.P. Iglesias, A. Pérez-Camacho, U. Labarta y R. Beiras. 1991. The physiological energetic of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) from different cultivation rafts in the Ría de Arosa (Galicia, N.W. Spain). *Aquaculture* 94: 197-212.
- Navarro, J.M. y R.J. Thompson. 1996. Physiological energetic of the horse mussel *Modiolus modiolus* in a cold ocean environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 138: 135-148
- Newell R.C. y G.M. Branch, 1980. The influence of temperature on the maintenance of energy balance in marine invertebrates. *Advances in Marine Biology* 17:329-396.
- O'Connor, W.A., J.A. Nell y J.A. Diemer. 1992. The evaluation of twelve algal species as food for juvenile Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale y Roughley) larvae. *Aquaculture* 108: 277-283
- Okuyama H., N. Morita, K. Kogame. 1992. Occurrence of octadecapentaenoic acid in lipids of a cold stenothermic alga, Prymnesiophyte strain-B. *J. Phycol.* 28: 465-472.
- Palacios-Fest, M.R., J.M. Mazón-Suástegui, S. García-Sandoval, M. Diego-Peralta, J.C. Estrada-Ortega, A.A. Altamirano-Saucedo y J. Pérez-Flores. 1988. Manual técnico

para la operación de centros acuícolas productores de ostión. SEPESCA. Dir. Gral. Comunic. Social. Méx. 324 pp.

Pande, S. V., K. R. Parvin y T. A. Venkitasubramanian. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry*. 6: 415-423.

Parsell, D.A. y S. Lindquist. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann. Rev. Genet.* 27:437-496.

Phatarpekar, P.V., R.A. Sreepada, C. Pednekar y C.T. Achuthankutty. 2000. A comparative study on growth performance and biochemical composition of mixed culture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* with monocultures. *Aquaculture* 181: 141-155

Pazos, J.A., G. Román, C. P. Acosta, J.L. Sánchez y M. Abad. 1997. Lipid classes and fatty acid composition in the female gonad of *Pecten maximus* in relation to reproductive cycle and environmental variables. *Comp. Biochem. Physiol* 117B: 393-402.

Perdue, J., J.H. Beattie y K.K. Chew. 1981. Some relationships between gametogenetic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the Washington state. *J. Shellfish. Res.* 1: 9-16

Ren, J. S. y A.H. Ross. 2001. A dynamic energy budget model of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Ecological Modelling* 142: 105-120

Renault, T., R.M. Le Deuff, N. Cochenec y P. Maffart. 1994. Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France comparative study. *Rev. Med. Vet.* 145 (10): 735-742

Robertson, J. C. y J. R. Hazel. 1996. Membrane Constraints to Physiological Function at different temperatures: does cholesterol stabilize membranes at elevated temperatures?. 24-49. En: C. M. Wood y D. G. Mc Donald (eds.) Society for experimental biology seminar series 61: Global Warming. Implications for Freshwater and Marine Fish. Cambridge University Press, Cambridge, MS, USA.

Rodhouse, P.G. 1978. Energy transformations by the oyster *Ostrea edulis* L. In a temperature estuary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*34:1-22

Rodier, J. 1978. Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales, agua de mar. Dhesa, Barcelona.130-140

Ropert, M. y Gouilletquer, P. 2000. Comparative physiological energetics of two suspension feeders: polychaete annelid *Lanice conchilega* (Pallas 1766) and Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg 1795). *Aquaculture* 181: 171-189

- Saavedra, C. 1997. Low effective sizes in hatchery populations of the European oyster (*Ostrea edulis*): implications for the management of genetic resources. *J. Shellfish. Res.* 16: 441-446.
- Sara, G. y A. Mazola. 1997. Effects of trophic and environmental conditions on the growth of *Crassostrea gigas* in culture. *Aquaculture* 153: 81-91
- Sato, N. y N. Murata. 1988. Membrane lipids. *Methods in Enzymology* 167: 251-259.
- Shpigel, M. y R. A. Blaylock. 1991. The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, as a biological filter for a marine fish aquaculture pond. *Aquaculture* 92: 187-197.
- Shpigel, M., B. J. Barber y R. Mann. 1992. Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161: 15-25.
- Shumway, T.M. y R.K. Koehn. 1982. Oxygen consumption in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 9: 59-68
- SIEAP. 2004. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Información obtenida de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca.
- Soletchnik, P., O. Le Moine, P. Gouletquer, P. Geairon, D. Razet, N. Faury, D. Fouché y S. Robert. 2001. Optimization of the traditional Pacific cupped oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) culture on the French Atlantic coastline: autumnal fattening in semi-closed ponds. *Aquaculture* 199: 73-91
- Somero, G. N. y G. E. Hoffman. 1996. Temperature thresholds for protein adaptation: when does temperature start to hurt?. 1-24. En: C. M. Wood y D.G. Mc Donald (eds.) *Society for experimental biology seminar series 61: Global Warming. Implications for Freshwater and Marine Fish.* Cambridge University Press, Cambridge, MS, USA.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343. En: Stein, J.R. (ed.): *Handbook of physiological methods. Culture methods and growth measurement.* Cambridge University Press, Cambridge
- Soudant, P., Y. Marty, J. Moal, R. Roberts, C. Quéré, J.R. Le Coz y J.F. Samain. 1996. Effect of food fatty acids and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture* 143: 361-378.
- Stanley-Samuelson, D.W. y R.W. Howard. 1998. The Biology of Prostaglandins and Related Eicosanoids in Invertebrates: Cellular, Organismal and Ecological Actions. *American Zoologist* 38: 369-381
- Swift, M.L., D. White y M.D. Ghassemieh. 1980. Distribution of neutral lipids in the tissues of oyster *Crassostrea virginica*. *Lipids* 15:129-132.

- Thompson, R.J. y R.I.E. Newell. 1985. Physiological responses to temperature in two latitudinal separated populations of the mussel, *Mytilus edulis*. Pág.:481-495. Proceedings of the 19th European Marine Biology Symposium, University Press Cambridge.
- Thompson P.A. y P.J. Harrison.1992. Effect of monospecific algal diets of varying biochemical composition on the growth and survival of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. Marine Biology 113:645-654.
- Thompson, R.J., R.I.E. Newell., V. Kennedy y R. Mann. 1996. Reproductive processes and early development. 335-370 En: V. Kennedy, R. Newell y A. Eble (eds.). The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Books, Maryland
- Tonon, T. D. Harvey, T.R. Larson y I.A. Graham. 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. Phytochemistry 61: 15-24
- Van-Erkom S. C. y C. L. Griffiths. 1992. Physiological energetics of four South African mussel species in relation to body size, ration and temperature. Comp. Biochem. Physiol. 101 A (4): 779-789
- Vásquez-Yeomans, R. y J. Cáceres-Martínez. 2004. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* adults in Mexico. J. Shellfish. Res.23(2): 417-419.
- Vásquez-Yeomans, R., J. Cáceres-Martínez y A. M. García Ortega. 2004. Bacterias aisladas de las branquias del ostión japonés *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía Falsa, Baja California, México. Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Zoología 75 (2): 237-243
- Vásquez-Yeomans, R. 2006. Agentes patógenos asociados con las mortalidades masivas en el ostión japonés, *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía Falsa, B.C., México. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).
- Vincent, B., D. Joly y M. Harvey. 1994. Spatial variation in growth of the bivalve *Macoma baltica* (L.) on a tidal flat: Effects of environmental factors and intraspecific competition. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 181: 223-238
- Waldock, M. J. y D. L. Holland. 1984. Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: Polyunsaturated fatty acids. Lipids 19(5): 332-336.
- Walne, P.R. y R. Mann. 1975. Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. 587-607. En: H. Barnes (ed.): Ninth European Marine Biology Symposium, Aberdeen University Press, Aberdeen.

- Webb, K.L. y F.E. Chu, 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. 272-291. En: Pruder; C.J. Langdon y D.E. Conklin (eds.). Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition, Spec. Publ., Vol. 2, G.D. Louisiana State Univ.
- Whyte, J. N. C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture. *Aquaculture* 60: 231-241.
- Whyte, J.N.C. 1988. Fatty acid profiles from direct methanolysis of lipids in tissue of cultured species. *Aquaculture* 75: 193-203.
- Whyte, J.N.C., J.R. Englar y B.L. Carswell. 1990. Biochemical composition and energy reserves in *Crassostrea gigas* exposed to different levels of nutrition. *Aquaculture* 90: 157-172.
- Widdows, J. 1978a. Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*58: 109-124.
- Widdows, J. 1978b. Physiological indices of stress in *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 58: 125-142.
- Widdows, J. 1985. Physiological Procedures. 161-178. En: B.L. Bayne, D.A. Brown, K. Burns, D.R. Dixon, A. Ivanovici, D.R. Livingstone, D.M. Lowe, A.R.D. Stebbing y J. Widdows (eds.). The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger, New York.
- Winter, J.E. 1978. A review on the knowledge of suspension-feeding in lamellibranchiate bivalves, with special reference to artificial aquaculture systems. *Aquaculture* 13: 1-33.
- Wright, P.A. 1995. Nitrogen Excretion: three end products, many physiological roles. Review. *J. Exp. Mar. Biol.* 198: 273-281
- Yukihira, H., D.W. Klumpp y J.S. Lucas. 1998. Effects of body size on suspension feeding and energy budgets of the Pearl oysters *Pinctada margaritifera* and *P. maxima*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 170: 119-130
- Yukihira, H., J.S. Lucas y D.W. Klumpp. 2000. Comparative effects of temperature on suspension feeding and energy budgets of the pearl oysters *Pinctada margaritifera* and *P. maxima*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* (195):179-188.
- Zar, J. H. 1984. Biostatistical Analysis. Second Edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

ANEXOS

Anexo 1

Cepas de microalgas utilizadas en las diferentes mezclas, proporcionadas como dietas para semillas de ostión *Crassostrea gigas*, en los dos experimentos.

Especie	Características	Procedencia	Aislamiento	Clones Sinónimos	Clave CICESE
<i>Isochrysis</i> sp.	Células subesféricas fusiformes, biflageladas (6-7 X 4-6 µm)	Cooperativa Bahía Falsa, San Quintín, BC, México.	K. Haines (1977) T-ISO Clonal	T-ISO	ISX1
<i>Pavlova lutheri</i> (Droop) green	Células discoidales biflageladas (6-7 X 5-6 X 3-4 µm)	National Marine Fisheries Service, La Jolla, CA, USA	M.Droop (1956) MONO Clonal	MONO	PALI
<i>Chaetoceros calcitrans</i> (Paulsen)	Células aisladas (3-7 µm)	Laboratorio Bigelow CCMP1315	O. Umebayashi (1960) Clonal	CCAL NEPCC590	CHC1
<i>Dunaliella tertiolecta</i> (Butcher)	Células biflageladas, alargadas (6-9 µm)	Laboratorio Bigelow CCMP1320	Butcher Clonal	DUN WHOI1 NEPCC1 CS175	DUT2

ANEXO 2

Tasa de Filtración de semillas de ostión cultivadas a tres temperaturas y alimentadas con tres dietas mezclas de 2microalgas, *Chaetoceros calcitrans-Isochrysis* sp. (CI), *C. calcitrans-Pavlova lutheri* (CP) e *Isochrysis* sp.-*Pavlova lutheri* (IP), con una ración de 150, 000 cel·ml⁻¹.

Temperatura	hora	Dietas		
		CI	CP	IP
20 °C	0	0	0	0
	1	7.00	9.04	10.32
	2	4.14	20.04	17.91
	3	24.92	13.59	3.93
	4	6.09	8.76	1.80
	5	4.95	2.67	11.25
	24	6.60	6.02	7.08
	23 °C	0	0	0
1		9.80	6.80	6.45
2		6.28	25.94	13.09
3		21.96	3.43	12.30
4		8.82	7.94	4.05
5		7.54	4.82	7.83
24		6.17	5.47	7.38
26 °C		0	0	0
	1	12.36	10.48	8.59
	2	14.21	20.28	0.65
	3	27.37	12.76	6.57
	4	0.51	16.66	5.70
	5	6.40	4.81	10.26
	24	4.75	4.85	6.54