

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en ciencias en ciencias de la vida
con orientación en biotecnología marina**

**Respuestas fisiológicas y bioenergéticas del pez payaso
Amphiprion ocellaris (Cuvier, 1830), bajo condiciones óptimas
de temperatura y salinidad.**

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

Presenta:

Erendira Rocio Latorre Pozos

Ensenada, Baja California, México
2017

Tesis defendida por

Eréndira Rocio Latorre Pozos

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ana Denisse Re Araujo
Directora de tesis

Miembros del comité

M.C. Manuel de Jesús Acosta Ruiz

M.C Luis Humberto Mendoza Garcilazo



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Director de Estudios de Posgrado

Eréndira Rocio Latorre Pozos © 2017

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis

Resumen de la tesis que presenta **Erendira Rocío Latorre Pozos** como requisito parcial para la obtención del grado de **Maestría** en Ciencias de la vida con orientación en Biotecnología Marina.

Respuestas fisiológicas y bioenergéticas del pez payaso *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830), bajo condiciones óptimas de temperatura y salinidad.

Resumen aprobado por:

Dra. Ana Denisse Re Araujo
Director de tesis

Amphiprion ocellaris (Cuvier, 1830) es un pez muy cotizado para el comercio mundial de especies ornamentales, los estudios sobre esta especie son de gran importancia, para optimizar sus condiciones de cultivo. Se estudiaron las respuestas fisiológicas y metabólicas en juveniles de pez payaso *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830). Se evaluó el efecto de siete diferentes salinidades: 40, 35, 30, 25, 20, 15 y 10 ups, sobre la tasa de consumo de oxígeno (TCO), tasa de excreción de amonio (TEA), relación atómica oxígeno: nitrógeno (O: N), la osmorregulación, y la capacidad osmorreguladora de juveniles de *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830), bajo condiciones de temperatura optima de 29 °C (Velasco *et al*, en proceso). Mostrando su punto isosmótico en 10 ups, que fue en donde mostro el valor mínimo de consumos de oxígeno ($594 \pm 24.857 \text{ mgO}_2 \text{ h}^{-1}\text{Kg}^{-1} \text{ p.h}$) y de TEA (71.318 ± 2.213). Mostrando que *Amphiprion ocellaris* es un fuerte osmorregulador. Con los valores obtenidos por Velasco, et al., (en proceso) de CTMax (90%) y CTMin (110%) se realizaron mediciones de TIMR (Temperature Induction Metabolic Rate) en dos salinidades experimentales (23°C y 29 °C) suministrados a los organismos 2 dietas formuladas con diferentes harinas de vegetales deshidratados D1 (Jamaica y Betabel), y D2 (Zanahoria y Cempasúchil) comparándolas con una dieta comercial de Otohime™, se midio TCO, TEA, relación O:N, TIRMSmáx-mín fueron calculadas para obtener la diferencia entre la Tasa metabólica máxima (MMR, Maximum metabolic rate) y la Tasa metabólica estándar (SMR, Standard metabolic rate) por medio del consumo de oxígeno (TCO). Las TIMRmax –min fueron calculadas para obtener el CAM (Campo de Actividad Metabólica) mostrando que en ambas temperaturas los organismos alimentados con la dieta OT mostraron el CAM mayor. El Incremento aparente de calor (IAC) de los organismos recién alimentados, presentaron los consumos más altos de oxígeno entre los 12-15 minutos en ambas temperaturas.

Palabras clave: Excreción de amonio, osmorregulación, temperatura preferida, capacidad osmorreguladora.

Abstract of the thesis presented **Erendira Rocio Latorre Pozos** as a partial requirement to obtain the **Master** of Science degree in life science with orientation in marine biotechnology

Physiological and bioenergetic responses of clownfish *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830), under optimum conditions of temperature and salinity

Abstract approved by:

Dra. Ana Denisse Re Araujo
Director de tesis

Amphiprion ocellaris (Cuvier, 1830) is a highly traded fish for the world trade in ornamental species, studies on this species are of great importance, to optimize their growing conditions. Physiological and metabolic responses were studied in clownfish juveniles *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830). The effect of seven different salinities: 40, 35, 30, 25, 20, 15 and 10 ups was evaluated on the rate of oxygen consumption (TCO), ammonium excretion rate (TEA), atomic ratio oxygen: nitrogen O: N), osmoregulation, and the osmoregulatory capacity of juveniles of *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830), under optimum temperature conditions of 29 ° C (Velasco et al, in process). His isosmotic point showed 10 ups, which was where he showed the minimum value of oxygen consumption ($594 \pm 24,857$ mgO₂ h⁻¹ kg⁻¹ p.h) and TEA ($71,318 \pm 2,213$). Showing that *Amphiprion ocellaris* is a strong osmoregulator. With the values obtained by Velasco, et al., (In process) of CTMax (90%) and CTMin (110%), TIMR (Temperature Induction Metabolic Rate) measurements were performed in two experimental salinities (23 ° C and 29 ° C) fed to the organisms 2 diets formulated with different D1 dehydrated vegetable flours (Jamaica and Betabel), and D2 (Carrot and Cempasúchil) compared to a commercial Otohime™ diet, TCO, TEA, O: N ratio, TIRMSmax -mines were calculated to obtain the difference between the maximum metabolic rate (MMR) and the standard metabolic rate (SMR) oxygen consumption (TCO). The TIMRmax-min were calculated to obtain the Scope of Metabolic Activity or Aerobic Scope. Showing that in both temperatures the organisms fed with the OT diet showed the greater CAM. The Apparent Heat Increase (IAC) of freshly fed organisms had the highest oxygen intakes between 12-15 minutes at both temperatures.

Keywords: Ammonium excretion, osmoregulation, preferred temperature, osmoregulatory capacity.

DEDICATORIA

Para las personas que siempre me apoyan y me ayudan a superar cada proyecto en mi vida: Para aquellos que nunca dejaron de creer en mí. A los cuales les debo todo lo que soy hasta ahora. Los que con su esfuerzo siempre me inspiraron a ser mejor persona.

Mis padres, mi pequeña Luna y mi compañero de vida Víctor.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B. C (CICESE) por brindarme la oportunidad de realizar este posgrado (34002).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me brindo durante el posgrado.

A la Doctora Denise Re Araujo por aceptar ser mi directora de tesis, ser mi guía en este nuevo camino que decidí emprender. Por todo su apoyo incondicional y confianza, porque nunca dejo de creer en mí y me apoyo hasta el último momento de esta nueva aventura. Gracias.

A los miembros de mi comité de tesis, M.C Luis Humberto Mendoza Garcilazo y el M.C. Manuel Acosta por su ayuda y paciencia en la elaboración de este trabajo.

A mis padres que siempre han sido mi pilar, por confiar ciegamente en mí, gracias por todo su amor, sus consejos y por no dejar nunca que mis sueños se apaguen, siempre han sido y serán siendo el apoyo más fuerte en cada día de mi vida. Los amos.

A mi hija Luna, que es mi razón de ser, mi mundo, mi todo. Gracias por apoyarme siempre, por entender mis tareas, exámenes, desvelos y falta de tiempo durante este reto. Gracias.

A mi compañero de vida, por ser mi cómplice en todos los nuevos proyectos, porque nunca me dejo desistir. Por secar mis lágrimas cuando pensé que ya no podía, y apoyarme a seguir en la lucha cada día para cumplir mí meta.

A mis hermanos, porque a pesar de estar lejos, siempre me apoyaron con palabras de aliento y cariño.

A mis amigos que forman parte de mi familia elegida Víctor García Machado y Sarahi Cancino Cano, por ser parte de cada aventura que me trajo hasta aquí.

A mi compañera Evnika Zarina Medina Romo por todo el apoyo incondicional, por sus palabras, su tiempo y su gran paciencia. Muchas gracias, por brindarme tu cariño y amistad.

A mi cuñada y amiga Gabriela Velasco Blanco, por ser un gran apoyo para la realización de este trabajo y para todo lo demás.

Al Ing. Ernesto Lerma y el Sr. Martín Hernández (El Pollo), por hacer mi vida en el laboratorio más llevadera, y por ayudarme siempre en mis experimentos.

A José Luis Bolívar Barrientos, Priscila Álvarez e Idaly Trejo Escamilla, por ser un gran apoyo en la realización de mis experimentos en el laboratorio. ¡Gracias!

A la Doctora Rufina Hernández Martínez y a la Doctora Clara Elizabeth Galindo Sánchez por ser un gran apoyo durante mi estancia en CICESE.

A Maximiliano López Frisbie por brindarme su apoyo y jalarme las orejas cuando lo requería.

Tabla de Contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
1. Introducción	1
2. Antecedentes	9
3. Justificación	11
4. Hipótesis	12
5. Objetivos	13
5.1. Objetivo general	13
5.1.1. Objetivos específico.....	13
6. Materiales y métodos	14
6.1. Osmorregulación.....	14
6.1.1 Obtención y mantenimiento de los organismos.....	14
6.1.2. Aclimatación de los organismos a las salinidades.....	15
6.1.3. Consumo de oxígeno y excreción de amonio.....	16
6.1.4. Relación atómica O:N.....	20
6.1.5. Presión osmótica.....	20
6.2 Campo de actividad metabólica.....	20
6.2.1. Obtención, mantenimiento y aclimatación de los organismos.....	20
6.2.2. Preparación de las dietas.....	21
6.2.3. Consumo de Oxígeno y excreción de amonio.....	23
6.2.4. TIMR (Temperature Induction Metabolic Rate).....	25
6.2.5. Campo aeróbico metabólico.....	27
6.2.6. Incremento de calor aparente.....	27
7. Análisis Estadístico	28
8. Resultados	29
8.1. Tasa de consumo de oxígeno (TCO).....	29

8.2. Excreción de amonio.....	31
8.3. Relación atómica O:N.....	33
8.4. Presión osmótica.....	34
8.5. Capacidad osmorreguladora.....	35
8.6. Campo de actividad metabólico.....	36
8.6.1. Consumo de oxígeno.....	36
8.6.2. Excreción de amonio.....	37
8.6.3. Relación O: N.....	38
8.6.4. TIMR.....	39
8.6.5. CAM.....	40
8.6.6. Incremento Aparente de Calor (IAC).....	41
8.6.7. Crecimiento.....	44
9. Discusión	45
10. Conclusiones	50
Literatura citada	51
Anexos	56

Lista de figuras

Figura		Página
1	Especies mayormente comercializadas a nivel mundial según el GMAD (The Global Marine Aquarium Database) para los años 1997 a 2002	2
2	<i>Amphiprion ocellaris</i> (Cuvier, 1830) (Foto tomada por Marcel Waldis, Underwater Photography).	3
3	Distribución del pez payaso <i>Amphiprion ocellaris</i> (Cuvier, 1830).	4
4	Tanques de 200 l, en donde fueron mantenidos los organismos de <i>Amphiprion ocellaris</i> para disminuir el estrés por su traslado.	14
5	Sistema utilizado para aclimatar y mantener a los organismos en las salinidades experimentales.	15
6	Esquema que muestra las salinidades experimentales a las cuales serán sometidos los organismos	16
7	<i>Amphiprion ocellaris</i> en la cámara respirométrica en donde se realizaron las evaluaciones de la TCO	17
8	Sistema respirométrico semi-abierto utilizado para la medición del oxígeno en los organismos sometidos a las salinidades experimentales	18
9	Micro placa utilizada en la medición del amonio	19
10	Ingredientes utilizados para preparar las harinas adicionadas a las dietas experimentales de <i>Amphiprion ocellaris</i> .	21
11	Secado de los ingredientes necesarios para la elaboración de las dietas experimentales, las cuales se secaron en una estufa de convección, en charolas forradas de aluminio para evitar que los ingredientes se pegaran.	22
12	Sistema cerrado utilizado en el experimento de bioenergética, consta de 2 niveles, cada uno cuenta con un filtro biológico y aireación constante. El sistema superior permaneció a una temperatura constante de 23 °C ± 1 y el sistema inferior a 29 °C ± 1	24
13	Consumo de oxígeno de juveniles de pez payaso <i>Amphiprion ocellaris</i> aclimatados a diferentes salinidades: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, y 45 ups. La zona delimitada por puntos representa los intervalos de confianza de las medianas al 95%.	29
14	Excreción de amonio (mg NH ₄ h ⁻¹ h ⁻¹ kg ⁻¹) del pez payaso <i>Amphiprion ocellaris</i> aclimatados a diferentes salinidades: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, y 45 ups. Las cajas paralelas representan la totalidad de los datos divididos en cuartiles, mientras que la zona delimitada por puntos representa los intervalos de confianza de las medianas al 95%.	31
15	Relación atómica O: N en <i>Amphiprion ocellaris</i> aclimatado a diferentes salinidades, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 ups.	33
16	Presión osmótica de <i>Amphiprion ocellaris</i> aclimatado a 29°C y salinidades de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 ups.	34
17	Capacidad osmorreguladora encontrada en <i>Amphiprion ocellaris</i> aclimatados a diferentes salinidades, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 ups.	35
18	Tasa de consumo de oxígeno (TCO) de <i>Amphiprion ocellaris</i> las temperaturas de 23°C (A) y 29°C (B), Las barras indican la distribución de los datos alrededor de la mediana, la línea central representa la mediana. La zona delimitada por los puntos	36

representan los intervalos de confianza de las medianas al 95%.

19	Excreción de Amonio ($\text{mg NH}_4^+\text{h}^{-1}\text{Kg}^{-1}$) del <i>Amphiprion ocellaris</i> aclimatado a las temperaturas de 23°C (A) y 29°C (B) evaluando 3 diferentes dietas. Las barras indican la distribución de los datos alrededor de la mediana, la línea central representa la mediana. La zona delimitada por los puntos representan los intervalos de confianza de las medianas al 95%.	37
20	Relación atómica O: N en <i>Amphiprion ocellaris</i> aclimatado a 23°C (A) y 29°C (B) evaluando 3 diferentes dietas.	38
21	Valores obtenidos para la tasa metabólica estándar (SSM) y la tasa metabólica máxima (MMR) de <i>Amphiprion ocellaris</i> aclimatado a 2 temperaturas diferentes (23 °C y 29 °C) alimentado con 3 dietas experimentales (D1, OT y D2).	39
22	Campo de actividad metabólico mostrado por <i>Amphiprion ocellaris</i> alimentados con tres diferentes dietas (D1, OT, D2) en dos temperaturas distintas (23 °C y 29 °C)	40
23	Incremento aparente de Calor (IAC) de <i>Amphiprion ocellaris</i> alimentados con tres diferentes dietas (A) D1, (B) OT y (C) D2) a 23 °C	41
24	Incremento aparente de Calor (IAC) de <i>Amphiprion ocellaris</i> alimentados con tres diferentes dietas (D1, OT y D2) a 29 °C	43
25	Crecimiento mostrado por los juveniles de <i>Amphiprion ocellaris</i> , durante el tiempo de experimentación (5 semanas) aclimatado a (A) 23°C y (B) 29°C y suministrándoles tres dietas diferentes	44

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Influencia de salinidad en diferentes especies de peces	10
2	Ingredientes de la dieta basal de <i>A. ocellaris</i> , de la cual se partió la formulación de la D1, a la cual se le agrego una combinación de harina de Jamaica y betabel, y la D2, la cual se le agrego una combinación de harinas de zanahoria y flor de cempasúchil	23
3	Análisis proximal de las 3 dietas experimentales administradas a <i>Amphiprion ocellaris</i>	23
4	Datos de CTMax y CTMin para obtener las temperaturas para TIMRmax y TIMRmin, para <i>Amphiprion ocellaris</i> .	25
5	Comparación múltiple a posteriori de la tasa de consumo de oxígeno en <i>Amphiprion ocellaris</i> derivado del efecto de las diferentes salinidades (Prueba de Tukey).	30
6	Comparación múltiple a posteriori de la tasa de excreción de amonio de <i>Amphiprion ocellaris</i> expuesto a diferentes salinidades (Prueba de Tukey).	32
7	Consumos de los organismos <i>Amphiprion ocellaris</i> sin ingesta de alimenta (CO normal) y después de administrarles alimento (IAC)	43
8	Respuesta metabólica de <i>Amphiprion ocellaris</i> con tres dietas diferentes a 2 temperaturas diferentes.	44

1. Introducción

Los ecosistemas de coral son ecosistemas marinos altamente productivos y diversos, se encuentran en todos los océanos tropicales y subtropicales del mundo. Proporcionan el hogar, zonas de alimentación y zonas de crianza de una gran diversidad de especies suministrando más del 25% de las especies marinas (Spalding & Green, 2001).

A pesar de ser un ecosistema de gran importancia, están en peligro en todo el mundo, el 19% ya se perdió por completo, 15% podrían perderse en los próximos 10-20 años, y 20 % se estima se perderá dentro de 20-40 años. (Wilkinson, 2008). Esto se debe a que enfrentan una amplia gama de amenazas incluyendo: sobrepesca, desarrollo costero, la introducción de especies exóticas, escorrentía agrícola, los huracanes y las tormentas, las enfermedades, la contaminación y el tan nombrado cambio climático. (Gardner, et al., 2003; Lesser, 2004; Burke, et al., 2011).

Otra amenaza potencialmente grave, pero poco estudiada es la recolección y el comercio ornamental de la vida silvestre que habita en ellos. Este comercio incluye la recolección de organismos para las industrias de acuarismo, joyería, curiosidades y decoración del hogar (Wabnitz, et al., 2003; Tissot, et al., 2010).

El comercio mundial de especies de arrecifes de coral destinadas para acuarios es grande y está en continua expansión. Una gran cantidad y diversidad de especies están involucradas en el comercio ornamental (Rhyne, et al., 2012). Alrededor de 14-30 millones de peces, que corresponden a por lo menos 1,802 especies de peces (Tsounis, et al., 2010; Murray, et al., 2012) son extraídos cada año de al menos 45 países, la mayoría en vías de desarrollo, con baja capacidad institucional y de gestión. (Wabnitz, et al., 2003; Tissot, et al., 2010). Siendo la Unión Europea y Estados Unidos los países con mayor consumo de peces ornamentales (FAO, 2005).

A diferencia de las especies ornamentales de agua dulce, donde en la actualidad el 90 % de los peces comercializados son criados en cautiverio, la mayoría de las especies ornamentales marinas son extraídas directamente de su medio natural (Andrews, 1990), poniendo en riesgo la sostenibilidad de este recurso. (Friedlander, 2001; Moore, 2001; Best, 2002).

A consecuencia de esto, varias naciones han iniciado esfuerzos de conservación, desarrollando y fortaleciendo los métodos para el cultivo de peces, corales e invertebrados (Ostrowsky & Laidley, 2001).

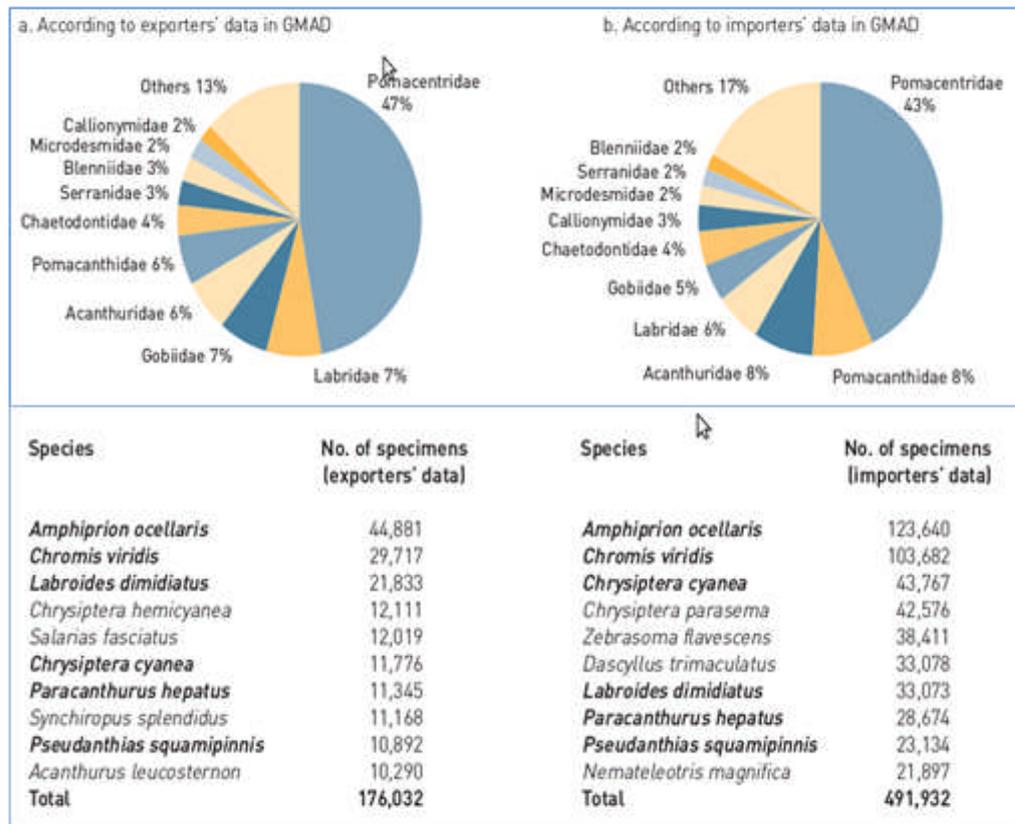


Figura 1.- Especies mayormente comercializadas a nivel mundial según el GMAD (The Global Marine Aquarium Database) para los años 1997 a 2002

La Pomacentridae es la familia más popular en el comercio de especies ornamentales marinas, representando el 50% de las importaciones del consumo total de dichas especies (Rhyne, et al., 2012). Según los datos de los importadores en GMAD (Figura 1), el *Amphiprion ocellaris* es el pez con mayor demanda en la industria de especies ornamentales marinas.

Los peces payasos pertenecen a la familia Pomacentridae, con 29 especies en el género *Amphiprion* y una especie del género *Premnas*. Son las especies más populares en el comercio de acuarios marinos debido a su coloración atractiva, gran resistencia, su comportamiento dócil y la facilidad de su manejo en acuarios (Yasir & Qin, 2007).

Por estos motivos es considerado el “goldfish” de los acuarios marinos (Hoff, 1996). Son también considerados organismos modelo para la investigación científica, especialmente para estudios nutricionales y biología reproductiva (Delbare, et al., 1995).



Figura 2.- *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830) (Foto tomada por Marcel Waldis, Underwater Photography)

Este grupo de peces payaso se caracteriza por ser hermafroditas protándricos, que consisten en una hembra dominante y varios machos más pequeños. Si la hembra muere, un macho se transformará en hembra, asegurando un compañero reproductor para la comunidad (Myers, 1999).

Mantiene una relación simbiótica (Allen, 1997; Myers, 1999) con anémonas *Heteractis magnifica*, *Stichodactyla gigantea* y *Stichodactyla mertensii* (Myers 1999).

Amphiprion ocellaris habita los arrecifes de coral (Allen, 1997) y las lagunas coralinas hasta una profundidad de 15 metros (Myers, 1999), del océano Indo-Pacífico occidental: el este de Océano Índico incluyendo las islas de Andaman y Nicobar, Tailandia, Malasia, Australia y el noroeste de Singapur, Indonesia y Filipinas (Fishbase, 2015).



Figura 3.- Distribución del pez payaso *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830).

El pez payaso tiene un gran potencial en acuicultura. Se ha realizado extensa investigación en laboratorios estudiando la reproducción, desove, cría larvaria, pero no existen estudios sobre el efecto de la salinidad sobre el consumo de oxígeno y la excreción de amonio, pudiendo demostrar las consecuencias energéticas para su cultivo.

Hay algunos pasos muy importantes para la cría de peces ornamentales marinos. Proporcionar una condición ambiental adecuada es uno de los aspectos más importantes de la cría en cautividad. La selección y alimentación de reproductores, la alimentación, las técnicas de incubación de huevos, la cría de larvas y la alimentación juvenil son también los principales pasos involucrados en la cría en cautividad. (FAO, 2005)

En peces se observa una íntima comunicación entre los sistemas endocrino e inmune, ya que los órganos implicados en la respuesta del estrés en peces son los ejes neuroendocrinos, los cuales están involucrados en la captación y utilización de oxígeno, movilización de las reservas energética y administración de energía utilizada para el crecimiento y reproducción (Tort, 2011)

Dentro de las variables exógenas que tienen influencia en los seres vivos marinos la temperatura, salinidad y calidad del alimento, son factores directrices ya que alteran el metabolismo en cada etapa de

ciclo de vida de los organismos. El conjunto de los estudios que permiten evaluar estas respuestas a nivel organismo, se les denomina estudios ecofisiológicos (Re, 2004).

Los factores ambientales en la fisiología y las tasas metabólicas desempeñan un papel importante en el éxito de mantener vivos los peces ornamentales marinos durante la cría en cautividad.

Boeuf y Payan (2001) mencionan que los peces son dependientes de factores, externos (ecológicos) como internos (nerviosos, endócrinos y neuroendócrinos), que controlan o sincronizan muchas actividades y funciones, incluyendo la capacidad de crecimiento y osmorregulación.

Gracias a ello es posible clasificar los factores ecológicos en dos tipos:

1. Factores determinantes (temperatura, salinidad, fotoperiodo), que actúan directamente a través de los receptores para aumentar o disminuir el crecimiento.
2. Factores limitantes, que operan por encima de (amoníaco) o por debajo (oxígeno) de un umbral específico o dentro de un rango de tolerancia (pH).

Entre los factores externos (ecológicos), la salinidad es un factor específico del medio acuático (Boeuf y Payan, 2001), la cual por tanto se convierte en una variable la cual puede ser controlada en los cultivos para beneficio de los organismos.

Evans (1993) documentó que los peces teleósteos viven en ambientes con una composición distinta a la de su medio interno, existiendo un flujo de iones y líquido entre ambos medios (externo e interno). Los teleósteos eurihalinos presentan la capacidad de poder vivir en distintas salinidades. Los teleósteos presentan en función de la salinidad del medio en donde se encuentren dos estrategias de osmorregulación diferentes para lograr mantener la homeostasis en su medio interno:

- 1) Regulación hipoosmótica en los animales adaptados a un ambiente hiperosmótico que contrarresta la ganancia pasiva de iones y la pérdida osmótica del agua.
- 2) Regulación hiperosmótica, en los animales adaptados a un ambiente hipoosmótico que contrarresta la entrada pasiva de agua y la pérdida de iones hacia el ambiente.

Los cambios de salinidad, causan un estrés fisiológico, que afecta el crecimiento, la reproducción, el metabolismo, la osmorregulación y la inmunidad de los organismos (Ackerman, et al., 2000).

En los cambios de salinidad, la osmolaridad del plasma es cambiado por el movimiento del agua, y los iones de Na^+ y Cl^- en órganos osmorreguladores como las branquias, el riñón y el intestino (Evans, 1993). Los peces tratan de mantener la homeostasis del cuerpo en relación con el cambio de osmolaridad.

La salinidad puede afectar el crecimiento de los organismos debido a que influye sobre el costo energético que los peces invierten para la regulación iónica y osmótica (Arjona, et al., 2009).

Los peces osmorreguladores necesitan invertir energía para efectuar los ajustes osmóticos necesarios, esto es conocido como trabajo osmótico. Los peces osmoconformadores se benefician de no gastar recursos metabólicos en la osmorregulación, su medio interno se mantiene en igualdad osmótica con la del medio externo presentando una alta permeabilidad osmótica comparado con los teleósteos marinos (Marshall & Grosell, 2006).

El consumo de oxígeno es un indicador de la tasa metabólica ampliamente utilizado; la medición de la tasa de consumo de oxígeno (TCO) se utiliza a menudo para deducir el uso de energía y el estrés en los organismos acuáticos. También se puede utilizar para determinar las condiciones ambientales que resultan en el peso neto máximo a ganar en un organismo (Shi, Zhang, Liu y Zang 2011).

La tasa de consumo de oxígeno (TCO) está íntimamente asociado con el trabajo metabólico y el flujo energía que un organismo puede utilizar para los mecanismos de control homeostático (Salvato, et al., 2001; Das, et al., 2005).

El amonio es el principal producto de excreción de los organismos acuáticos y energéticamente se considera la forma más eficiente para excretar nitrógeno (Armstrong, 1979; Gerhardt, 1980; Regnault, 1987). La tasa de excreción de amonio generalmente se incrementa al aumentar la temperatura y al disminuir la salinidad.

Podemos determinar el tipo de sustrato metabólico que está siendo empleado por los organismos (lípidos, proteínas y carbohidratos) por medio de la integración de los valores del consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada en la razón atómica (O: N) (Mayzaud & Conover, 1988).

Una nutrición adecuada es fundamental en los animales para mantener un buen sistema de producción, económicamente sustentable, así como organismos saludables y productos de alta calidad. En el cultivo de los peces, la nutrición debe cubrir todas las necesidades del organismo, y es una actividad que representa del 40 al 50% de los costos de producción. Las dietas de los peces han cambiado con los años, y se han desarrollado nuevos alimentos que promueven el crecimiento, además de mejorar la salud de los organismos (Francis- Floyd, 2002).

La determinación del color en la piel de los peces es un proceso complejo que involucra una serie de factores celulares, fisiológicos y genéticos. Algunos de estos factores producen un fenotipo de color estable mientras que otros están influenciados por el ambiente, el cual puede producir cambios en el fenotipo (Colihueque, 2010).

En la naturaleza existen muchos pigmentos en las plantas; como, por ejemplo, antocianinas, carotenoides, clorofilas y porfirinas los cuales tienen un papel importante en las células vegetales protegiéndolas de la fotooxidación (Palozza & Krinsky, 1992). Los carotenoides son pigmentos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y están presentes en muchas algas, animales, microorganismos y plantas (Britton, 1999). Debido a que los peces no pueden sintetizar sus propios pigmentos, estos los adquieren de forma natural en su dieta, es por ello que la acuicultura ha buscado fuentes alternativas de pigmentos para adicionarlos a los alimentos (Meyers & Latscha, 1990; Torrissen, 1985).

La coloración de los peces payaso criados en granjas es diferente a los peces extraídos del medio o silvestres (Booth, et al., 2004). El color de los peces criados en cautiverio suele ser más ligero que el de los peces payaso capturados en la naturaleza (Tanaka, et al., 1992; Allen, 1991). El pigmento de los peces ornamentales es el primer parámetro de mercado.

La suplementación de carotenoides podría cambiar la coloración del pez payaso (Tanaka et al., 1992). Los carotenoides además del color desempeñan un papel principal en el crecimiento saludable, el metabolismo y la reproducción (Wallat, et al., 2005). Los peces no pueden sintetizarlos como otros animales y deben obtenerse de fuentes dietéticas (Hata, 1972a; Torrissen, et al., 1989; Storebakken & No, 1992). El principal carotenoide es la astaxantina y se ha utilizado ampliamente en la acuicultura, hasta ahora. Krinsky (1993) informó que la absorción de carotenoides mejora la supervivencia de los peces.

Entre los parámetros fisiológicos que pueden correlacionarse con cambios (temperatura o salinidad), la medición de la tasa metabólica es relevante, ya que nos permite estimar los costos energéticos que estas combinaciones abióticas tienen en los organismos (Lemos et al., 2001, Altinok & Grizzle 2003, Brougher et al., 2005).

2. Antecedentes

Existen muchos estudios sobre los efectos de la salinidad en otras especies (Tabla 1), el efecto de la salinidad en *A. ocellaris*, no se ha estudiado. Sin embargo, Dhaneesh et al en el 2011 realizaron un estudio en peces payaso *Amphiprion akallopisos*, para determinar las salinidades letales superiores e inferiores exponiendo a los organismos a diferentes salinidades, llegando a la conclusión que los juveniles de *A. akallopisos* mostraron tasas satisfactorias de supervivencia y no mostraron signos de estrés en salinidades altas (< 53 ups) y bajas (>6 ups).

Díaz et al., (2006) han usado el gradiente horizontal para realizar mediciones de preferencia térmica en diversos organismos acuáticos.

En *A. ocellaris*, Velasco et al (en proceso) determinaron la temperatura preferida, en 29.6 °C, en organismos juveniles, donde el gasto energético es direccionado principalmente para crecimiento y maduración, la temperatura nos servirá de base para definir los óptimos fisiológicos para *A. ocellaris*.

Los peces payaso en la actualidad son mejor ejemplo de especímenes ornamentales exitosamente criados en cautiverio, pero se sabe muy poco sobre los procesos fisiológicos, así como de nutrición.

Avella et al en el 2007 estudiaron los efectos del enriquecimiento de presas vivas sobre el crecimiento y la pigmentación en larvas de pez payaso *Amphiprion* proporcionando evidencias que el uso de Algamac 2000 en las dietas proporcionaba un mejor desempeño en el crecimiento y pigmentación de los organismos.

Tabla 1.-Influencia de salinidad en diferentes especies de peces.

Species	Tolerance	Best growth	Reference
<i>Pomatomus saltatrix</i> (Bluefish)	= (5 and 25 psu)		Buckel et al. (1995)
<i>Micropogonias furnieri</i> (Croaker)	+ (10–30)	17–19	Aristizabal Abud (1992)
<i>Sparus sarba</i> (Sea bream)	+ (0–35)	15	Woo and Kelly (1995)
<i>Oreochromis niloticus</i> (Tilapia)	+ (0–16)	8	Likongwe et al. (1996)
<i>Oreochromis spilurus</i> Tilapia	= (0–37)		Jonassen et al. (1997)
<i>Oreochromis aureus</i> (Tilapia)	= (0–27)		Chervinsky and Yashouv (1971)
<i>O. mossambicus</i> (Tilapia)	120 psu	17.5	Suresh and Lin (1992)
<i>O. niloticus</i> (Tilapia)	36	5–10	Suresh and Lin (1992)
<i>O. aureus</i> (Tilapia)	40	10–15	Suresh and Lin (1992)
<i>O. spilurus</i> (Tilapia)	36	0	Suresh and Lin (1992)
Hybrid Red (Tilapia)	35	30–35	Suresh and Lin (1992)
<i>Morone chrysops</i> (White bass)	+0–20 psu	0–12	Heyward et al. (1995)
<i>Chanos chanos</i> (Milkfish)	+0–55	55	Swanson (1998)
<i>Chanos chanos</i> (Milkfish)	+0–35	0	Alava (1998)
<i>Trinectes maculatus</i> (Hogchoker)	+0–30	30	Peters and Boyd (1972)
<i>Trinectes maculatus</i> (Hogchoker)	+0–15		Peterson-Curtis (1997)
<i>Gadus morhua</i> (Cod)	+14 and 28 psu	14	Dutil et al. (1997)
<i>Mugil sp.</i> (Mullet)	+3–24	17	Peterson et al. (1999b)
<i>Chelon labrosus</i> (Grey mullet)	= (5–25)		Cardona and Castelló-Orvay (1997)
<i>Salaria fluviatilis</i> (Blenny)	+0–35	12	Plaut (1999)
<i>Micropogonias undulatus</i> (Atlantic croaker)	+0–20	5	Peterson et al. (1999a)
<i>Sparus aurata</i> (Gilthead seabream)	+8–38	28	Conides et al. (1997)
<i>Dicentrarchus labrax</i> (European seabass)	+0–35		10–35 Bœuf et al. (unpublished)
<i>Lutjanus argentiventris</i> (Amarillo snapper)	+3–24 psu	30	Serrano-Pinto and Caravea-Patiño (1990)
<i>Salmo salar</i> (Atlantic salmon)	+0–35	22–28	Bœuf et al. (unpublished)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Rainbow trout)	= (0 and 34)		Bœuf et al. (unpublished)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Rainbow trout)	+ (0–16)	0	Morgan and Iwama (1991)
<i>Oncorhynchus keta</i> (Coho salmon)	+0–35	22–28	Bœuf et al. (unpublished)
<i>Salvelinus alpinus</i> (Arctic charr)	+0–35	0–20	Arnesen et al. (1993)
<i>Scophthalmus maximus</i> (Turbot)	+0–35	10–19	Gaumet et al. (1995)

The influence of salinity on growth of different species of fish are indicated as follows: (positive +, or neutral =), tolerance (maximum salinity or range tested), the best salinity conditions for growth, and the reference.

Se realizaron estudios del efecto de los carotenoides en la pigmentación de la piel de *A. ocellaris* probando tres tipos de pigmentos (astaxantina, β - caroteno y cantaxantina) adicionados a la dieta a concentraciones de 20, 50 y 100 ppm, revelando que la dosis de pigmento no cambia el brillo, coloración o tonalidad del organismo, pero que el tipo de pigmento si altera el tono, siendo la astaxantina la que incrementó el tono de color rojo. También se observó que, si este pigmento es eliminado de la dieta, el tono no se reduce, pero si la saturación del mismo (Yasir & Qin, 2010).

3. Justificación

Amphiprion ocellaris es una especie de gran aceptación comercial, con alto valor económico, cuya producción depende en su mayoría del medio silvestre. Actualmente existe un mercado insatisfecho, por lo que se debe generar el conocimiento necesario que apoye al desarrollo de la tecnología para su cultivo. El conocimiento de la fisiología osmorreguladora, y bioenergética es de vital importancia para el adecuado desarrollo de juveniles de esta especie, debido a que la variación de las condiciones ambientales provoca situaciones de estrés que afectan su crecimiento y supervivencia de los organismos, Es por eso que con los resultados de este trabajo podremos establecer los óptimos necesarios para establecer cultivos exitosos de *Amphiprion ocellaris*.

4. Hipótesis

Si la temperatura preferida y el punto isosmótico son las condiciones donde los organismos tienen el menor gasto energético y la mayor cantidad de energía es dirigida al crecimiento, se podrán establecer el óptimo fisiológico y las mejores condiciones de cultivo para *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830).

5. Objetivo

5.1. Objetivos generales

Conocer las respuestas fisiológicas del *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830), expuesto a diferentes salinidades con la temperatura preferida (Velasco, *et al.*, en proceso)

5.1.1. Objetivos particulares

- Determinar el consumo de oxígeno y gasto energético metabólico de *Amphiprion ocellaris*, expuesto a diferentes salinidades a temperatura preferida (29 °C).
- Medir la tasa de excreción de amonio y determinar los patrones de respuesta de los organismos a las condiciones de salinidad experimentales.
- Determinar la relación atómica Oxígeno: Nitrógeno (O: N) en los juveniles de *Amphiprion ocellaris* del aclimatados a diferentes salinidades.
- Determinar el patrón de osmorregulación y la capacidad osmorreguladora de los organismos aclimatados a las condiciones experimentales. Cuantificando la osmolaridad del plasma sanguíneo en los juveniles de *Amphiprion ocellaris*.
- Definir los óptimos fisiológicos para *Amphiprion ocellaris*.
- Formular dietas experimentales para evaluar crecimiento en *Amphiprion ocellaris*.
- Determinar el consumo de oxígeno, excreción de amonio y relación O: N de *A. ocellaris*, expuesto a diferentes dietas a dos temperaturas (23°C y 29°C).
- Determinar el Campo de Actividad Metabólico (CAM) de *Amphiprion ocellaris* expuestos a diferentes dietas y dos temperaturas de aclimatación (23°C y 29°C).

6. Materiales y métodos

6.1. Osmorregulación

6.1.1. Obtención y mantenimiento de los organismos

Se obtuvieron 300 juveniles de pez payaso *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830) del laboratorio de producción de peces de ornato del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) de Mazatlán, Sinaloa, México, con un peso promedio de $1.88 \pm .08$ gramos.

Estos organismos fueron trasladados vía aérea en bolsas de plástico saturadas con oxígeno farmacéutico, dentro de hieleras, a la ciudad de Tijuana, desde donde fueron transportados al laboratorio de Biotecnología Marina del CICESE, en Ensenada, Baja California. Fueron colocados en tanques de 200 litros, mantenidos por 9 días en condiciones controladas de temperatura (29°C) y salinidad (35 ups), para disminuir el estrés producido por su traslado. Durante todo el periodo experimental los organismos se alimentaron 3 veces al día con Skretting Gemma Diamond con un porcentaje de proteína de 56% y 18% de lípidos.

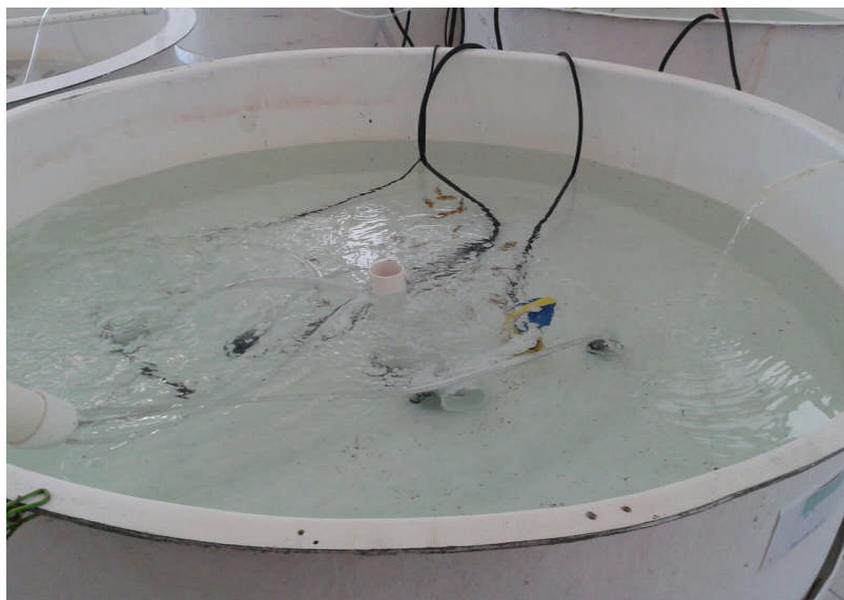


Figura 4.- Tanques de 200 l, en donde fueron mantenidos los organismos de *A. ocellaris* para disminuir el estrés por su traslado.

6.1.2. Aclimatación de los organismos a las salinidades experimentales

Se utilizaron 184 organismos colocados en densidades de 23 peces por unidad experimental, la cual consistía de 8 peceras de acrílico (una por salinidad), cada una con su propio calentador y piedra de aireación. Se sometieron a una temperatura de 29 ± 1 °C (*preferendum* térmico) (Velasco, *et al.*, En proceso). Las salinidades experimentales a las cuales fueron aclimatados los peces fueron: 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 y 10 ups. Se realizaban 2 recambios de agua al día, para mantener bajos los niveles de amonio en el agua. Se sifoneaba 20 minutos después de cada alimentación, esto para evitar la acumulación de materia orgánica.



Figura 5.- Sistema utilizado para aclimatar y mantener a los organismos en las salinidades experimentales.

Para lograr dichas salinidades experimentales se hicieron diluciones con agua dulce, previamente declarada, bajando 2 ups por día para tratar de evitar estresar a los organismos, para las salinidades inferiores. El agua dulce utilizada para bajar la salinidad, fue puesta en un tior de 200 litros durante 24 horas con aireación constante, esto es para eliminar el cloro presente en el agua. En el caso de las salinidades superiores se utilizó una mezcla de agua de mar y sal de acuario.

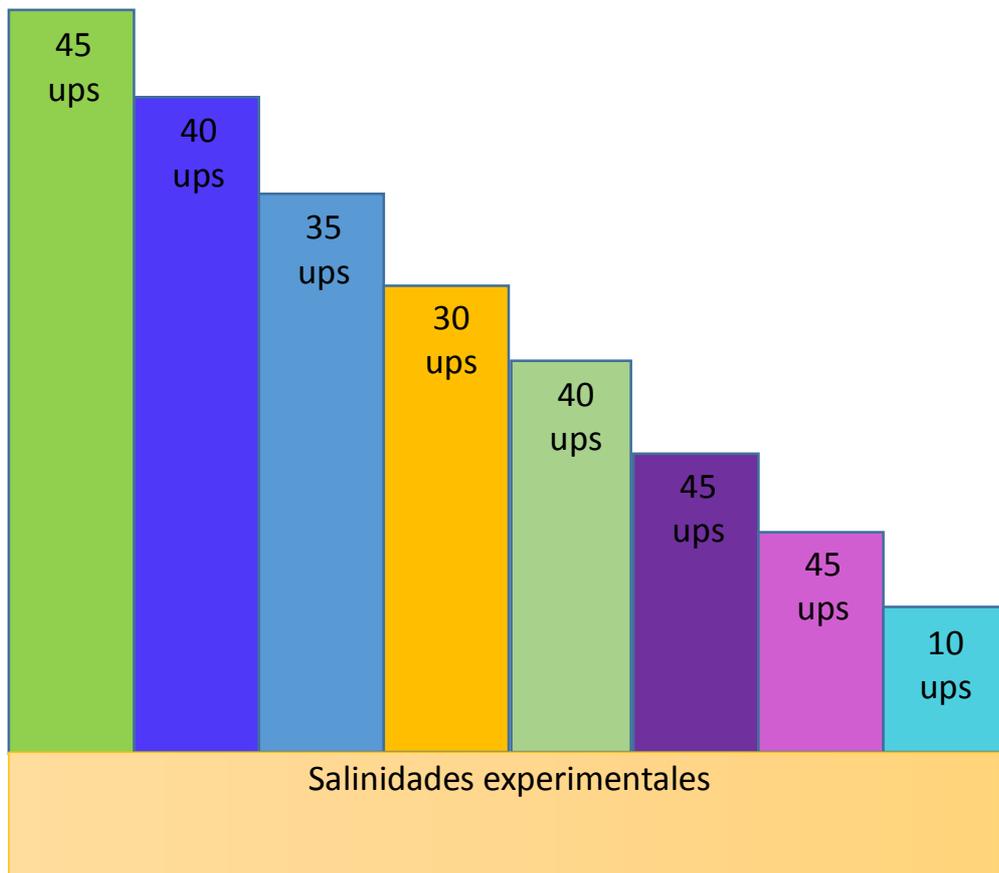


Figura 6.- Esquema de las salinidades experimentales a las cuales serán sometidos los organismos .

6.1.3. Consumo de oxígeno y excreción de amonio

Las mediciones del consumo de oxígeno y de excreción nitrogenada de los organismos mantenidos a las salinidades experimentales se realizaron mediante la utilización de un sistema respirométrico como el descrito por Díaz et al. (2007). El cual consiste de un estanque en donde se colocan 5 cámaras respirométricas de 500 ml, las cuales son alimentadas con el agua de un depósito externo en donde se colocó un calentador de titanio de 1000 watts conectado a un controlador térmico para mantener la temperatura deseada durante el experimento (29°C), por medio de una bomba el agua fue impulsada el agua del depósito hacia el interior del sistema, donde cada cámara contiene un sensor de fibra óptica que monitorea constantemente el oxígeno disuelto. El respirómetro se llenó con agua a la salinidad experimental correspondiente y se mantuvo a una temperatura constante de 29 ± 1 °C.



Figura 7.- *Amphiprion ocellaris* en la cámara respirométrica en donde se realizaron las evaluaciones de la TCO.

El consumo de oxígeno se determinó para 4 organismos en cada salinidad de aclimatación. La medición se realizó en grupos de 4 dejando la cámara 5 vacía para ser tomada como control y así poder realizar las correcciones por el consumo de oxígeno de los microorganismos presentes en el sistema.

Los organismos se dejaron durante 30 minutos en las cámaras respirométricas con flujo abierto para disminuir el estrés por la manipulación.

Transcurrido este tiempo se tomó una muestra de agua inicial, las cámaras se cerraron y se inició el monitoreo durante 10 minutos del oxígeno disuelto en las cámaras evitando que el consumo no excediera el 30% de saturación, una vez concluido el tiempo de medición se tomó una muestra de agua final, tomada la muestra final se reabrió el flujo de agua para la recuperación de los organismos. Estas mediciones se realizaron por duplicado. Al término de los experimentos los organismos fueron regresados a sus estanques de aclimatación.

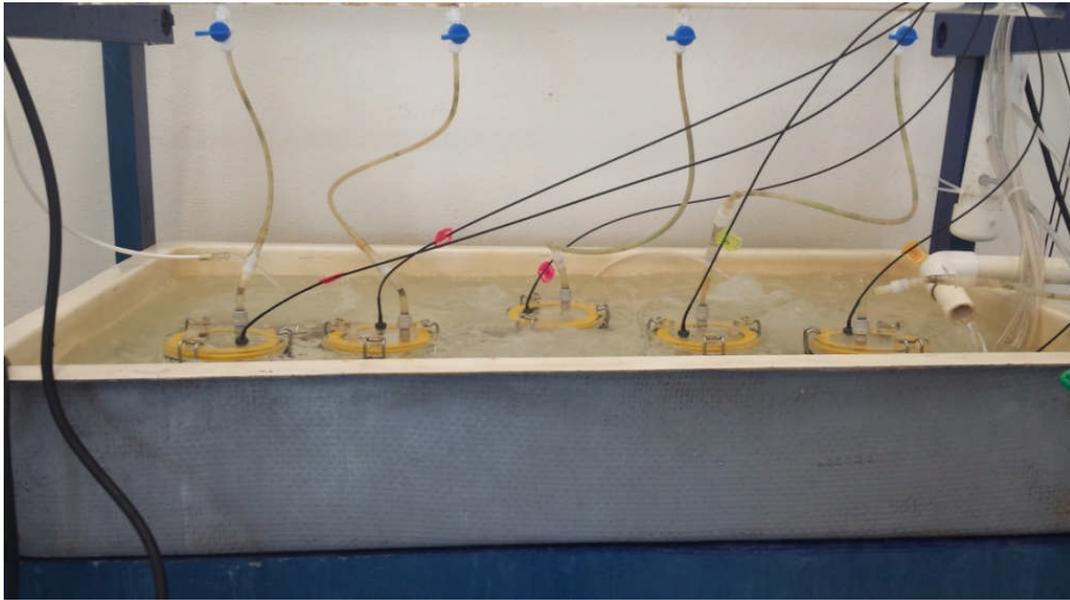


Figura 8.- Sistema respirométrico semi-abierto utilizado para la medición del oxígeno en los organismos sometidos a las salinidades experimentales.

Se determinó la tasa de consumo de oxígeno (TCO) de los organismos expuestos a cada salinidad experimental mediante un oxímetro OXY-10 (Presens). Para esto se anotaron la hora inicial y final del experimento, la concentración de oxígeno inicial y final, y el peso húmedo del organismo. TCO se calculó mediante la ecuación:

$$\text{TCO} = (C_t - C_0) V / (W \times T) \quad (1)$$

Donde C_t , C_0 ; es el cambio en el contenido de oxígeno ($\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$), V el volumen de la cámara respirométrica, antes y después de las pruebas, W el peso del organismo (g) y T el tiempo de duración (h) (Wraght, et al., 1995; Cerezo Valverde, et al., 2006; Zheng, et al., 2008).

Para determinar la tasa de excreción de amonio (TEA) se utilizaron las muestras de agua tomadas durante la medición del consumo de oxígeno (muestra inicial y muestra final). En cada medición se tomaron 200 μl de agua de cada cámara para medir la concentración de amonio utilizando el método de azul de indofenol, Rodier (1981) modificado para lecturas en micro placa.

Las muestras de agua se colocaron en micro placas, adicionando al momento los reactivos para inducir a la reacción en la que se forma el azul de indofenol. Este último es directamente proporcional a la cantidad de amonio presente en la muestra. Una vez que la reacción se produjo, las muestras fueron colocadas en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan GO) de absorbancia a 640 μm .

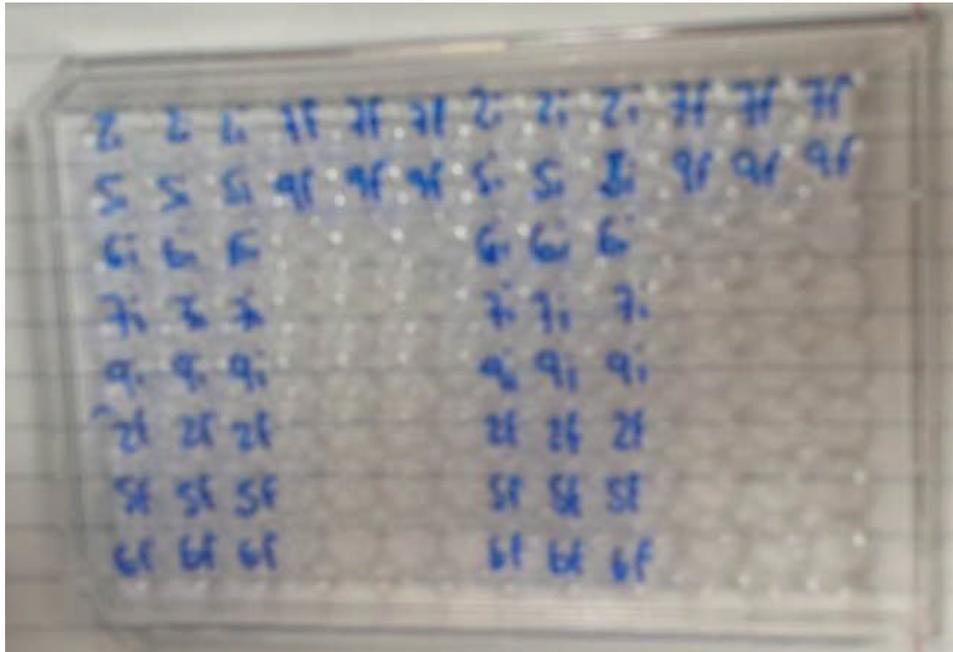


Figura 9.- Micro placa utilizada en la medición del amonio.

La tasa de excreción de amonio (TEA) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{TEA} = (C't - C'0) V / (W \times T) \quad (2)$$

Donde $C't$, $C'0$; es el cambio en la excreción de amonio inicial y final ($\text{mg NH}_4^+ \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$), V es el volumen de la cámara respirométrica, antes y después de las pruebas, W es el peso de *Amphiprion ocellaris* en gramos y T el tiempo de duración en horas, respectivamente (Zheng, et al., 2008).

6.1.4. Relación atómica O: N

La relación atómica oxígeno: nitrógeno (O: N) fue calculada utilizando los valores obtenidos de las mediciones del consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada de los organismos expuestos a las salinidades experimentales. Siendo calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\text{O: N} = \text{peso atómico (NH}_4^+) / \text{peso atómico (O}_2) * [\text{QO}_2] / [\text{NH}_4^+] \quad (3)$$

En dónde $[\text{QO}_2]$, es el consumo de oxígeno, y $[\text{NH}_4^+]$ el amonio total excretado por los organismos. (Flores, et al., 2008).

6.1.5. Presión osmótica

Para determinar la presión osmótica de los organismos a diferentes salinidades experimentales, se tomaron tres organismos de cada salinidad. Con una navaja de acero inoxidable se cortó la cola de los peces, para extraer una muestra de sangre de 10 μl , la cual se analizó con ayuda de un osmómetro de vapor Wescor[®], (debido al tamaño de los organismos es imposible la extracción de sangre con jeringa). Se calculó la capacidad osmorreguladora (CO), como la diferencia entre la osmolaridad de la sangre tomada y la osmolaridad tomada del medio externo, en mmol kg^{-1} (Díaz et al., 2001).

6.2. Campo de actividad metabólica

6.2.1. Obtención, mantenimiento y aclimatación de los organismos

Un total de 120 juveniles de pez payaso *A. ocellaris* de 30 días de nacidos y 0.304 ± 0.02 gr de peso fueron colocados en tanques de 200 litros, mantenidos por 9 días en condiciones controladas de temperatura (29°C) y salinidad (35 ups), para disminuir el estrés producido por su traslado. Se realizaron recambios parciales (30%) de agua diariamente.

Los organismos fueron alimentados con Skretting Gemma Diamond con un porcentaje de proteína de 56% y 18% de lípidos durante los días que permanecieron en los tanques.

6.2.2. Preparación de las dietas

Se utilizaron dos dietas experimentales (frescas) y un control (comercial).

La formulación de las dietas se inició con el secado de los ingredientes fuente de carotenoides naturales, Zanahoria (*Daucus carota*), Flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*), Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y Betabel (*Beta vulgaris*) los cuales fueron secados con mucho cuidado para no desnaturalizar los carotenoides.



Figura 10.- Ingredientes utilizados para preparar las harinas adicionadas a las dietas experimentales de *Amphiprion ocellaris*.

Para el secado de los vegetales se utilizó una estufa, se colocaron esparcidos los vegetales rallados para alcanzar una deshidratación uniforme en charolas de aluminio de 34 cm² (Figura 11) a una temperatura de 45° C por 12 horas. Después de secar cada uno de los ingredientes estos fueron tamizados y guardados en bolsas selladas al vacío y colocados en refrigeración para conservarlos en buenas condiciones evitando así la oxidación de los carotenoides.



Figura 11.-Secado de los ingredientes necesarios para la elaboración de las dietas experimentales, las cuales se secaron en una estufa de convección, en charolas forradas de aluminio para evitar que los ingredientes se pegaran.

Las dos dietas experimentales se formularon a partir de una dieta basal, la cual contiene ingredientes frescos que se listan en la Tabla I, añadiendo a cada dieta un porcentaje de harinas obtenidas después del secado de los ingredientes; en la dieta 1 (D1) se añadió Jamaica y betabel, y en la dieta 2, (D2) Cempasúchil y zanahoria.

Tabla 2.- Ingredientes de la dieta basal de *A. ocellaris*, de la cual se partió la formulación de la D1, a la cual se le agrego una combinación de harina de Jamaica y betabel, y la D2, la cual se le agrego una combinación de harinas de zanahoria y flor de cempasúchil.

INGREDIENTES	%
CAMARÓN	32.1
CALAMAR	8.1
ALMEJA	8.1
JAIBA	8.1
JUREL	8.1
MEJILLÓN	8.1
KRILL	6.7
KALE	3.2
NORI	3.2
EISENIA	4.0
AJO FRESCO	4.0
ACEITE DE PESCADO	2.7
VITAMINAS	0.4
PIGMENTO*	4.0

- * Se le agrego la combinación para D1 y para D2 respectivamente.

Tabla 3.- Análisis proximal de las 3 dietas experimentales administradas a *Amphiprion ocellaris*

DIETA	PROTEÍNAS %	LÍPIDOS %	HUMEDAD %	CENIZAS %	CARBOHIDRATOS %
D1	42.96	19.53	7.49	9.65	20.37
D2	44.27	20.99	7.70	9.61	17.43
OT	51.00	11.00	7.00	15.00	16.00

6.2.3. Consumo de Oxígeno y excreción de amonio.

Un total de 120 juveniles de pez payaso *A. ocellaris* de 30 días de nacidos, con un peso promedio de 0.304 ± 0.02 g fueron colocados en un sistema de 2 niveles con 6 peceras cada uno de 40 litros, 10 organismos por pecera y mantenidos por 5 días en condiciones controladas de temperatura (29°C) y salinidad (34 ups), para disminuir el estrés.

Transcurridos los 3 días a los peces del nivel superior se les bajo la temperatura 2 grados por día, hasta llegar a 23°C.

Cada nivel cuenta con un sistema de aireación constante, que provee de aire individualmente a cada pecera, así como de un filtro biológico, para reducir el contenido de amonio presente en cada el sistema, se colocó un fraccionador de espuma (Tuzne 9030), los cuales le dan en conjunto una buena filtración al sistema cerrado, generando así mejor calidad en el agua y mejores condiciones a nuestros organismos experimentales.



Figura 12.- Sistema cerrado utilizado en el experimento de bioenergética, consta de 2 niveles, cada uno cuenta con un filtro biológico y aireación constante. El sistema superior permaneció a una temperatura constante de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ y el sistema inferior a $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$

Los peces permanecieron bajo condiciones experimentales por un periodo de 29 días, transcurrido el tiempo se midió el consumo de oxígeno de la misma forma descrita anteriormente.

Se realizó una biometría inicial antes del tratamiento, repitiendo la biometría a la semana durante 4 semanas continuas.

La biometría realizada se hizo de los 10 organismos en conjunto, se colocó un vaso de plástico con agua de mar, la balanza fue tarada e inmediatamente fueron colocados los organismos para registrar su peso inicial, la medición del peso inicial se realizó de esta manera para minimizar la manipulación de los organismos. Una vez terminada la biometría inicial fueron introducidos en el sistema cerrado antes descrito.

Se mantuvieron estos organismos un periodo de tres días previos al inicio del suministro de las dietas experimentales, para su adaptación al entorno. Concluidos los tres días se inició la alimentación con las dietas experimentales, suministrando una ración equivalente al 6 % del peso total por tanque, dividida en 2 raciones por día.

Cada semana se realizaron biometrías para poder evaluar su crecimiento y así poder ajustar el % de ingesta del alimento.

6.2.4. TIMR (Temperature Induction Metabolic Rate)

Para evaluar el TIMR para cada temperatura de aclimatación se expuso a los organismos de cada Dieta experimental, con una modificación, de los resultados obtenidos previamente (Velasco et al, en proceso) de CTmax y CTMin, se tomó el valor de la temperatura de aclimatación el valor obtenido de CTMax y CTMin y se calculó el 90% del CTMax, y el 110 % en CTMin.

Tabla 4.- Datos de CTMax y CTMin para obtener las temperaturas para TIMRmax y TIMRmin, para *Amphirpion ocellaris*.

TA	TCMax	TCMax 90%	TCMin	TCMin 110%
23 °C	36.1 °C	32.5 °C	14.8 °C	16.28 °C
29 °C	39.7 °C	35.75 °C	18.2 °C	20.02 °C

La TIMR_{max} se determinó a través de la exposición de 12 organismos de cada dieta experimental a una tasa de aumento de temperatura de 1°C por minuto, se colocaron grupos de seis organismos dentro de un acuario de 40 litros de vidrio, con aireación constante, a la temperatura de aclimatación (29 °C) durante 30 min para disminuir el stress por manejo (Pérez, et al., 2003).

La temperatura se incrementó mediante un calentador de titanio de 1000 W y se tomaron los registros de temperatura con un termómetro, al llegar al 90 % los organismos fueron rápidamente sacados y pasados al respirómetro para medir el consumo de oxígeno.

La TIMR_{min} se determinó a través de la exposición de 12 organismos de cada dieta experimental, se colocaron grupos de seis organismos, cada uno dentro de una caja de plástico transparente con orificios para la circulación del agua, dentro del gradiente térmico, los organismos se colocaron en la temperatura de aclimatación y se recorrieron hacia temperaturas más frías a una tasa de disminución de la temperatura de 1°C por minuto hasta llegar al 110%, una vez llegado a la temperatura deseada fueron sacados y llevados rápidamente al respirómetro para medir el consumo de oxígeno.

El consumo de oxígeno se midió en un respirómetro semi abierto como el descrito por Díaz et al. (2007), el cual consistió de 7 cámaras respirométricas de 100 ml, cada cámara tiene un sensor de fibra óptica que monitorea constantemente el oxígeno disuelto, los sensores están conectados a un oxímetro Oxy 10 (Presens).

El consumo de oxígeno se determinó en 12 organismos de cada dieta experimental, en grupos de 6, la cámara 7 fue el control para corregir el consumo de oxígeno de los organismos debido al consumo de microorganismos presentes en el sistema, una vez colocados los organismos las cámaras se cerraron, y se monitoreo el oxígeno disuelto en las cámaras cada 30 segundos durante 5 min. Posteriormente se abrieron las cámaras, y los organismos fueron reincorporados a sus peceras experimentales.

La tasa de consumo de oxígeno se cuantificó igual que en el experimento anterior.

6.2.5. Campo aeróbico metabólico

Para evaluar el campo aeróbico (que es la diferencia entre las tasas metabólicas estándar y la tasa metabólica máxima en función de la temperatura) utilizamos la metodología propuesta por Paschke (2014) denominada TIMR (Temperature Induce Metabolic Rate).

Se utilizan los consumos de oxígeno obtenidos de los experimentos correspondientes a TIRMMax y TIRMMin.

La diferencia entre la Tasa metabólica máxima (MMR, Maximum metabolic rate) y la Tasa metabólica estándar (SMR, Standard metabolic rate) por medio del consumo de oxígeno nos da el CAM.

6.2.6. Incremento de calor aparente

La evaluación de la energía consumida por el organismo en la alimentación, se calculó la índice bioenergética, IAC (Incremento Aparente de Calor) (Beamish & Trippel, 1990).

Se tomaron 5 organismos que cada variable experimental (Temperatura y dietas), se les dio una ración de alimento correspondiente al 5% de su peso, en cuanto la ración fue ingerida se pasó a los juveniles de *Amphiprion ocellaris* a las cámaras respirométricas para evaluar el consumo de oxígeno, realizando mediciones cada minuto durante 15 minutos., dejando la cámara 6 como control para corregir el consumo de oxígeno de los organismos debido al consumo de microorganismos presentes en el sistema. Las mediciones se hicieron por duplicado.

El cálculo se efectuó restando el valor del consumo de oxígeno del ayuno, al valor máximo que alcanza el metabolismo después de la ingestión del alimento.

7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos para cada experimento fueron capturados en hojas de cálculo Excel para su posterior tratamiento. Una vez organizados los datos se procedió al análisis estadístico mediante el uso del programa SigmaPlot 11.0. (Systat Software, Inc. SigmaPlot for Windows).

En cada uno de los casos experimentales se realizó un análisis de varianza de una vía (One way ANOVA). Se aplicaron pruebas de normalidad y homocedasticidad a todos los datos. Se realizó la prueba de Tukey probar todas las diferencias entre medias de tratamientos cuando ocurrieron diferencias significativas para comparar las medias. Se utilizó también un Análisis de Varianza de Dos Vías.

8. Resultados

8.1. Tasa de consumo de oxígeno (TCO)

Las tasas de consumo de oxígeno (TCO) de juveniles de *Amphiprion ocellaris* aclimatados a las diferentes salinidades mostraron los valores más bajos a 10 ups, con valores de $550 \pm 24.85 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$, mientras que los valores más altos lo presentaron los organismos aclimatados a 40 ups, con valores de $1087.876 \pm 35.9 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$. La salinidad afecto significativamente ($P < 0.050$) el consumo de oxígeno en los organismos.

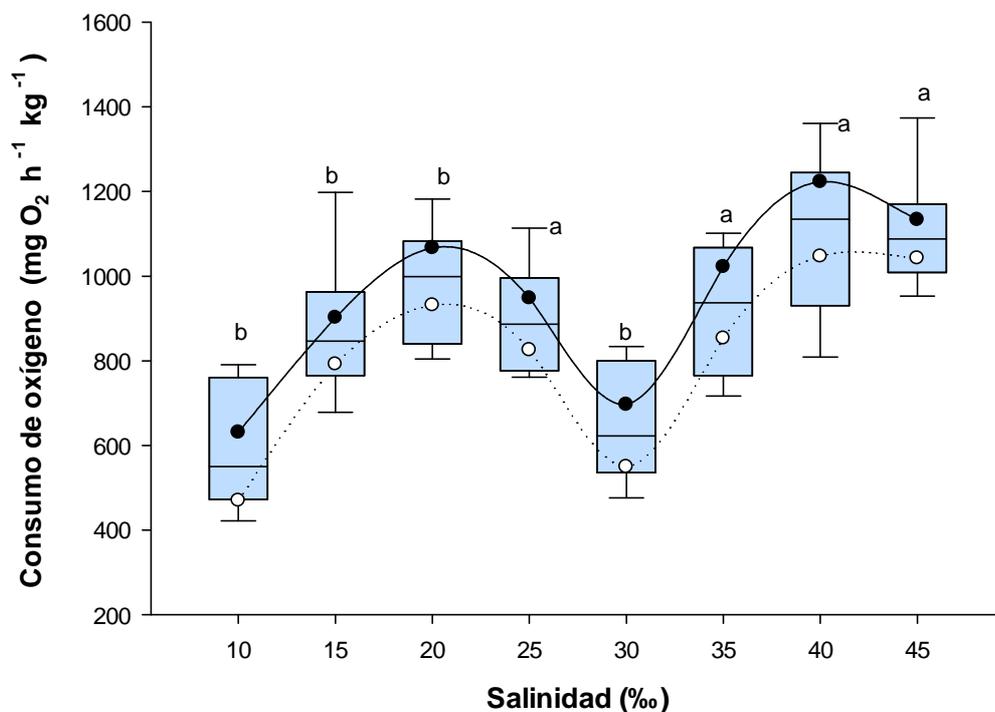


Figura 13.- Consumo de oxígeno de juveniles de pez payaso *Amphiprion ocellaris* aclimatados a diferentes salinidades: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, y 45 ups. La zona delimitada por puntos representa los intervalos de confianza de las medianas al 95%.

Tabla 5.- Comparación múltiple a posteriori de la tasa de consumo de oxígeno en *Amphiprion ocellaris* derivado del efecto de las diferentes salinidades (Prueba de Tukey).

CONSUMO DE OXÍGENO			
Comparación Salinidades (‰)	Diferencia de rangos	Q	P<0.05
45 vs 10	5167.00	12.336	Si
45 vs 30	4641.00	11.08	Si
45 vs 15	2431.00	5.804	Si
45 vs 25	2361.50	5.638	Si
40 vs 10	5164.50	12.33	Si
40 vs 30	4638.50	11.074	Si
40 vs 15	2428.50	5.798	Si
40 vs 25	2359.00	5.632	Si
20 vs 10	3938.50	9.403	Si
20 vs 30	3412.50	8.147	Si
35 vs 10	3374.50	8.056	Si
35 vs 30	2848.50	6.801	Si
25 vs 10	2805.50	6.698	Si
25 vs 30	2279.50	5.442	Si
15 vs 10	2736.00	6.532	Si
15 vs 30	2210.00	5.276	Si

Nota: En la tabla solo se muestran los resultados de las comparaciones con diferencias significativas.

8.2. Excreción de amonio

La tasa de excreción de amonio de los organismos aclimatados a diferentes salinidades presento los valores menores en la salinidad de 10 ups $72.187 \pm 2.213 \text{ mg NH}_4\text{h}^{-1}\text{kg}^{-1}$, incrementando la excreción en las salinidades intermedias (de 15 a 25ups), teniendo su punto máximo en 40 ups 495.401 ± 6.695 como se muestra en la Figura 11. La tasa de excreción de amonio fue afectada significativamente ($P < 0.050$) por la salinidad.

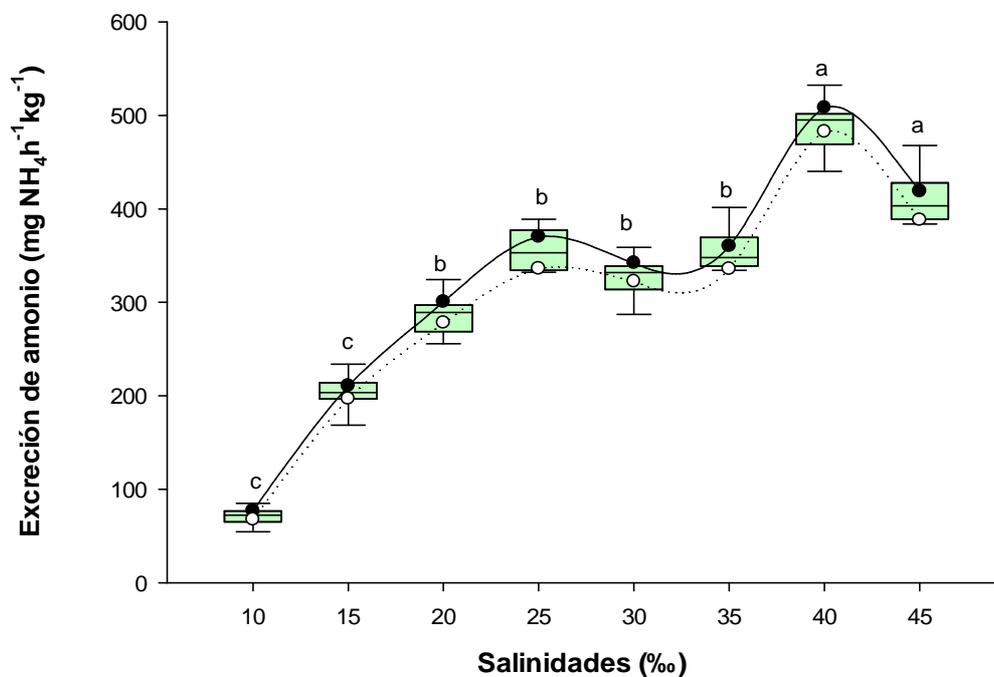


Figura 14.- Excreción de amonio ($\text{mg NH}_4\text{h}^{-1}\text{kg}^{-1}$) del pez payaso *Amphiprion ocellaris* aclimatados a diferentes salinidades: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, y 45 ups. Las cajas paralelas representan la totalidad de los datos divididos en cuartiles, mientras que la zona delimitada por puntos representa los intervalos de confianza de las medianas al 95%.

Tabla 6.- Comparación múltiple a posteriori de la tasa de excreción de amonio de *Amphiprion ocellaris* expuesto a diferentes salinidades (Prueba de Tukey).

EXCRECIÓN DE AMONIO			
Comparación Salinidades (‰)	Diferencia entre rangos	q	P<0.05
40 vs 10	1788	12.05	Si
40 vs 15	1532	10.325	Si
40 vs 20	1248	8.411	Si
40 vs 30	956	6.443	Si
40 vs 25	688	4.637	Si
40 vs 35	654	4.408	Si
45 vs 10	1518	10.231	Si
45 vs 15	1262	8.505	Si
45 vs 20	978	6.591	Si
45 vs 30	686	4.623	Si
35 vs 10	1134	7.643	Si
35 vs 15	878	5.917	Si
25 vs 10	1100	7.414	Si
25 vs 15	844	5.688	Si
30 vs 10	832	5.607	Si

Nota: En la tabla solo se muestran los resultados de las comparaciones con diferencias significativas

8.3. Relación atómica O: N

Los peces payaso *Amphiprion ocellaris* aclimatados a las diferentes salinidades (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, y 45 ups) utilizaron proteínas como sustrato metabólico en todas las salinidades ya que los valores se encuentran entre 2.246 ± 0.0901 y 9.428 ± 0.365 , mostrándose valores inferiores a 16. En la figura 15, se observan los valores más bajos en la salinidad de 30 ups, mientras que los más altos los encontramos en 10 ups. Sin embargo, no alcanzaron valores cercanos a 16 donde (Mayzaud & Conover, 1988), indica un sustrato de lípidos y carbohidratos.

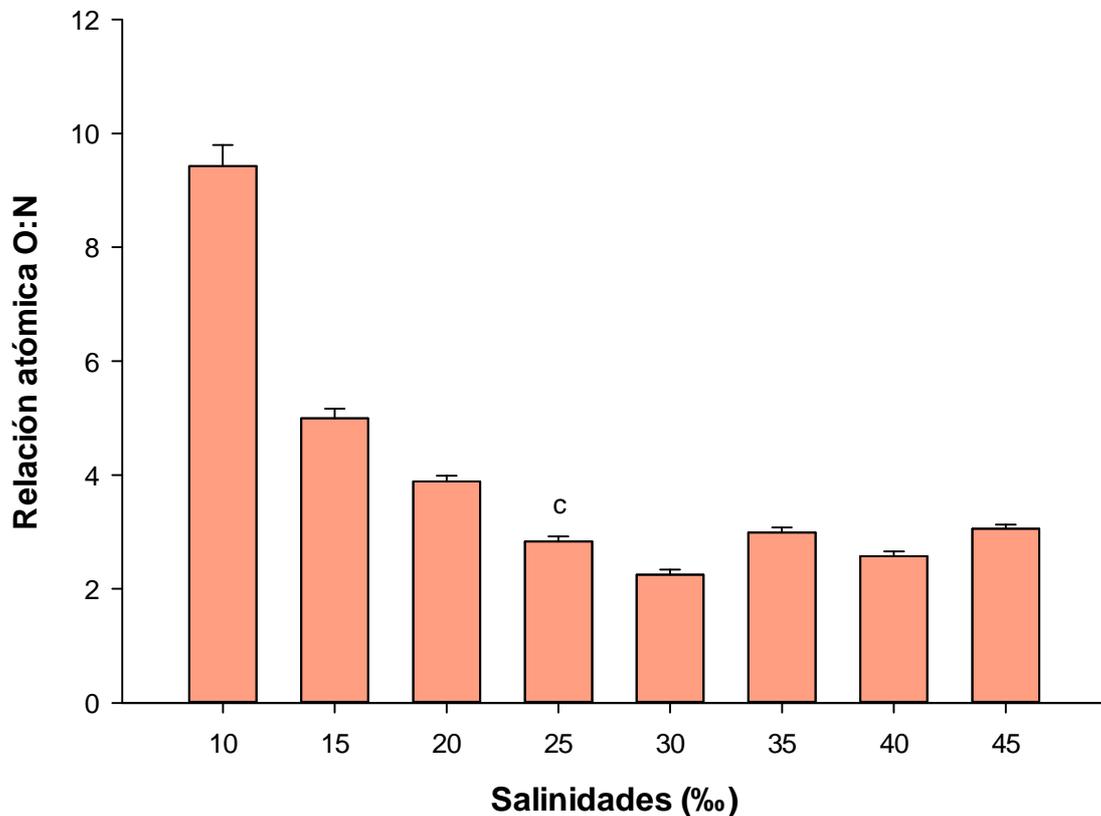


Figura 15.- Relación atómica O: N en *Amphiprion ocellaris* aclimatado a diferentes salinidades, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 ups.

8.4. Presión osmótica

En los organismos aclimatados a las diferentes salinidades, *Amphirpion ocellaris* la presión osmótica presentó una tendencia bien definida en las salinidades de 10 a 40 ups, con valores de 337 ± 4.728 a $457.917 \pm 7.643 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$, mientras que en la salinidad de 45 ups se tuvo el valor más alto de $628.083 \pm 18.445 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$.

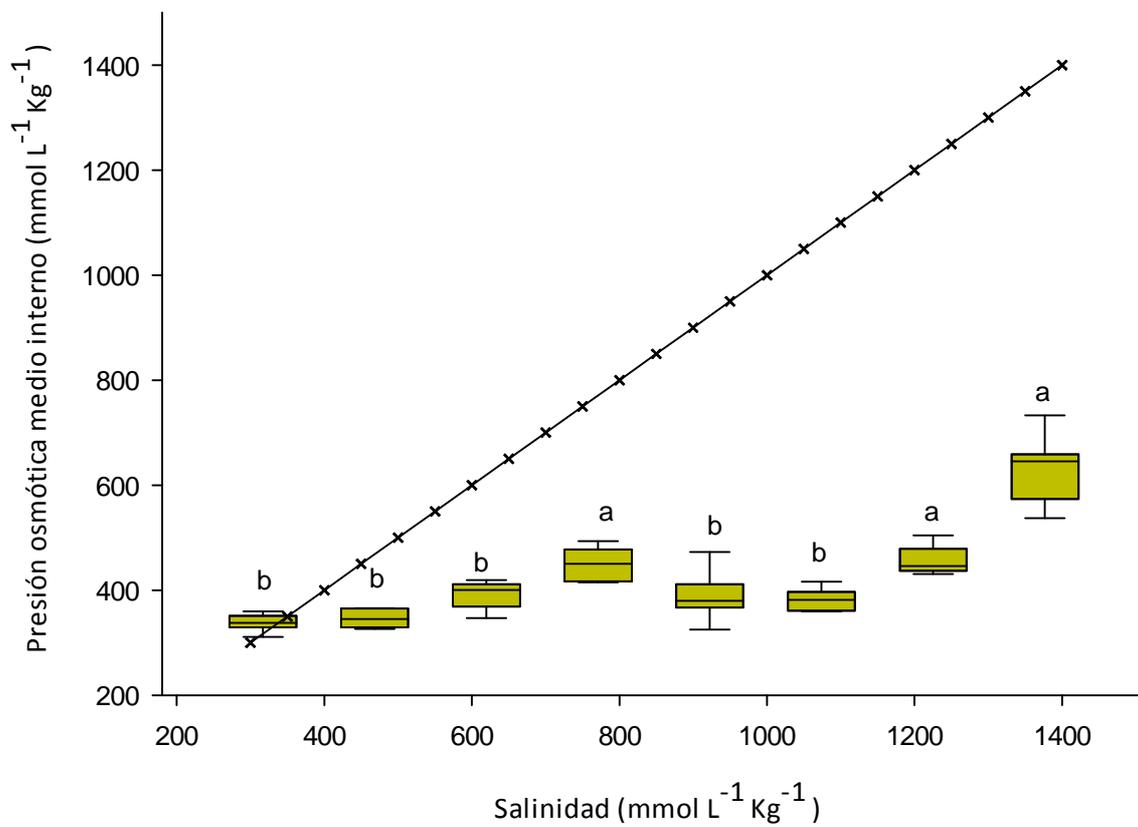


Figura 16.- Presión osmótica de *Amphirpion ocellaris* aclimatado a 29°C y salinidades de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 ups.

8.5. Capacidad osmorreguladora

La capacidad osmorreguladora de los organismos aclimatados a diferentes salinidades mostro valores negativos en la salinidad de 10 ups de -12.8340 cercano al punto isosmótico, mientras que en las demás salinidades presento valores positivos en un intervalo 114.3330 a 780.1670 mmol Kg^{-1} . En la gráfica 17 se observa que la capacidad osmorreguladora presenta una tendencia ascendente hacia las altas salinidades. Donde la máxima capacidad se observó en 40 ups.

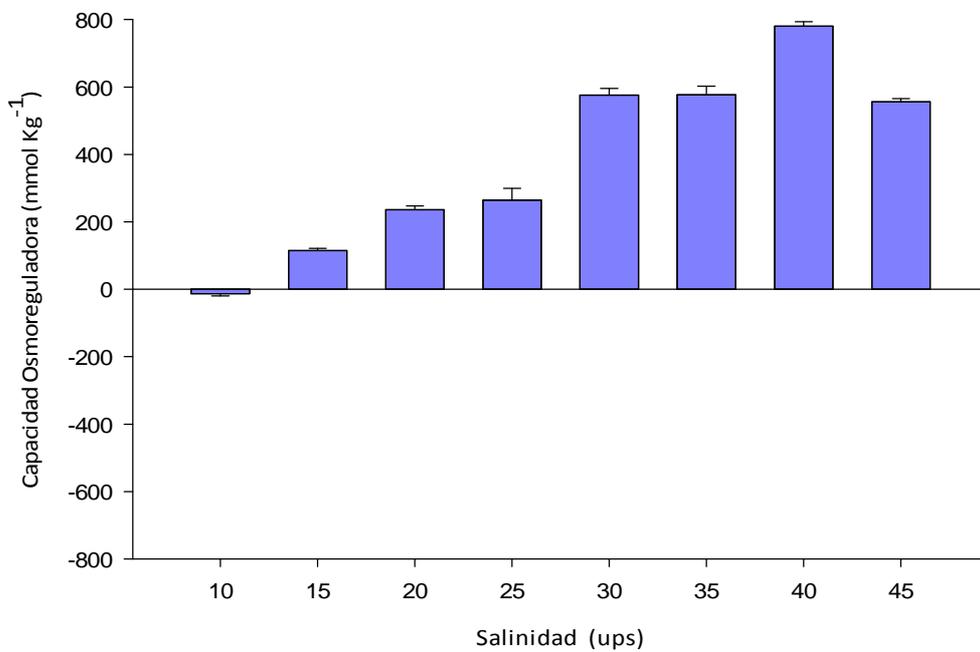


Figura 17.- Capacidad osmorreguladora encontrada en *Amphiprion ocellaris* aclimatados a diferentes salinidades, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 ups.

8.6. Campo de Actividad metabólica

8.6.1. Consumo de oxígeno

Los resultados de la TCO en las diferentes dietas experimentales a 23 °C se presentaron para la D1 valores de 1379.125 ± 260.88 , OT 1436.822 ± 293.90 y D2 993.189 ± 174.52 y $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ mientras que para 29 °C presentaron valores para D1 1399.485 ± 141.79 , OT 1619.86 ± 159.58 y D2 1533.639 ± 155.51 y $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$. Los valores mostrados son las medias \pm Error estándar. La temperatura afecta significativamente ($P < 0.05$) a los organismos alimentados con la dieta OT y D2, mientras que a los de la D1 no se vieron afectados significativamente.

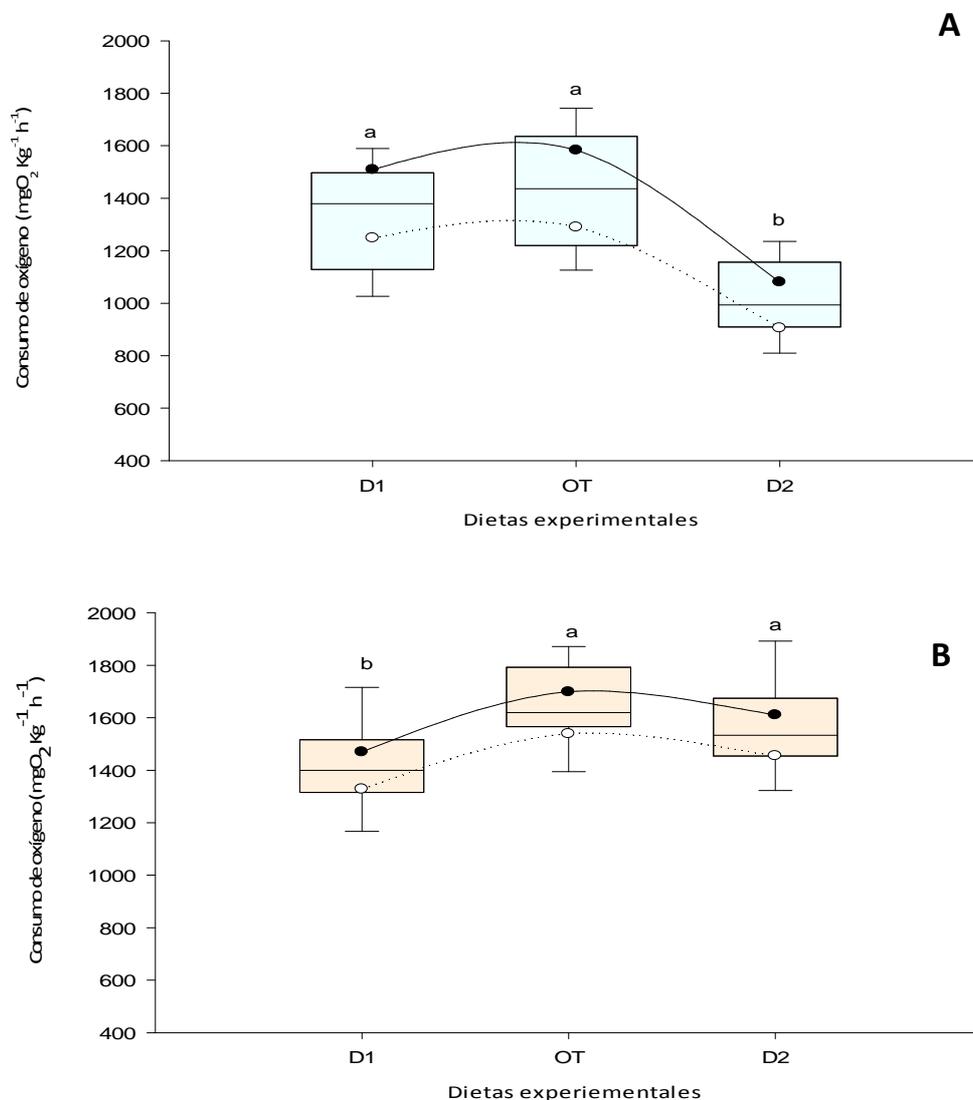


Figura 18.- Tasa de consumo de oxígeno (TCO) de *Amphiprion ocellaris* aclimatado a las temperaturas de 23°C (A) y 29°C (B), Las barras indican la distribución de los datos alrededor de la mediana, la línea central representa la mediana. Las zonas delimitadas por los puntos representan los intervalos de confianza de las medianas al 95%.

8.6.2. Excreción de amonio

Los resultados de la TEA en las diferentes dietas experimentales a 23 °C presentaron valores para la D1 477.639 ± 10.242 , OT 165.386 ± 5.107 , D2 343.036 ± 6.507 $\text{mg NH}_4^+ \text{h}^{-1} \text{kg}^{-1}$ mientras que para los organismos aclimatados a 29 °C se obtuvieron valores D1 146.697 ± 5.892 , OT 141.817 ± 6.152 y D2 343.492 ± 6.011 $\text{mg NH}_4^+ \text{h}^{-1} \text{kg}^{-1}$. Los valores mostrados son las medias \pm Error estándar. La temperatura afecta significativamente ($P < 0.05$) a los organismos de la dieta D1 y OT, mientras que los de la dieta D2 no fueron afectados significativamente.

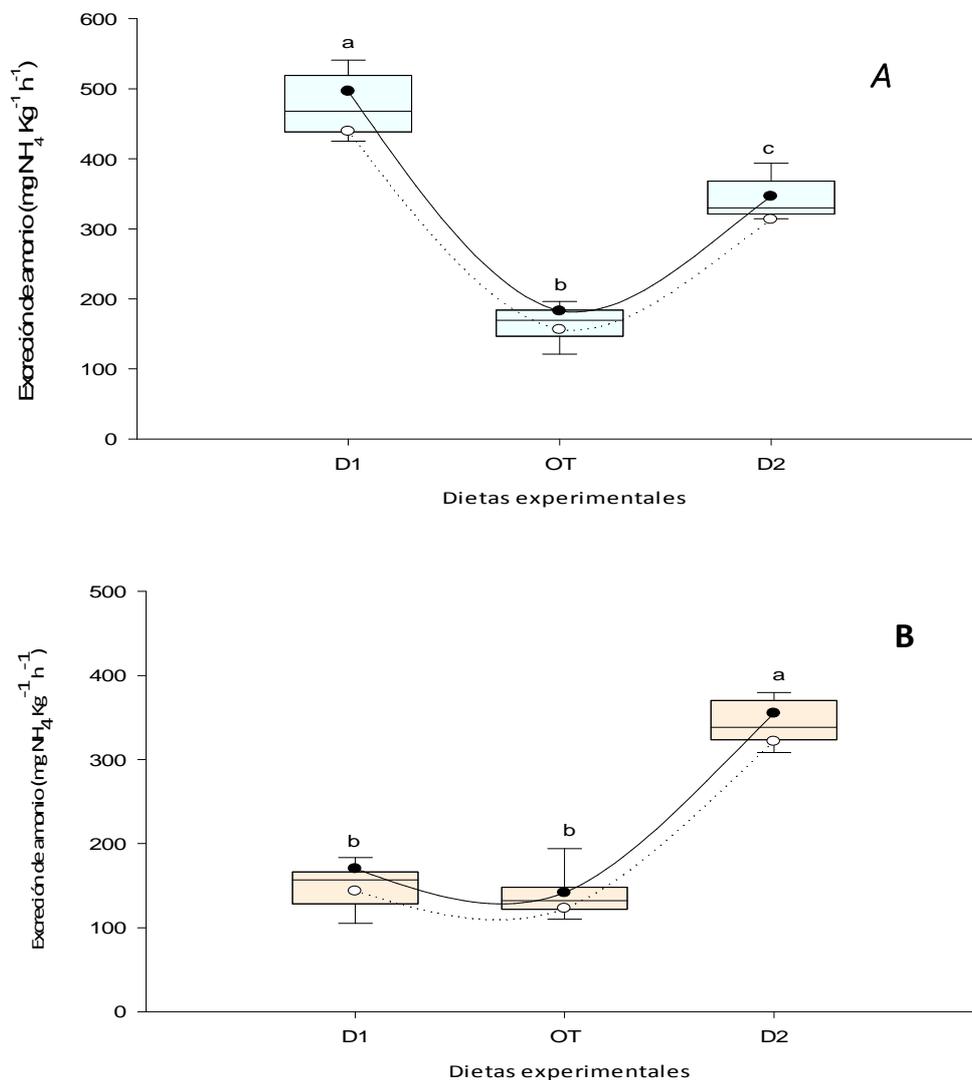


Figura 19.- Excreción de Amonio ($\text{mg NH}_4^+ \text{h}^{-1} \text{kg}^{-1}$) de *Amphiprion ocellaris* aclimatado a las temperaturas de 23°C (A) y 29°C (B) evaluando 3 diferentes dietas. Las barras indican la distribución de los datos alrededor de la mediana, la línea central representa la mediana. Las zonas delimitadas por los puntos representan los intervalos de confianza de las medianas al 95%.

8.6.3. Relación O: N

Los organismos aclimatados a 23 °C (Figura 20 A) y 29 °C (Figura 20 B) utilizaron en ambos casos proteínas como sustrato metabólico, ya que presentaron valores de entre 3.1970 ± 0.123 y 13.3900 ± 0.437 mostrando valores inferiores a 16 en ambas temperaturas. La temperatura afecta significativamente la relación O: N en todas las dietas.

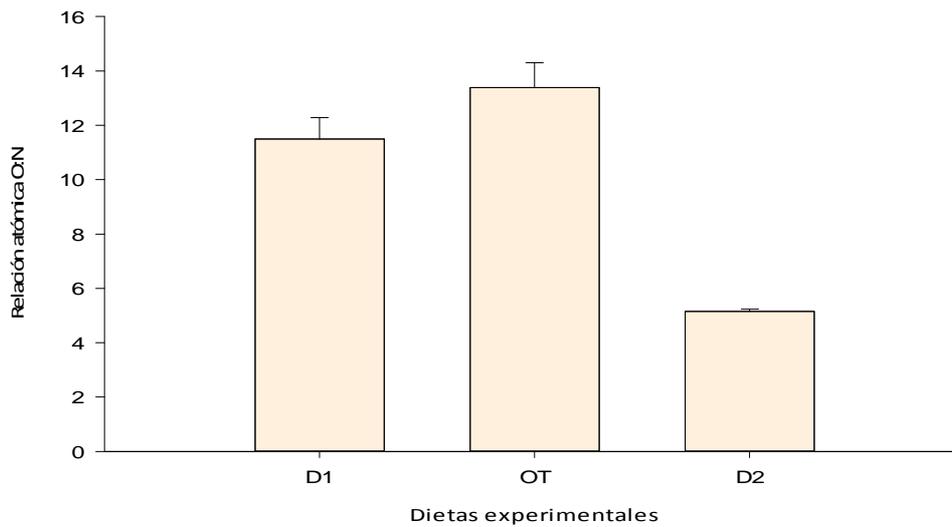
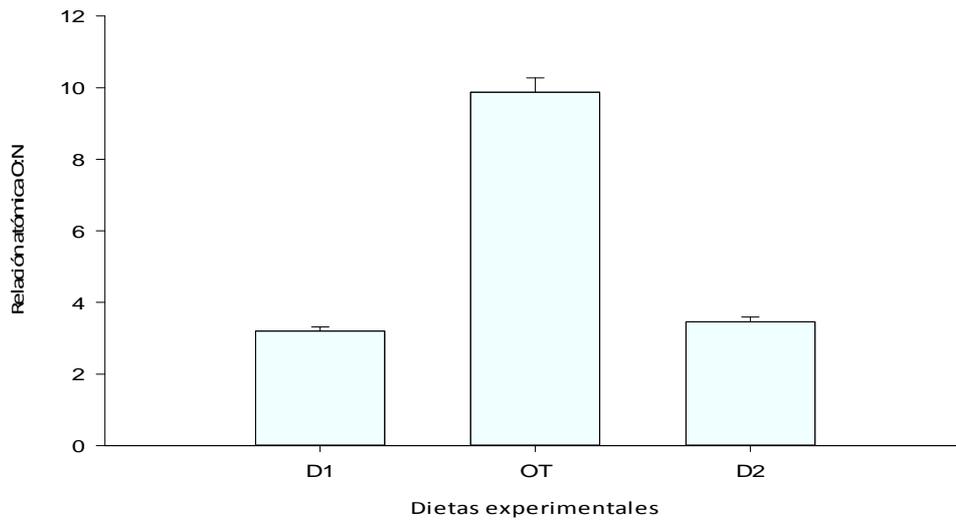


Figura 20.- Relación atómica O: N en *Amphiprion ocellaris* aclimatado a 23°C (A) y 29°C (B) evaluando 3 diferentes dietas.

8.6.4. TIMR

Para el TIMR (Temperature Induction Metabolic Rate) de *Amphiprion ocellaris* a 29°C se obtuvieron los siguientes valores, para TIMRmin de la D1 88.189 ± 99.09 , OT 557.2950 ± 23.169 y D2 820.6390 ± 43.564 $\text{mgO}_2\text{h}^{-1}\text{Kg}^{-1}\text{p.h}$, mientras que para TIMRmax valores de D1 1859.217 ± 75.24 , OT 1688.102 ± 73.542 y D2 1864.769 ± 136.710 . La temperatura 23 °C mostró valores para TIMRmin de D1 629.076 ± 28.038 OT 603.730 ± 78.517 y D2 699.413 ± 28.038 $\text{mgO}_2\text{h}^{-1}\text{Kg}^{-1}\text{p.h}$, mientras que para TIMRmax se obtuvieron para D1 2105.131 ± 287.619 , OT 2453.113 ± 206.813 y D2 2813.315 ± 287.339 $\text{mgO}_2\text{h}^{-1}\text{Kg}^{-1}\text{p.h}$.

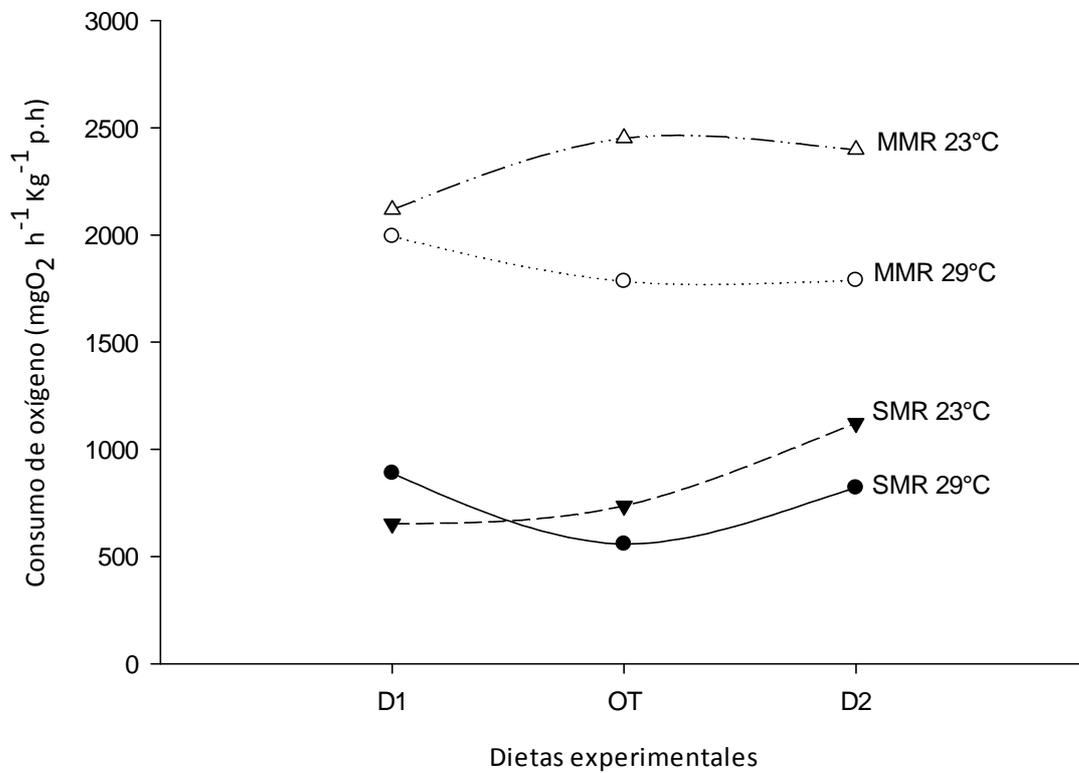


Figura 21.- Valores obtenidos para la tasa metabólica estándar (SSM) y la tasa metabólica máxima (MMR) de *Amphiprion ocellaris* aclimatado a 2 temperaturas diferentes (23 °C y 29 °C) alimentado con 3 dietas experimentales (D1, OT y D2).

8.6.5. CAM

Se utilizaron los consumos de oxígeno obtenidos en los experimentos de TIMRMax y TIMRMin para obtener el campo de actividad metabólico (CAM) de *Amphiprion ocellaris*. El CAM se obtuvo de la diferencia entre la tasa metabólica aeróbica máxima (MMR) y la tasa metabólica estándar (SMR) con los cuales se obtuvieron los siguientes datos para cada dieta. La temperatura no afecta significativamente ($P=0.059$) el Campo de actividad metabólica. En ambas temperaturas la dieta OT mostro mayor amplitud que las otras.

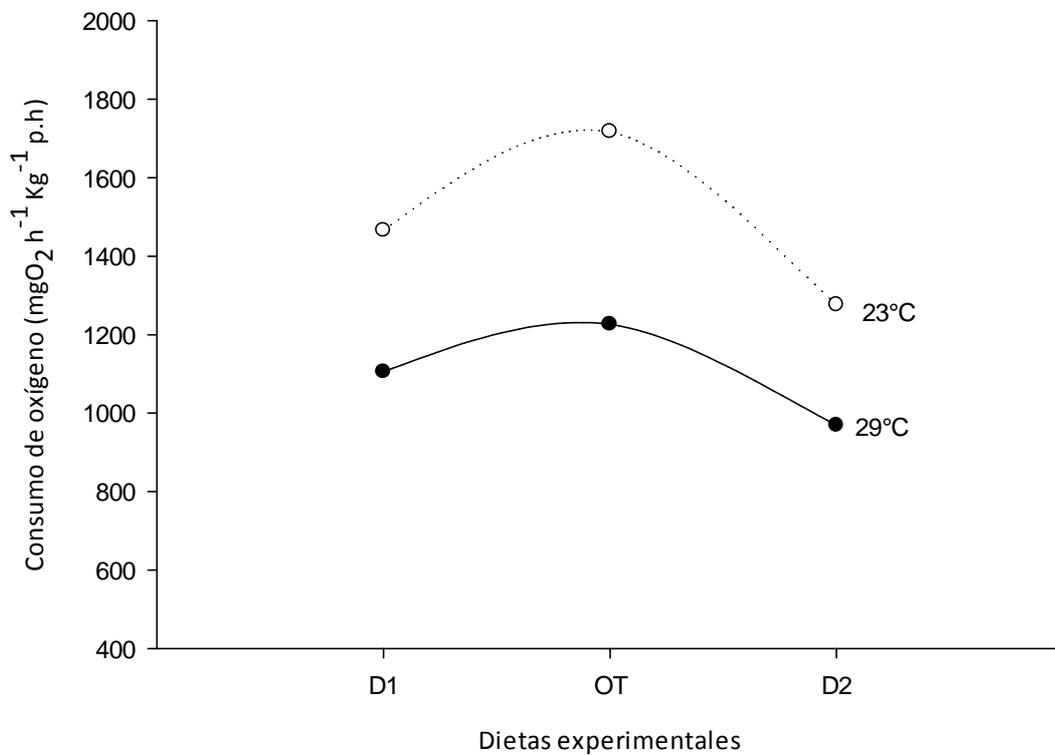


Figura 22.- Campo de actividad metabólico mostrado por *Amphiprion ocellaris* alimentados con tres diferentes dietas (D1, OT, D2) en dos temperaturas distintas (23 °C y 29 °C)

8.6.6. Incremento Aparente de Calor (IAC)

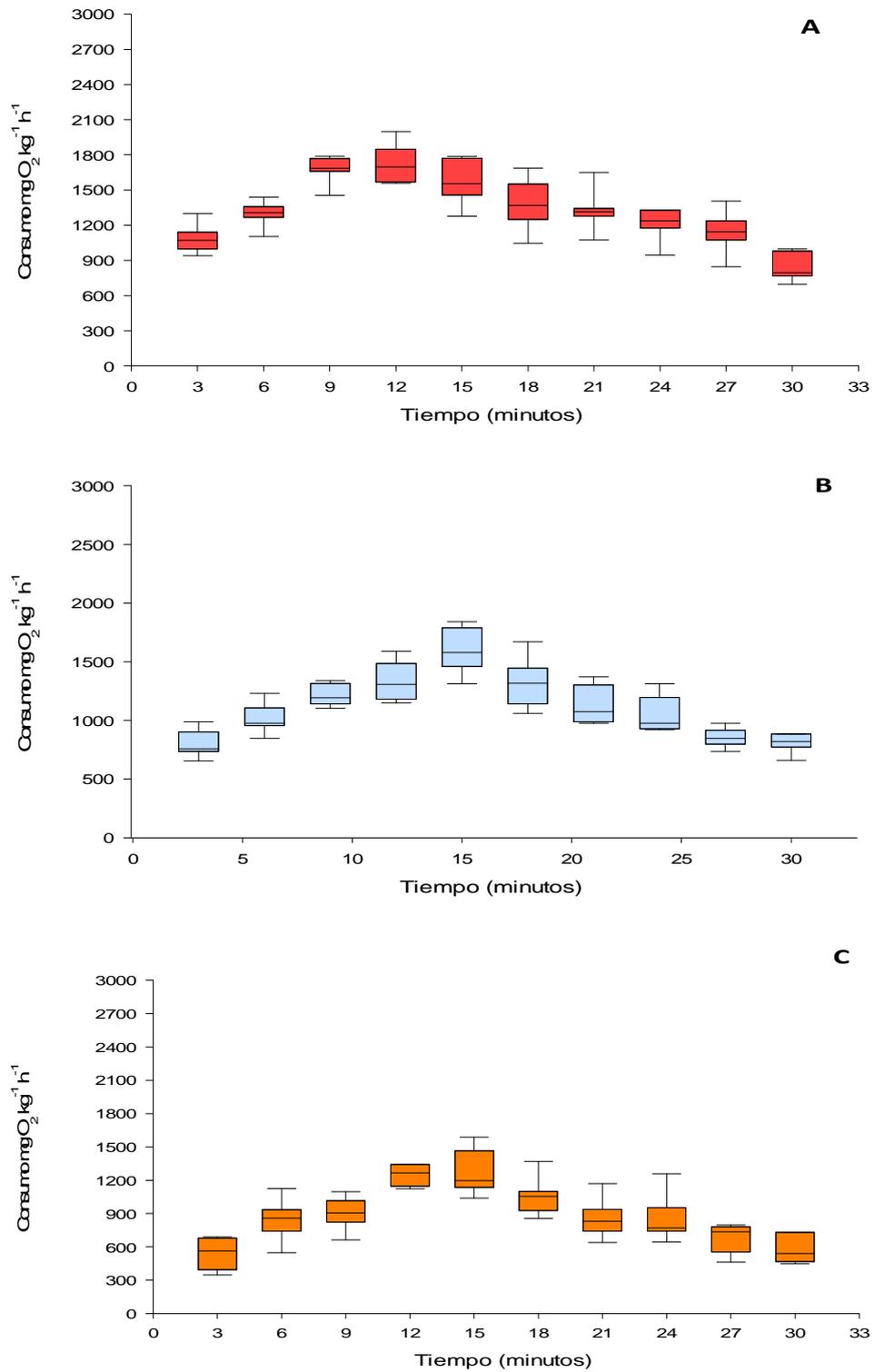


Figura 23.- Incremento aparente de Calor (IAC) de *Amphiprion ocellaris* alimentados con tres diferentes dietas (A) D1, (B) OT y (C) D2) a 23 °C

Los organismos aclimatados a 23 °C (figura 23) y recién alimentados con las dietas mostraron el pico máximo para el consumo de oxígeno en la D1 ($1725.30 \pm 38.127 \text{ mgO}_2 \text{ h}^{-1}\text{Kg}^{-1}\text{p.h.}$) a los 12 minutos de la ingesta incrementando su consumo en un 23 %, para OT el pico máximo de consumo de oxígeno ($1582.532 \pm 46.714 \text{ mgO}_2 \text{ h}^{-1}\text{Kg}^{-1}\text{p.h.}$) se presentó a los 15 minutos de la ingesta de alimento incrementando su consumo en un 10.60% , para la D2 el pico máximo ($1478.179 \pm 30.005 \text{ mgO}_2 \text{ h}^{-1}\text{Kg}^{-1}\text{p.h.}$) se presentó a los 15 minutos con un incremento en el consumo de 44%

En la figura 24 se muestran los resultados obtenidos para los organismos aclimatados a 29 °C recién alimentados con las tres dietas experimentales, mostrando los siguientes valores: para la D1 *Amphiprion ocellaris* mostraron el pico máximo en su consumo de oxígeno ($1273.531 \pm 45.171 \text{ mgO}_2 \text{ h}^{-1}\text{Kg}^{-1}\text{p.h.}$) a los 15 minutos, para OT presentaron su pico máximo ($1935.377 \pm 57.05 \text{ mgO}_2 \text{ h}^{-1}\text{Kg}^{-1}\text{p.h.}$) a los 12 minutos con un incremento en su consumo de 17.39%, en la dieta D2 presentaron su pico máximo ($1352.579 \pm 24.754 \text{ mgO}_2 \text{ h}^{-1}\text{Kg}^{-1}\text{p.h.}$) al igual que OT a los 12 minutos después de la ingesta.

Para la dieta D1 y D2 de la temperatura de 29 no mostraron un incremento en el consumo después de la ingesta de alimento, debido a que el tiempo transcurrido entre la medición de los consumos fue demasiado.

Tabla 7.- Consumos de los organismos *Amphiprion ocellaris* sin ingesta de alimento (CO normal) y después de administrarles alimento (IAC)

DIETA	23 °C			29 °C		
	CO Normal $\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1}\text{Kg}^{-1}\text{p.h.}$	IAC $\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1}\text{Kg}^{-1}\text{p.h.}$	Diferencia (CO-IAC) (%)	CO Normal $\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1}\text{Kg}^{-1}\text{p.h.}$	AIC $\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1}\text{Kg}^{-1}\text{p.h.}$	Diferencia (CO-IAC) (%)
D1	1351.323	1725.300	373.977 (23%)	1425.034	1273.531	-151.503
OT	1430.776	1582.532	151.756 (10.60%)	1648.561	1935.377	286.816 (17.39%)
D2	1007.003	1458.179	451.176 (44%)	1571.965	1352.579	-219.386*

Nota: Los organismos utilizados en estos experimentos diferían de tamaño con respecto a los demás.

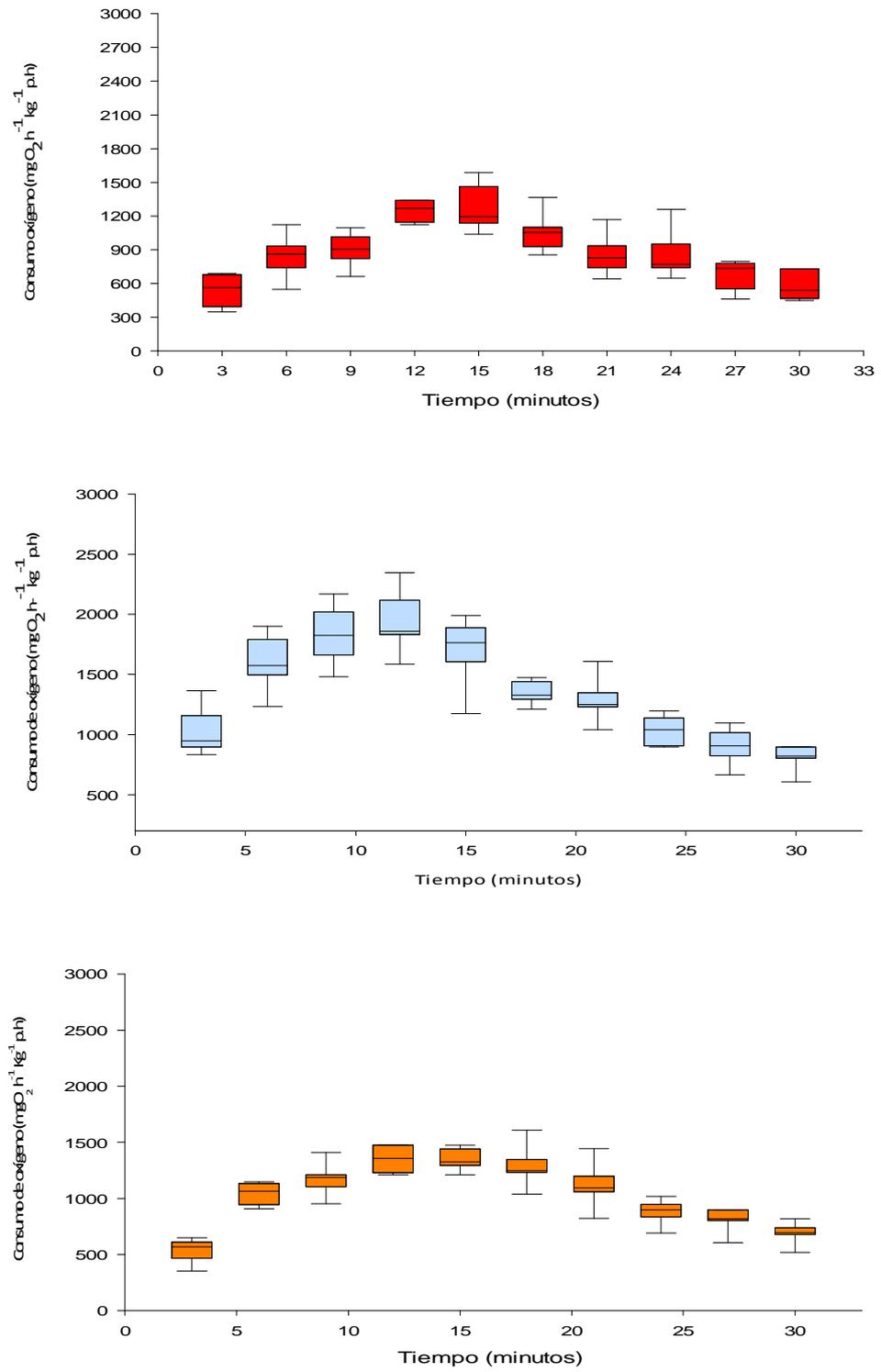


Figura 24.- Incremento aparente de Calor (IAC) de *Amphiprion ocellaris* alimentados con tres diferentes dietas (D1, OT y D2) a 29 °C.

Tabla 8.- Respuesta metabólica de *Amphiprion ocellaris* con tres dietas diferentes a 2 temperaturas diferentes.

TEMPERATURA	TRATAMIENTO (DIETA)	IAC	CO	EA
		$\text{MGO}_2 \text{H}^{-1} \text{KG}^{-1} \text{P.H}$	$\text{MGO}_2 \text{H}^{-1} \text{KG}^{-1} \text{P.H}$	$\text{MG NH}_4^+ \text{H}^{-1} \text{KG}^{-1}$
23 °C	D1	346.175	1351.323 ± 44.22	477.639 ± 10.242
	OT	145.71	1430.776 ± 50.507	165.386 ± 5.107
	D2	464.99	1007.003 ± 35.872	343.036 ± 6.507
29 °C	D1	-125.954*	1425.034 ± 37.938	146.697 ± 5.892
	OT	315.517	1648.561 ± 33.523	141.817 ± 6.152
	D2	-181.06*	1571.965 ± 41.493	343.492 ± 6.011

Al conocer las tasas fisiológicas, así como sus equivalentes energéticos, es posible utilizar la ecuación de balance energético para obtener la energía potencial de crecimiento, es decir el campo de crecimiento para organismos que presentan un gran potencial acuícola, como es el caso de *Amphiprion ocellaris*.

8.6.7. Crecimiento

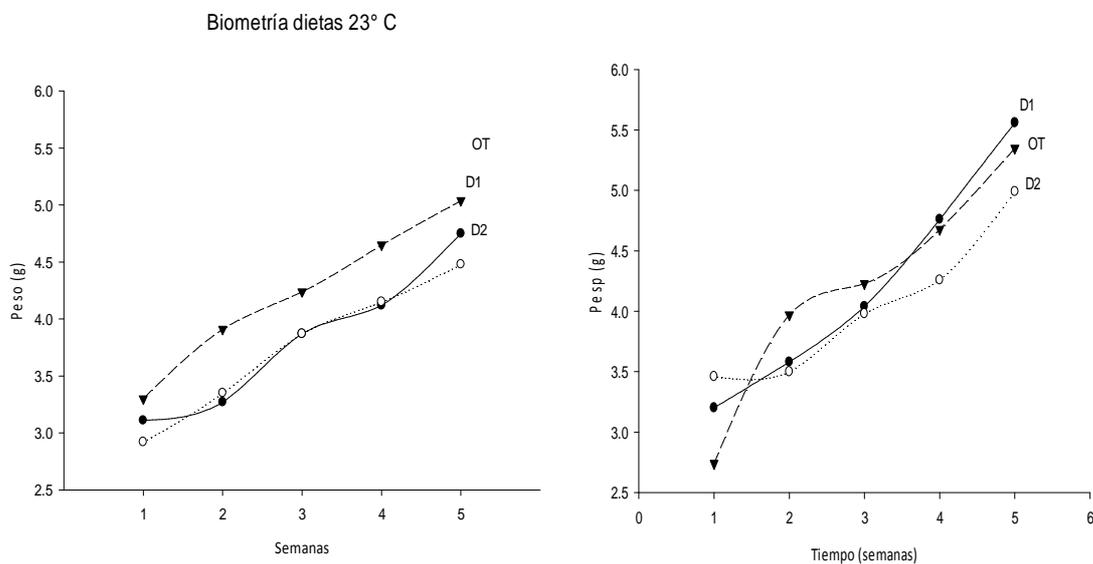


Figura 25.- Crecimiento mostrado por los juveniles de *Amphiprion ocellaris*, durante el tiempo de experimentación (5 semanas) aclimatado a (A) 23°C y (B) 29°C y suministrándoles tres dietas diferentes.

9. Discusión

Se requiere de una serie de estudios multidisciplinarios para generar la tecnología necesaria para realizar un cultivo favorable y exitoso del pez payaso *Amphiprion ocellaris*, para esto es necesario recabar información importante que establezca los parámetros óptimos en donde el desarrollo y crecimiento del organismo sean los esperados. Los estudios fisiológicos aportan dicha información, ya que los efectos de la salinidad sobre el consumo de oxígeno se ven reflejados en la tasa metabólica, ya que al medir la tasa de consumo de oxígeno en función de la salinidad nos proporciona información de los costos energéticos que enfrentan los organismos al someterlos a salinidades variables (Zheng *et al.*, 2008).

Los factores abióticos más importantes que influyen en el metabolismo de los organismos acuáticos son la salinidad y la temperatura, tanto los cambios en la salinidad como en la temperatura del medio externo, modifican directamente los mecanismos de osmorregulación en los organismos, reflejándose en el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada (Zheng *et al.*, 2008; Salvato *et al.*, 2001).

En *Amphiprion ocellaris* se tiene una serie de estudios relacionados con desarrollo embrionario (Wilkerson, 1998. Satheesh, 2002. Olivott., et al 2003), pero no hay estudios sobre los efectos de la salinidad en la TCO, TEA, Presión osmótica y relación O: N, los cuales podrían demostrar las consecuencias energéticas para el éxito en cultivos posteriores.

En el 2010, Pérez-Robles menciona cuatro respuestas fisiológicas relacionadas con la salinidad descritas en 1967 por Kinne: (1) la tasa de consumo de oxígeno no es influenciada por la salinidad, (2) la tasa metabólica de los organismos se incrementa en salinidades reducidas y disminuye en salinidades altas, (3) la tasa metabólica se incrementa tanto en salinidades altas como en bajas, y (4) la tasa de consumo de oxígeno disminuye en bajas como en altas salinidades. En el presente trabajo fue posible observar que los cambios en la salinidad influyen significativamente en la TCO y TEA, en *Amphiprion ocellaris*. Obteniendo el menor consumo en salinidades bajas (10 ups), incrementando el consumo con el aumento de la salinidad, de acuerdo a lo mencionado por Kinne *Amphiprion ocellaris* mostró una respuesta de tipo 4.

Al igual que en la TCO la salinidad ejerció un efecto significativo en la TEA en el pez payaso *Amphiprion ocellaris*. Mostrando menor excreción en salinidades inferiores (10ups), incrementándose en las salinidades superiores.

La relación atómica O: N, es la integración del consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada. Es un indicador de la utilización de sustrato energético por parte de los organismos. Valores de 3 a 16 indican un catabolismo de proteínas, valores de 50 a 60 indican un catabolismo mixto de proteínas y lípidos, valores mayores a 60 indican la utilización de carbohidratos como fuente principal de energía de carbohidratos. (Mayzaud, & Conover, 1988).

Algunos teleosteos como el Bacalao del Atlantico (*Gadus morhua*) y Rodaballo (*Scophthalmus maximus*) presentaron mayor eficiencia de conversión alimenticia y crecimiento, cuando fueron cultivados en ambientes isosmóticos (Imsland et al., 2001). Según Boeuf y Payan (2001) algunas especies han mostrado un crecimiento mas rapido cuando son criadas en aguas salobres. Esto es atribuido al menor costo energetico aplicado a la osmorregulación. Concluyendo que los peces marinos muestran mayor crecimiento en salinades bajas, mientras que los peces de agua dulce a salinades altas.

Amphiprion ocellaris mostró su punto isosmótico en 10 ups similar al encontrado en otras especies como *P. orbignyanus* en donde se estimó en $328.6 \text{ mOsm Kg}^{-1}$ (10.9 ups). Este valor es similar al estimado para otros peces teleósteos euryhalinos como *S. annulatus* en donde el valor encontrado fue de 356 mOsm kg^{-1} (10.5 ups) mencionando que la osmolaridad del plasma está relacionada de manera lineal con salinidad (Pérez, 2010),

Sampaio y Branchini (2002) mencionan que la osmolaridad de *P. orbignyanus* cuando se aclimató a 40 ups su osmolaridad plasmática fue de $370 \text{ mOsm Kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$, lo cual según lo descrito por Jobling (1995) fue equivalente al límite inferior para los teleósteos marinos, por el contrario, cuando fue aclimatada a agua dulce su osmolaridad fue de $321 \text{ mOsm Kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$, lo cual indica que estuvo cerca del límite superior para peces de agua dulce.

Tomando en cuenta que Jobling sugiere que los teleósteos marinos estenohalinos oscilan entre los 370 y $480 \text{ mOsm Kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$, mientras para los estenohalinos de agua dulce este valor oscila entre 260 y $330 \text{ mOsm Kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$. Esto sugirió que el rango de salinidad probado para este organismo en un periodo corto de tiempo pudiese confirmar su fisiología eurihalina.

Otros autores describen el punto isosmótico de algunos teleósteos marinos como: *Oncorhynchus kisutch*, *Pomacanthus imperator*, *Scophthalmus maximus*, entre otros, en salinidades de 10 a 14 ups (Morgan & Iwama, 1998; Woo & Chung, 1995; Gaumet, et al., 1995). Según Laiz-Carrión & Cols (2005) muchos autores han demostrado la influencia de la salinidad ambiental sobre el crecimiento de los teleósteos eurihalinos de interés en acuicultura entre ellos los juveniles de *Sparus auratus* que presentan un mejor crecimiento en las salinidades intermedias (12 ups), cercanas al punto isoosmótico del medio interno de esta especie, en comparación con el agua del mar (38 ups) o el agua salobre (6 ups).

Jobling (1994) señala que el consumo de oxígeno es uno de los perfiles fisiológicos más útiles para estimar los requerimientos nutricionales de los peces, ya que representa la tasa del metabolismo energético. Ya que el consumo de oxígeno es un factor que indica la cantidad de energía consumida (Rosas, et al., 1997, Re & Díaz, 2011).

Clarke, A., & Johnston (1999) encontraron que el consumo basal o de reposo de los teleósteos variaba significativamente con la temperatura, lo cual indicaba que un pez tropical (30°C) consume aproximadamente 6 veces más oxígeno que un pez polar típico (0 °C), esta aseveración coincide con los valores encontrados en los organismos expuestos a diferentes temperaturas con incluso 6 grados de diferencia.

Rosas et al (1992a) describe que la energía contenida en el alimento debe dirigirse al crecimiento óptimo de los peces, y para esto es necesario contar las demandas de energía metabólica que permitan el mantenimiento de la homeostasis. Para determinar cuánta energía metabólica se requiere para los procesos metabólicos se mide la TCO ya que el oxígeno es el último aceptor en la cadena respiratoria, por lo que puede usarse de manera directa para determinar la cantidad de energía que se utiliza en una situación ambiental particular. El efecto de la alimentación sobre el consumo de oxígeno es ya conocido, y resulta en un incremento de la tasa de consumo. Tomando como principales características del consumo postprandial la velocidad de aumento, magnitud total de la respuesta y duración de dicha respuesta.

Jobling (1981) sugiere que la tasa máxima de consumo de oxígeno inducida por la alimentación parece ser el doble que la tasa baja de rutina para muchas especies investigadas.

Bouef y Payan, (2001) señalan que la existencia de un mayor crecimiento en una determinada salinidad puede ser debida a distintos factores como la existencia de una tasa metabólica estándar menor, un aumento de la ingestión de alimento o de la eficacia en la conversión del mismo, y una estimulación hormonal, de esta forma, la salinidad óptima de cultivo, aparentemente, va a depender de la especie estudiada,

Es necesario determinar la cantidad de energía invertida en las transformaciones mecánicas y bioquímicas de la alimentación ingerida para tener un equilibrio adecuado entre la energía metabólica que entra en el cuerpo a partir de la alimentación y la energía asimilada. Conocido como incremento aparente de calor (IAC), donde las alteraciones producidas por la alimentación son seguidas durante el proceso de digestión (Beamish y Trippel, 1990).

Jha et al (2012) menciona que los efectos de los carotenoides sobre el crecimiento y la supervivencia de los animales acuáticos son controvertidos. Muchos estudios sobre el efecto de la incorporación de carotenoides en las dietas de los peces como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), el salmón del atlántico (*Salmo salar*), goldfish (*Carassius auratus*) y Tetra serpae (*Hyphessobrycon callistus*) han mostrado efectos positivos sobre el crecimiento y la supervivencia de los peces. (Christiansen et al., 1995; De la Mora et al., 2006; Sinha y Asimi, 2007; Pan et Al., 2010).

Otros estudios realizados para evaluar los efectos de los carotenoides en la dieta de peces como el pargo (*Pagrus auratus* y *Pagrus pagrus*) (Chatzifotis et al., 2005, Kalinowsky et al., 2005), tetra serpae (*Hyphessobrycon callistus*) (Wang et al., 2006), Cichlasoma severum (Kop et al., 2010), y de peces ornamentales marinos como (*Amphiprion ocellaris*) (Ramamoorthy et al., 2010) no mostraron efectos significativos sobre el crecimiento y la supervivencia en comparación con los peces alimentados con dieta de control.

Los estudios correspondientes al campo de actividad metabólico (CAM) a la fecha se han realizado en su mayoría en peces polares como *Macrozoarces americanus*, *Cyclopterus lumpus*, *Myoxocephalus Scorpius*, *Pagothenia borchgrevinki*, *Oncorhynchus nerka*, *Salmo trutta*, *Carassius auratus*, *Fundulus heteroclitus*, *Gadus morhua*, *Oncorhynchus mykissin* (Fry, et al., 1942 ;Tytler & Calow, 1985; Forster, et al., 1987; Pörtner & Knust, 2007; Farrell, et al., 2008; Eliason, et al., 2011; Auer et al.,2015; Holt & Jørgensen, 2015; Brennan, et al., 2016; Rab, et al., 2016). Actualmente en especies tropicales no se tiene mucha información o no es extenso.

Hay estudios que muestran una relación entre la amplitud o el tamaño del campo en relación a la alimentación, es decir, en una mejor dieta los organismos tienden a un mejor desempeño, y su Campo aeróbico aumenta (Auer, et al., 2015).

Sokolova (2013) asegura que centrarse en los efectos bioenergéticos de los factores de estrés ambientales y sus consecuencias inmediatas para la aptitud proporciona un marco adecuado para integrar la fisiología y la ecología funcional y puede ayudar a comprender las fuerzas motrices y limitaciones de la adaptación ambiental y mejorar la evaluación del riesgo ecológico, En poblaciones de campo que enfrentan múltiples factores de estrés

10. Conclusión

La TCO de los organismos aclimatados a diferentes salinidades fue afectada significativamente por la salinidad, mostrando menor consumo en los organismos aclimatados a 10 ups y 30 ups.

La excreción e amonio de *Amphiprion ocellaris* fue afectada significativamente por la salinidad. Observando que los organismos expuestos a las salinidades bajas mostraron menor consumo en 10 ups y el máximo consumo en 40 ups.

Se evaluó la presión osmótica asociada a los organismos después de ser expuestos diferentes salinidades, donde se encontró que el valor más bajo fue en la salinidad correspondiente a 10 ups, en donde presento su punto isoosmótico.

La capacidad osmorreguladora que mostro *Amphiprion ocellaris* al ser expuesto a diferentes salinidades tuvo un patrón de fuerte osmorregulador.

Con la medición de TIRMmax y TIRMmin se calculó el Campo de Actividad Metabólica (CAM) de *Amphiprion ocellaris* asociado a tres dietas, mostrando el máximo de actividad metabólica Inducida por la temperatura en los organismos de la dieta OT.

En IAC en *Amphiprion ocellaris* el pico máximo en el consumo de oxígeno se presentó entre los 12-15 minutos después de la ingesta del alimento en todas dietas, en ambas temperaturas.

Literatura citada

- Ackerman, P. A., Forsyth, R. B., Mazur, C. F., & Iwama, G. K. (2000). Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. *Fish Physiology and Biochemistry*, 23(4), 327-336.
- Allen, G. R. (1972). *The Anemonefishes: Their classification and Biology*, T.F.H. Public. Neptune City., New Jersey, 286pp.
- Altinok, I., & Grizzle, J. M. (2003). Effects of low salinities on oxygen consumption of selected euryhaline and stenohaline freshwater fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34(1), 113-117.
- Allen, G.R., 1991. *Damselfishes of the world*. Mergus Publishers, Melle, Germany. 271 p.
- Andrews C (1990). The ornamental fish trade and fish conservation. *Journal of Fish Biology*, 37 (Supplement A), 53-59.
- Arjona, F. J., Vargas-Chacoff, L., Ruiz-Jarabo, I., Gonçalves, O., Páscoa, I., del Río, M. P. M., & Mancera, J. M. (2009). Tertiary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) to osmotic challenge: implications for osmoregulation, energy metabolism and growth. *Aquaculture*, 287(3), 419-426.
- Armstrong, D. A., (1979). Nitrogen toxicity to crustacea and aspects of its dynamics in culture systems. En: *Proceedings of the Second Bional Crustacean Health Workshop*. Texas A & M University. 329-360.
- Auer, S.K, Salin, K., Rudolf, A.M., Anderson, G.J. and Metcalfe, N.B. (2015) The optimal combination of standard metabolic rate and aerobic scope for somatic growth depends on food availability. *Functional Ecology*, Vol. 29, 479–486 doi: 10.1111/1365-2435.12396
- Avella, M. A., Olivotto, I., Gioacchini, G., Maradonna, F., & Carnevali, O. (2007). The role of fatty acids enrichments in the larviculture of false percula clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Aquaculture*, 273(1), 87-95.
- Best B. (2000). Trade in coral reef animals, algae and products: an overview. In: *Proceedings of the 9th International Coral Reef Symposium*, Bali, Indonesia.
- Brennan, R.S., Hwang, R., Tse, M., Fangue, N.A., Whitehead, A. (2016) Local adaptation to osmotic environment in killifish, *Fundulus heteroclitus*, is supported by divergence in swimming performance but not by differences in excess post-exercise oxygen consumption or aerobic scope. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. Vol.196:11-19.
- Boeuf, G., Payan, P., (2001). How should salinity influence fish growth? *Comp. Biochem. Phys. C* 130, 411–423.
- Booth, M. A., Warner-Smith, R. J., Allan, G. L., & Glencross, B. D. (2004). Effects of dietary astaxanthin source and light manipulation on the skin colour of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801). *Aquaculture Research*, 35(5), 458-464.
- Brougher, D. S., Douglass, L. W., & Soares, J. H. (2005). Comparative Oxygen Consumption and Metabolism of Striped Bass *Morone saxatilis* and its Hybrid *M. chrysops*♀ x *M. saxatilis*♂. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36(4), 521-529.
- Britton, G. y Young, A. (1993). Methods for isolation and analysis of carotenoids. En *yaoung, A. y Britton, G. editors. Carotenoids in Photosynthesis*. London: Chapman y Hall pp. 409-458.
- Burke, C., Thomas, T., Lewis, M., Steinberg, P., & Kjelleberg, S. (2011). Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*. *The ISME journal*, 5(4), 590-600.

- Chatzifotis, S., Pavalidis, M., Jimeno, C. M., Vardanis, G., Sterioti, A. and Divanach, P. (2005). The effect of different carotenoid sources on skin coloration of cultured red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquac. Res.* 36: 1517-1525.
- Christiansen, R., Lie, O. and Torrissen, O. J. (1995). Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different dietary levels of astaxanthin. First-feeding fry. *Aquacult. Nutri.* 1: 189-198.
- Colihueque, N. (2010). Genetics of salmonid skin pigmentation: clues and prospects for improving the external appearance of farmed salmonids. *Reviews of Fish Biology and Fisheries*, 20: 71-86.
- Das, T., Pal, A. K., Chakraborty, S. K., Manush, S. M., Sahu, N. P., & Mukherjee, S. C. (2005). Thermal tolerance, growth and oxygen consumption of *Labeo rohita* fry (Hamilton, 1822) acclimated to four temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 30(5), 378-383.
- De la Mora, G. I., Arredondo-Figueroa, J. L., Ponce-Palafox, J. T., Barriga-Sosa, I. A. and Vernon-Carter, J. E. (2006). Comparison of red chilli (*Capsium annuum*) oleoresin and astaxanthin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet pigmentation. *Aquacult.* 258: 487-495.
- Eliason, E.J., Clark, T.D., Hague, M.J., Hanson, L.M., Gallagher, Z.S., Jeffries, K. M., Gale, M.K., Patterson, D.A., Hinch, S.G. and Farrell, A.P. (2011) Differences in Thermal Tolerance Among Sockeye Salmon Populations. *Science*. Vol. 332, Issue 6025, pp. 109-112 DOI: 10.1126/science.1199158
- Escalante-Almada, G. (2001). Fisiología energética de *Cherax quadricarinatus*: Efecto de la temperatura y dietas. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. Ensenada, B.C. 41pp.
- Evans DH (1993) Osmotic and ionic regulation. In: Evans DH (ed) *The physiology of fishes*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 141–315
- Farrell, A. P., Hinch, S. G., Cooke, S. J., Patterson, D. A., Crossin, G. T., Lapointe, M. & Mathes, M. T. (2008). Pacific salmon in hot water: applying aerobic scope models and biotelemetry to predict the success of spawning migrations. *Physiological and Biochemical Zoology* 81, 697–708.
- Flores M., Diaz F., Medina R., Re A.D. & Licea A. (2008) The effect of dietary astaxanthin on physiological responses of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* acclimated to low-salinity water. *Journal of Fisheries International* 3, 75–82
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2005). The numbers represent the average unit value of imports for 1994-2003. *FAO Yearbooks 2005, Fishery Statistics, Commodities*. Roma, 83-97.
- Francis- Floyd, R. (2002). *Fish nutrition*. Fisheries and Aquatic Sciences. VM 1141-4.
- Forster, M. E., Franklin, C. E., Taylor, H. H. and Davison, W. (1987) The aerobic scope of an antarctic fish, *Pagothenia borchgrevinki* and its significance for metabolic cold adaptation. *Polar Biology*. Vol. 8, Issue 2, pp. 155-159.
- Friedlander A (2001). Essential fish habitat and the effective design of marine reserves: application for marine ornamental fishes. *Aquarium Sciences and Conservation*, 3, 135-150.
- Froese, R. (1988). Relationship between body weight and loading densities in fish transport using the plastic bag method. *Aquacult. Fish. Manage.* 19:275-281.
- Froese, R. and D. Pauly. Editors. (2015). *FishBase*. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, (Consultado el 16 de Julio 2015)
- Fry, F.E.J., Brett, J.R. & Clawson, G.H. (1942) Lethal limits of temperature for young goldfish. *Rev. Can. Biol.* 1, 50–56.
- Gaumet, F., Boeuf, G., Severe, A., Le Roux, A., Mayer-Gostant, N., (1995). Effects of salinity on the ionic balance and growth of juvenile turbot. *J. Fish Biol.* 47, 865– 876.

- Gardner, T. A., Cote, I. M., Gill, J. A., Grant, A., & Watkinson, A. R. (2005). Hurricanes and Caribbean coral reefs: impacts, recovery patterns, and role in long-term decline. *Ecology*, 86(1), 174-184.
- Green E. (2003). International trade in marine aquarium species: using the Global Marine Aquarium Database. In: *Marine Ornamental Species: Collection, Culture, and Conservation* (eds. J Cato, C Brown), pp 31-48. Iowa State Press, Ames, USA.
- Hata, M., & Hata, M. (1971). Carotenoi pigments i goldfish (*Carassius auratus*): I. Composition and distribution of carotenoids. *International Journal of Biochemistry*, 2(7), 11-19.
- Hoff, F. H. (1996). *Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on marine clownfish* Dade City, FL. Aquaculture Consultants, Inc., Florida, USA.
- Holt, G.J., (2003) Research on culturing the early life history stages of marine ornamental species. In: Cato, J.C., Brown, C.L. (Eds.), *Marine Ornamental Species: Collection, Culture and Conservation*. Iowa State Press, pp. 251–254.
- Imsland, A.K., Foss, A., Gunnarsson, S., Berntssen, M.H.G., FitzGerald, R., Bonga, S.W., Ham, E.V., Navdal, G., Stefansson, S.O., (2001). Interaction of temperature and salinity on growth food conversion in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 198, 353–367.
- Jha, G. N., Debajit Sarma, Qureshi, T. A. and Akhtar, M. S. (2012). Effect of Marigold Flower and Beetroot Meals on Growth Performance, Carcass Composition, and Total Carotenoids of Snow Trout (*Schizothorax richardsonii*). *Israili. J. Aquac. Bamidgeh*. 64: 752-7pages.
- Jobling, M., (1995). *Environmental Biology of Fishes*. Chapman & Hall, London, p. 455.
- Kalinowski, C. T., Robaina, L. E., Fernadez-Palacios, H., Schuchardt, D. and Izquierdo, M. S. (2005). Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. *Aquacult.* 244: 223-231.
- Krinsky, N. I. (1993). Actions of carotenoids in biological systems. *Annual review of nutrition*, 13(1), 561-587.
- Kop, A., Durmaz, Y. and Hekimoglu, M. (2010). Effect of natural pigment sources on colouration of cichlid (*Cichlasoma severum* sp. Heckel, 1840). *J. Ani. and Vet. Adv.* 9: 566-569.
- Lemos, D., Phan, V. N., & Alvarez, G. (2001). Growth, oxygen consumption, ammonia-N excretion, biochemical composition and energy content of *Farfantepenaeus paulensis* Perez-Farfante (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) early postlarvae in different salinities. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 261(1), 55-74.
- Lesser, M. P. (2004). Experimental biology of coral reef ecosystems. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 300(1), 217-252.
- Marshall, W. S., & Grosell, M. (2006). Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. *The physiology of fishes*, 3, 177-230
- Mayzaud, J. C. y R. J. Conover. (1988). O: N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 45: 289-302 p.
- Meyers, P. S. y Latscha, T. (2000). Carotenoids. *Advances in aquaculture*. World Aquaculture Society, 6: 164-193.
- Moore F., Best B. (2001). Coral reef crisis: causes and consequences. In: *Global Trade and Consumer Choices: Coral Reefs in Crisis*, Proceedings of an American Association for the Advancement of Science (AAAS) Meeting, pp 5-10. San Francisco, USA.
- Morgan, J.D., Iwama, G.K., (1998). Salinity effects on oxygen consumption, gill Na⁺, K⁺-ATPase and ion regulation in juvenile coho salmon. *J. Fish Biol.* 53, 1110– 1119.

- Meyers, S.M. & Latscha, T. (1997) Carotenoids. In: Crustacean Nutrition Advances in World Aquaculture, Vol. 6 (D'Abramo, L.R.D., Conklin, D.E. & Akiyama, D.M. eds.), pp. 164–193. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Myers, R. (1999). Micronesia Reef Fish: A Field Guide for Divers and Aquarists. Barrigada: Territory of Guam: Coral Graphics.
- Olivotto, I., Cardinali, M., Barbaresi, L., Maradonna, M., Carnevali, O., (2003). Coral reef fish breeding: the secrets of each species. *Aquaculture* 224, 69–78.
- Olivotto, I., Rollo, A., Sulpizio, R., Avella, M., Tosti, L., Carnevali, O., (2006). Breeding and rearing the Sunrise Dottyback *Pseudochromis flavivertex*: the importance of live prey enrichment during larval development. *Aquaculture* 255, 480–487.
- Olivotto, I., Zenobi, A., Rollo, A., Migliarini, B., Avella, M., Carnevali, O., (2005). Breeding, rearing and feeding studies in the cleaner goby *Gobiosoma evelynae*. *Aquaculture* 250, 175–182.
- Ostrowsky A.C. & Laidley C.W. (2001) Application of marine foodfish techniques in marine ornamental aquaculture: reproduction and larval first feeding. *Aquarium Sciences and Conservation* 3, 191–204.
- Palozza, P. y Krinsky, N.I (1992). Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 297: 291-295.
- Pan, C. H., Chien, Y. H. and Wang, Y. J. (2010). The antioxidant capacity response to hypoxia stress during transportation of characins (*Hyphessobrycon callistus* Boulenger) fed diets supplemented with carotenoids. *Aquacult. Res.* 41: 973-981.
- Pörtner, H.O. And Knust, R. (2007) Climate Change Affects Marine Fishes Through the Oxygen Limitation of Thermal Tolerance. *Science*. Vol. 315, Issue 5808, pp. 95-97. DOI: 10.1126/science.1135471
- Ramamoorthy, K., Bhuvaneshwari, S., Sankar, G. and Sakkaravarthi, K. (2010). Proximate composition and carotenoid content of natural carotenoid sources and its colour enhancement on marine ornamental fish *Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1880). *World J. Fish. Mar. Sci.* 2(6): 545-550.
- Re-Araujo, A.D. (2004). Fisiología termorreguladora, osmorreguladora y energética en el camarón azul *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) (Crustácea: Penaeidae). Tesis de Doctorado en Ciencias de la vida, CICESE
- Rodier, J. (1981). Análisis de las aguas: Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Omega, Barcelona. 134-138p.
- Rosas, C., Sánchez, A., Escobar, E., Soto, L., Bolongaro-Crevenna, A., (1992^a). Daily variations of oxygen consumption and glucose hemolymph level related to morphophysiological and ecological adaptations of crustacea. *Comp. Biochem. Physiol., A* 101, 323–328.
- Rueda-González, F. M., Navarro, S. Z., & López, F. M. (2016). Efecto de la estrategia de alimentación sobre el patrón de consumo de oxígeno de la lubina europea (*Dicentrarchus labrax* L.). *Revista AquaTIC*, (15).
- Sales, J., Janssens, G.P.J., (2003). Nutrient requirements of ornamental fish. *Aquat. Living Resour.* 16, 533–540.
- Salvato, B., Cuomo, V., Di Muro, P., & Beltramini, M. (2001). Effects of environmental parameters on the oxygen consumption of four marine invertebrates: a comparative factorial study. *Marine Biology*, 138(4), 659-668.
- Sinha, A. and Asimi, O. A. (2007). China rose (*Hibiscus rosasinensis*) petals: a potent natural carotenoid source for goldfish (*Carassius auratus* L.). *Aquacult. Res.* 38: 1123-1128.

- Sokolova, I.M. (2013) Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors - *Integrative and Comparative Biology*, *Soc Integ Comp Biol*. doi: 10.1093/icb/ict028
- Spalding M, Ravilious C, Green E (2001). *World Atlas of Coral Reefs*. University of California Press, Berkeley, USA.
- Storebakken, T., & No, H. K. (1992). Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture*, 100(1-3), 209-229.
- Tanaka, Y., Yamamoto, A., Kamata, T., & Simpson, K. L. (1992). Biochemical study on the carotenoids in the anemonefish, *Amphiprion* spp. *Memoirs of the Faculty of Fisheries, Kagoshima University*, 41, 1-8.
- Tissot, B. N., Best, B. A., Borneman, E. H., Bruckner, A. W., Cooper, C. H., D'Agnes, H., ... & Sumaila, R. (2010). How US ocean policy and market power can reform the coral reef wildlife trade. *Marine Policy*, 34(6), 1385-1388.
- Torrissen O. (1985). Coloonyzation of salmonids: factors affecting carotenoid deposition in rainbow trout (*salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 46:133-142
- Tytler, P. and Calow, P. (1985) *Fish Energetics: New Perspectives*. Baltimore, Md.: Johns Hopkins University Press, Springer pp. 349
- Valdez- Sánchez, G. (2002). Determinación de la preferencia térmica y fisiología energética de juveniles de *Litopenaeus vannamei* aclimatados a diferentes salinidades. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. Ensenada, Baja California. 68pp.
- Wang, Y. J., Chien, Y. H. and Pan, C. H. (2006). Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of characins, *Hyphessobrycon callistus*. *Aquacult*. 261: 641-648.
- Wallat, G. K., Lazur, A. M., & Chapman, F. A. (2005). Carotenoids of different types and concentrations in commercial formulated fish diets affect color and its development in the skin of the red oranda variety of goldfish. *North American Journal of Aquaculture*, 67(1), 42-51.
- Wilkinson, C. (2008). Status of coral reefs of the world. *Australia: Australian Institute of Marine Science*
- Wraght P.A., Part P. & Wood C.M. (1995) Ammonia and urea excretion in the tidepool sculpin (*Oligocottus maculosus*): sites of excretion, effects of reduced salinity and mechanisms of urea transport. *Fish Physiology and Biochemistry* 12, 111–123.
- Woo, N.Y.S., Chung, K.C., (1995). Tolerance of *Pomacanthus imperator* to hypoosmotic salinities: changes in body composition and hepatic enzyme activities. *J. Fish Biol.* 47, 70– 81.
- Yasir, I. and J. G. Qin. (2007). Embryonic development and early ontogeny of false clownfish *Amphiprion ocellaris* Cuvier. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* 87:1025–1033.
- Yasir, I. y Qin, J. G. (2010). Effect of dietary carotenoids on skin color and pigments of false clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41:308-318.
- Zheng Z., Jin C., Li M., Bai P. & Dong S. (2008) Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia excretion of juvenile miiuy croaker, *Miichthys miiuy* (Basilewsky). *Aquaculture International* 16, 581–589.

11. Anexo

Tabla 1.- Comparación en tasa de consumo de oxígeno, excreción amonio y relación O: N de *Amphiprion ocellaris* expuesto a diferentes salinidades.

Salinidades (%)	TCO	TEA	O:N
10	550.000 ± 160.87	72.187 ± 9.270	9.989 ± 2.35
15	846.918 ± 110.71	203.604 ± 13.63	4.694 ± 0.78
20	999.000 ± 135.54	289.355 ± 22.37	3.885 ± 0.35
25	886.546 ± 122.62	353.161 ± 33.93	2.942 ± 0.53
30	622.500 ± 147.61	332.180 ± 19.78	2.185 ± 0.44
35	937.524 ± 169.38	347.893 ± 24.34	3.005 ± 0.46
40	1135.000 ± 175.71	495.401 ± 25.64	2.632 ± 0.48
45	1087.876 ± 90.64	403.500 ± 30.77	3.138 ± 0.29

Tabla 2.- Resultados comparativos entre las dos temperaturas a las cuales fue expuesto *Amphiprion ocellaris*.

Dieta	23 ° C			29 ° C		
	TCO mg O ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹	TEA mg NH ₄ ⁺ h ⁻¹ kg ⁻¹	O:N	TCO mg O ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹	TEA mg NH ₄ ⁺ h ⁻¹ kg ⁻¹	O:N
D1	1379.12 ± 260.88	467.99 ± 57.12	3.09 ± .57	1399.48 ± 141.79	156.68 ± 26.77	9.86 ± 3.80
D2	993.18 ± 174.52	330.01 ± 33.06	3.39 ± .66	1533.63 ± 155.51	338.39 ± 33.25	5.08 ± .37
OT	1436.82 ± 293.90	169.36 ± 26.38	10.13 ± 1.72	1619.86 ± 159.58	132.07 ± 18.44	13.56 ± 1.91

Tabla 3.- Anova de 2 vías realizadas para comparar los tratamientos con las temperaturas de aclimatación en *Amphiprion ocellaris*.

Dietas	Comparación	Diferencia de media	t	P	P<0.05
D1	29 °C vs. 23 °C	73.711	1.272	0.206	No
OT	29 °C vs. 23 °C	217.785	3.758	<0.001	Yes
D2	29 °C vs. 23 °C	564.962	9.748	<0.001	Yes

Tabla 4.- ANOVA de 2 vías, para la TEA de *Amphiprion ocellaris* expuesto a 2 temperaturas con dietas distintas.

Dietas	Comparación	Diferencia de media	T	P	P<0.05
D1	23.000 vs. 29.000	330.941	34.133	<0.001	Yes
OT	23.000 vs. 29.000	23.569	2.431	0.017	Yes
D2	29.000 vs. 23.000	0.456	0.047	0.963	No

Tabla 5.- ANOVA de 2 vías, para la relación O: N de *Amphiprion ocellaris* expuesto a 2 temperaturas con dietas distintas.

Dietas	Comparación	Diferencia de media	t	P	P<0.05
D1	29.000 vs. 23.000	8.299	14.335	<0.001	Yes
OT	29.000 vs. 23.000	3.516	6.073	<0.001	Yes
D2	29.000 vs. 23.000	1.681	2.904	0.004	Yes

“No hay felicidad o infelicidad en este mundo; sólo hay comparación de un estado con otro. Solo un hombre que ha sentido la máxima desesperación es capaz de sentir la máxima felicidad. Es necesario haber deseado morir para saber lo bueno que es vivir”.

*El conde de Monte Cristo – **Alexandre Dumas.***