

Resumen de la tesis de **Roger Javier Frías Díaz**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** con orientación en **ACUICULTURA**. Ensenada, Baja California. Marzo del 2009.

ACONDICIONAMIENTO Y MADURACIÓN DE REPRODUCTORES DE *Crassostrea gigas* EN UN SISTEMA DE RECIRCULACIÓN.

Resumen aprobado por:

Dr. Manuel Segovia Quintero
Director de Tesis

Los sistemas de recirculación son sistemas que tienen ventajas para llevar a cabo el acondicionamiento y la maduración de los moluscos bivalvos ya que permiten mantener los parámetros fisicoquímicos adecuados. Sin embargo, son pocos los trabajos en los que se utilizan sistemas de recirculación para el acondicionamiento y maduración de reproductores de moluscos bivalvos. En este estudio se probó un prototipo de sistema de recirculación para el acondicionamiento y maduración de reproductores de ostión japonés (*Crassostrea gigas*). Se llevaron a cabo dos diferentes experimentos, en el primer experimento se evaluó el efecto de la dieta en la maduración de los gametos en tres diferentes tratamientos: D1 (alimentados con Tetraselmis 3600), D2 (alimentados con Isocrysis 1800) y D3 (alimentados con mezcla 50:50 de las dos microalgas). En el segundo experimento se evaluó el efecto de tres diferentes regímenes de temperatura con una dieta mixta en la maduración de los gametos: T1 = 16-24 °C, T2 = 20 °C y T3 = 24 °C. Para cada uno de estos tratamientos se utilizaron 43 organismos por tanque y cada tratamiento se realizó por triplicado. Se hicieron 7 muestreos durante un periodo de 72 días, en cada muestreo se recolectaron tres organismos de cada tanque para realizar cortes histológicos y hacer el análisis del desarrollo gonadal. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el prototipo de sistema de recirculación diseñado fue eficiente ya que se logró mantener los parámetros fisicoquímicos controlados y los compuestos nitrogenados se mantuvieron por debajo de los niveles tóxicos (< 0.2 mg/L). No se encontraron diferencias significativas en el desarrollo gonadal de los tratamientos D1 y D2 (P>0.05) aunque se encontró que el tratamiento D1 se mantuvo constante en el porcentaje de componentes celulares de la gónada durante todo el experimento. En el D2 se observó gametogénesis, pero el porcentaje de gametos maduros producidos fue muy bajo, el D3 también se observó gametogénesis pero con volúmenes de gametos maduros muy bajos con excepción del último día de muestreo (día 72) en el cual fue significativamente diferente a D1 y D2. En el tratamiento T1 se observó un mayor porcentaje de gametos maduros y además el índice gonádico alcanzó porcentajes altos desde el día 33, para el T2 no se observó un incremento en el índice gonádico durante el experimento aunque si se observaron porcentajes > 20 % de gametos maduros en el volumen de los componentes de la gónada. En el tratamiento T3 se encontró un incremento en el índice gonádico para el día 41 y 48 del experimento con porcentajes cercanos al 40 % de gametos maduros, pero este tratamiento presentó el mayor

porcentaje de mortalidad. Con esto se puede concluir que la combinación entre la alimentación y la temperatura permiten manipular el desarrollo gonádico de *C. gigas* y los sistemas de recirculación son una herramienta eficiente para poder mantener los parámetros más convenientes.

Palabras clave: ostión, *Crassostrea gigas*, sistemas de recirculación, temperatura, alimentación.

Abstract of thesis presented by **Roger Javier Frías Díaz** as a partial requirement for obtaining the degree of **MASTER DEGREE** with orientation in **AQUACULTURE**
Ensenada, Baja California, March 2009

CONDITIONING AND RIPENING OF *Crassostrea gigas* REPRODUCERS IN A RECIRCULATION SYSTEM

Closed recirculation systems can be used for conditioning and maturation of bivalve mollusks, since they can be used to maintain adequate physical-chemical parameters. Nevertheless, recirculation systems for conditioning and maturation of bivalve mollusks broodstock have been used in few studies. In this study, a recirculating system prototype for conditioning and maturation of Japanese Oysters (*Crassostrea gigas*) broodstock was tested. Two different experiments were designed to attain this objective. In the first experiment, three different diets: D1 (fed with *Tetraselmis* 3600), D2 (fed with *Isochrysis* 1800), and D3 (fed with a 50/50 combination of both microalgae). In a second experiment three different temperatures regimes: T1=16-24 °C, T2=20 °C and T3=24 °C were evaluated. For each one of these treatments, 43 organisms were used and every treatment was done in triplicate. Seven samplings were completed in 72 days. In each sampling period 3 oysters from each treatment were collected and a gonad sample was obtained for histology analysis to determine gonad development. The results obtained in this study indicated that the recirculation system prototype was able to keep water optimum quality parameters, and the nitrogenous components stayed below toxic levels (< 0.2 mg/L). For the first experiment no significant differences were detected in gonad development for treatments D1 and D2 ($P>0.05$). Although it was found, that in treatment D1 the percentages of cellular components of the gonads stayed constant during the whole experimental development. In treatment D2, gametogenesis was observed, but the percentage of ripe gametes was very low. Gametogenesis was found in treatments D2 and D3. However the volume of ripe gametes was very low, except for the last day of sampling (day 72) where treatment D3 was significantly different from D1 and D2. T1 had the higher percentage of ripe gametes; in addition, the gonad index reached high percentages starting from day 33. In T2, gonad index did not increase during the experiment. However, the volume of ripe gametes was >20 %. In the treatment T3, there was an increase in the gonad index on day 41 and 48, with percentages close to 40%. Nevertheless this treatment had the highest percentage of mortality. Thus, it can be concluded that the combination of diet and temperature allows the manipulation of the gonad development of *C. gigas* and that the recirculation systems are an efficient tool to maintain convenient physical-chemical and environmental parameters.

Key words: oyster, *Crassostrea gigas*, recirculation systems, temperature, diet

DEDICATORIA

Para mi esposa

Yolanda

Para mis padres

Gustavo y Minerva

Para mis abuelos

Ricardo y Lilia

Arnoldo y Consuelo

Gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Manuel Segovia Quintero, por sus enseñanzas, apoyo y amistad.

A mis Sinodales Dra. Beatriz Corder Esquivel, Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez, Dra. Carmen Paniagua Chávez y Dr. José Alberto Fernández Zepeda por su atención, paciencia y aportación acertada para realizar y mejorar este trabajo.

Al Dr. Benjamin Barón, por permitirme usar su laboratorio y equipo para poder realizar este trabajo.

Al Dr. Jorge Cáseres Martínez por permitirme usar su laboratorio para llevar a cabo la capacitación técnica en las metodologías de histología y por haberme prestado material para poder realizar los cortes histológicos.

A la M .en C. Yanet Guerrero Rentería por el entrenamiento técnico brindado en las técnicas de histología con parafina y con criostato, además de la capacitación y ayuda en la identificación de estructuras.

Al técnico Francisco Valenzuela, por su ayuda y tiempo invertido para la realización de las imágenes del sistema de maduración y el bioclarificador incluidos en este trabajo.

A la Dra. Pilar Sánchez por prestarme su laboratorio y equipo para realizar análisis necesarios para este trabajo y además por brindarme su amistad y apoyo durante toda mi estancia en la maestría.

A mis compañeros y amigos de clases, por compartir tantos trabajos y conocimientos, además de haberme brindado su amistad.

A los maestros que a lo largo de la maestría compartieron conmigo y compañeros de clase sus conocimientos esforzándose para poder transmitirlos de forma clara.

A CONACYT, por el apoyo económico otorgado a través de una beca durante la realización de mis estudios de maestría.

Al Departamento de Acuicultura del CICESE por el apoyo económico extra brindado para permitir seguir realizando este trabajo.

CONTENIDO	Página
Resumen Español	i
Resumen Ingles	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Contenido	vi
Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas	x
I.- INITRODUCCIÓN	1
I.1.- Generalidades	1
I.2.- Antecedentes	5
II.- OBJETIVOS	8
II.1.- Objetivo General	8
II.1.2.-Objetivos Particulares	8
III.- HIPOTESIS	9
IV.- MATERIAL Y METODOS	10
IV.1.- Obtención de organismos	10
IV.2.- Descripción del sistema	10
IV.2.1.- Sistema para maduración de reproductores	10
IV.2.2.- Diseño del bioclarificador	11
IV.3.- Monitoreo de la Calidad de agua	12
IV.4.- Diseño experimental	13
IV.5.- Análisis Histológico	15
IV.6.- Estereología cuantitativa	18
IV.7.- Análisis estadístico	20

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- Generalidades

La producción de organismos marinos como fuente de alimento ha crecido en los últimos 20 años, con una producción total 87.8 millones de toneladas en 1984 y de 143.6 millones de toneladas en el 2006 (FAO, 2008). En la producción de moluscos ha habido un incremento en la producción acuícola considerable en la última década. En 1983 se produjo 1.8 millones de toneladas, esta producción se incrementó un 783 % (14.1 millones de toneladas) para el 2006 (FAO, 2008).

De los 14.1 millones de toneladas de producción de moluscos en 2006, el 97% (13.67 millones de toneladas) correspondió a organismos bivalvos. El 35% de estos a ostiones, el 97 % (4.64 millones de toneladas) del total de ostiones producidos corresponde al ostión japonés (*Crassostrea gigas*) lo que lo coloca como la especie de molusco más importante producida en términos de biomasa (FAO, 2006).

El ostión japonés tiene su origen en el noroeste de Asia y posteriormente se introdujo para su cultivo en Europa, América y Nueva Zelanda (FAO, 2006). El primer cultivo comercial mexicano se hizo en la Bahía de San Quintín, Baja California en el año de 1976 (Ibarra, 1980, Villarreal, 1993), con semilla proveniente de un laboratorio de Washington en E.U.A. Este laboratorio a su vez obtuvo la semilla de poblaciones naturales de ostión en Japón (Gutiérrez, 1988). Periódicamente se introdujo en Bahía San Quintín semilla de ostión proveniente de Washington y Oregon E.U.A. (De la Rosa *et al*, 1991).

En los inicios del cultivo de ostión Japonés en Bahía San Quintín, las cosechas fueron exitosas y su desarrollo se incrementó al paso de los años (Lara, 1975) obteniendo para el año 2001 una producción de 1600 toneladas (SAGARPA, 2001). Este incremento se

debió en gran parte a la alta productividad primaria que caracteriza a la Bahía de San Quintín como una de las lagunas costeras más fértiles del océano pacífico (Lara, 1975).

Sin embargo, a partir de 1997 se presentaron altas mortalidades de semilla, juveniles y adultos de *C. gigas*, lo que ha llevado a una crisis en la industria de la ostricultura en Baja California (Chávez *et al.*, 2007). Las causas de las altas mortalidades no son bien conocidas, pero en otros países donde esto ha ocurrido se ha determinado como posible causa a las interacciones entre el ambiente, los ostiones y organismos patógenos (Cheney *et al.*, 2000). Las altas mortalidades registradas y la falta de disponibilidad de semilla han hecho necesaria la aplicación de nuevas técnicas de cultivo para mantener y acondicionar a los reproductores, incluyendo el diseño, uso o aplicación de sistemas de recirculación.

Los sistemas de recirculación acuícola son un conjunto de procesos y componentes que se utilizan para el cultivo de organismos acuáticos, donde el agua se limpia continuamente y se re-utiliza (Libey, 1993). Los sistemas de recirculación o sistemas cerrados tienen como ventaja el uso racional del agua ya que el volumen de recambio es menor a un 10% diario del volumen total del sistema. Este tipo de sistemas permite el monitoreo y control de los parámetros fisicoquímicos tales como: la temperatura, la salinidad, el oxígeno disuelto, el dióxido de carbono, el potencial de hidrogeno (pH), la alcalinidad y los metabolitos como el nitrógeno amoniacal, los nitritos y los nitratos. El control de los parámetros fisicoquímicos permiten la producción continua a lo largo del año (Timmons *et al.*, 2002). Además, si se mantienen los factores fisicoquímicos adecuados, los organismos cultivados pueden presentar mejores tasas de crecimiento y conversión alimentaría (Wheaton, 1977). Los sistemas cerrados también permiten disminuir la

transmisión horizontal de enfermedades, ya que cada tanque se mantiene como una unidad de cultivo independiente (Losordo *et al.*, 1992a).

Para que un sistema de recirculación sea eficiente y provea un ambiente adecuado debe poseer cinco procesos o características: a) La remoción de sólidos que consiste en remover los desechos producidos en los sistemas tales como las heces y el alimento no consumido, b) La biofiltración que tiene la función de controlar los compuestos nitrogenados producto del metabolismo de los organismos, c) La aireación u oxigenación que consiste en adicionar aire u oxígeno al agua, d) La desgasificación que es el proceso de eliminar el dióxido de carbono acumulado en el sistema, y e) La circulación del agua (Losordo *et al.*, 1992b). Estos procesos o tratamientos se llevan a cabo en unidades especialmente diseñadas para proveer una calidad de agua adecuada y deben tener un bajo coste para que se mantenga la rentabilidad del cultivo (Losordo *et al.*, 1992a).

Existen pocos trabajos en los que se utilizan los sistemas de recirculación para el crecimiento, engorda, acondicionamiento y maduración de reproductores de moluscos bivalvos (Bolton, 1982; Laing, 1987; Robinson, 1992a; O'Connor *et al.*, 2000; Wang, 2003). El uso de los sistemas de recirculación presenta una gran ventaja, sobre todo, para los laboratorios de producción de semilla de moluscos bivalvos ya que es posible propiciar condiciones ambientales adecuadas para el acondicionamiento y maduración de los reproductores aún fuera del periodo de maduración y reproducción natural (Chávez *et al.*, 2002).

El objetivo principal de los laboratorios de producción de semilla es obtener una máxima fecundidad de los reproductores además de mantener la calidad de los huevos y viabilidad de las larvas (Utting y Millican, 1997). Existen muchos trabajos donde se

describe el protocolo para la producción de semilla de ostión y otros moluscos bivalvos y se señala que los principales factores que promueven el desarrollo de las gónadas son los parámetros ambientales como la temperatura, el fotoperiodo, la calidad del agua y los parámetros nutricionales como la disponibilidad y calidad del alimento (Breese y Malouf, 1975; Gallagher y Mann, 1986; Utting y Spencer, 1991; Castagna *et al.*, 1996; Utting y Millican, 1997; Brown y McCausland, 1999; Matthiessen, 2001; Brown, 2002; Chávez *et al.*, 2002; Uriarte *et al.*, 2004).

En todo laboratorio de producción de semillas de bivalvos, el protocolo de producción se divide en tres etapas: a) El acondicionamiento de reproductores, b) El desove, la fertilización, la obtención de larvas y, c) El asentamiento y la obtención de juveniles (Chávez *et al.*, 2001). Aunque estas fases se llevan a cabo de forma rutinaria, existen variaciones en el tiempo necesario para la maduración de las gónadas ya que dependen del origen de los reproductores, el estadio de maduración al tiempo de la recolección y estación del año de la recolecta (Robinson, 1992b, Chávez *et al.*, 2003).

Una de las principales operaciones de los laboratorios de producción de semilla es la producción de alimento (Powell *et al.*, 2002). La principal fuente de alimento para moluscos bivalvos, tanto reproductores como larvas y juveniles, son las microalgas. En la actualidad la producción de microalgas como alimento vivo garantiza un mejor crecimiento y sobrevivencia de los organismos en comparación con fórmulas alternas (Laing y Millican, 1986; Cordero y Voltolina, 1994).

Para controlar la reproducción de los moluscos bivalvos se tienen que tomar en cuenta la interacción entre factores exógenos como el alimento y la temperatura, así como factores endógenos como los ciclos neuro-endocrinos y el genotipo. El rol de estos factores

en la iniciación y duración de la gametogénesis difiere en su mayoría en el rol que juegan en el tiempo y sincronización de los desoves (Seed y Suchanek, 1992). La temperatura es el factor exógeno más utilizado para alterar la gametogénesis en los bivalvos, sin embargo la alimentación también juega un papel muy importante en el tiempo de inicio de la gametogénesis. La razón por lo que el alimento es uno de los principales factores que afectan en la gametogénesis es debido a que es un proceso que demanda mucha energía por lo que se hace necesario la disponibilidad adecuada de alimento, la disponibilidad de energía de reserva o ambas (Gosling, 2003).

I.2.- Antecedentes

El uso de sistemas de recirculación para cultivo de organismos bivalvos se ha llevado a cabo por casi 30 años (Bolton, 1982). Los sistemas cerrados propician un mejor crecimiento para postlarvas de ostión Japonés (*Crassostrea gigas*) ya que permite que haya un mayor tiempo de residencia del alimento en el sistema, aumentando así su disponibilidad a lo largo del día (Badillo, 2006). Aun cuando no se han encontrado diferencias en el crecimiento y desarrollo gonádico de los reproductores mantenidos en sistemas de recirculación y sistemas tradicionales de flujo abierto, el control de la temperatura y el fotoperiodo en un sistema de recirculación permite disponer de semilla durante todo el año (Robinson, 1992a). Al incrementar la temperatura del agua, los reproductores de moluscos bivalvos pueden madurar aun fuera de la temporada reproductiva (Robinson, 1992b). En condiciones naturales, los bivalvos de zonas costeras de aguas templadas empiezan su maduración sexual cuando la temperatura excede los 10-14 °C y los gametos comienzan a desarrollarse entre mayo y junio, y maduran entre julio y agosto (Utting y Spencer, 1991). Para el ostión Japonés (*C. gigas*), la acumulación de

reservas (glicógeno) en el medio natural comienza en otoño e invierno y los primeros signos de inicio de gametogénesis se observan en enero cuando la temperatura aún está descendiendo (Chávez *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha encontrado que en sistemas de cultivo artificial es necesario proporcionar una buena alimentación y temperaturas mayores de 18 °C, para que se estimule el desarrollo y la maduración de las gónadas (Thompson *et al.*, 1996).

Se han realizado diversos trabajos en los que se aborda el tema de la alimentación para el acondicionamiento de reproductores de moluscos. Utting y Spencer (1991), mencionan que la madurez puede ser acelerada si se administran cantidades adecuadas de alimento y que las especies *Monochrysis lutheri* e *Isochrysis galbana* son microalgas que tienen un tamaño y calidad nutricional adecuado para la engorda y acondicionamiento de reproductores. Los mejores resultados de acondicionamiento y maduración de los reproductores de moluscos bivalvos se han obtenido alimentando con una ración de 4 a 6 % del peso seco del organismo en peso seco de microalgas (Millican y Helm, 1994). Si se alimentan con una ración mayor (9%) puede generarse un crecimiento exagerado de las conchas, retraso en la maduración de los gametos y una disminución en la viabilidad de las larvas producidas (Stephenson, 1973). Para la alimentación de sus reproductores los laboratorios de producción de semillas utilizan monocultivos o mezclas de dos o más especies de microalgas siendo *Isochrysis* sp., *Chetoceros calcitrans*, *Pavlova lutheri* y *Thalassiosira pseudonana*, las más usadas (Coutteau y Sorgeloos, 1992).

Existe una carencia de información en relación al acondicionamiento de *C. gigas* en sistemas de recirculación. Es por esto que en este trabajo se estudiará el efecto de la mezcla

de dos microalgas y la temperatura en la maduración de reproductores de ostión Japonés *C. gigas* en un sistema de recirculación.

II.- OBJETIVOS

II.1.- Objetivo General

- Determinar el efecto de la dieta y la temperatura en el desarrollo gonádico del ostión Japonés (*Crassostrea gigas*) mantenidos en un prototipo de un sistema de recirculación.

II.2.- Objetivos particulares

- Diseñar, construir y evaluar un prototipo de un sistema de recirculación para la maduración de reproductores de moluscos bivalvos.
- Determinar el efecto de la dieta sobre el tiempo de maduración de las gónadas de los reproductores.
- Comparar el desarrollo de las gónadas de *C. gigas* al mantenerlos con tres temperaturas diferentes.

III.- HIPOTESIS

El uso de un sistema de recirculación en el que se pueda manipular la temperatura y dieta, permitirá controlar la maduración de las gónadas de los ostiones y obtener gametos y larvas durante cualquier época del año.

IV.- MATERIALES Y METODOS

IV.1.- Obtención de organismos

Para llevar a cabo este experimento, se utilizó un total de 804 ostiones adultos (*Crassostrea gigas*) de 83.9 ± 16.3 g de peso fresco entero. Los ostiones se obtuvieron de Bahía San Quintín, B.C. Los organismos se transportaron en seco en hieleras con una temperatura de 18°C al Departamento de Acuicultura del CICESE, donde se colocaron en tanques circulares de 280 l para su aclimatación. La aclimatación se llevó a cabo incrementando un grado centígrado la temperatura del agua por día hasta que se alcanzó la temperatura correspondiente de cada tratamiento.

IV.2.- Descripción del sistema

IV.2.1.- Sistemas para la maduración de reproductores

Cada unidad de maduración estuvo compuesta por un tanque circular (0.77 m de diámetro x 0.46 m de alto), de color negro y fondo plano con una capacidad máxima de 280 l conectado a un biofiltro de medio granular de 0.018 m³ de capacidad (Figura 1).

El agua se recirculó en la unidad de maduración por medio de bombeo con aire (Reinemann y Timmons 1987). El abastecimiento de aire para promover la circulación del agua y oxígeno a los reproductores, la proporcionó un aireador regenerativo eléctrico de 7.5 HP de capacidad. Para elevar la temperatura de los sistemas se utilizaron calentadores eléctricos de titanio de 300 W (Fines, Westmont, IL) controlado con un termostato de ± 0.5 °C de precisión. Cada uno de los biofiltros de cada sistema se aclimato por 50 días a 16 °C previo a los experimentos como lo recomienda Simmonel *et al.* (2002).

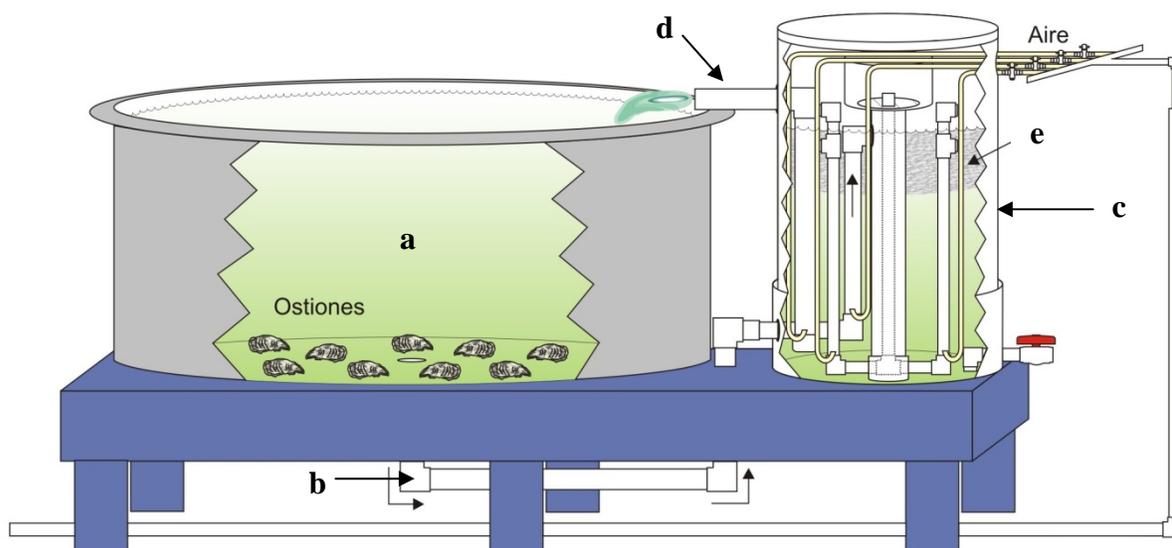


Figura 1. Sistema de maduración con bioclarificador que se utilizó para los experimentos. a) tanque de maduración, b) tubería de desagüe, c) bioclarificador, d) retorno de agua filtrada, e) cuentas de plástico.

IV.2.2.- Diseño del bioclarificador

El biofiltro estuvo compuesto por un tubo de PVC de 0.4 m de diámetro con una altura de 0.5 m. Se utilizaron 7.2 l de esferas de polipropileno de 2-3 mm de diámetro como medio filtrante. En la parte interna del biofiltro se colocó un fraccionador de espuma construido con tubería de PVC de 0.06 m de diámetro con un tapón capucha en la parte inferior del tubo y una reducción (0.06 a 0.025 m) en la parte superior. Para la recolección de la espuma se utilizó un tapón de capucha de 0.1 m de diámetro. La circulación del agua a través del biofiltro y de regreso al tanque de cultivo se realizó utilizando bombeo por aire (Figura 2).

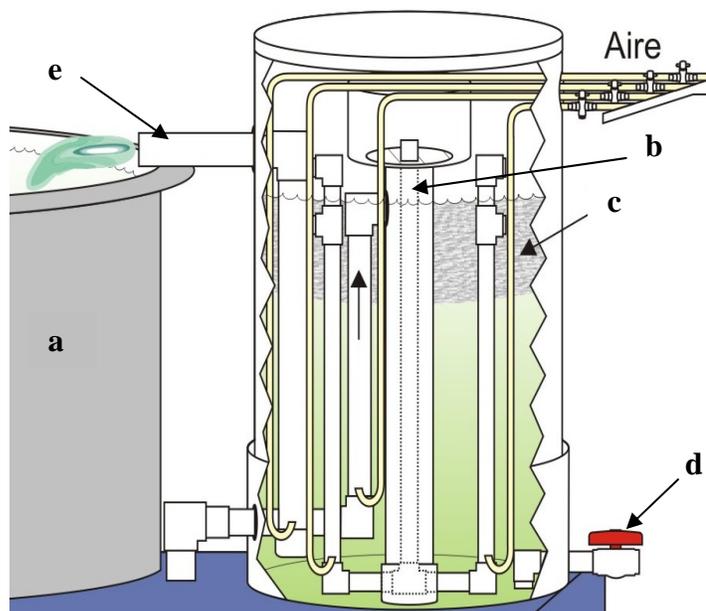


Figura 2. Diagrama del biofiltro utilizado para la remoción de sólidos y oxidación de compuestos nitrogenados. a) tanque de maduración, b) fraccionador de espuma, c) medio expandible granular, d) desagüe para retrolavado, e) tubería de retorno.

IV.3 Monitoreo de la calidad del agua

La temperatura ($^{\circ}\text{C}$), la salinidad (‰) y el oxígeno disuelto (mg l^{-1}) en el agua se monitorearon diariamente usando un equipo multiparámetro (YSI modelo 556MPS, Ohio, EUA). El pH se monitoreó diariamente con un potenciómetro manual (HANNA Instruments, modelo HI 98127, Rhode Island, EUA).

Las mediciones de nitrógeno amoniacal total (NAT), los nitratos (NO_3) y los nitritos (NO_2) se realizaron semanalmente utilizando un kit de medición rápida para agua de mar marca Aquarium Pharmaceuticals, Inc.

IV.4.- Diseño experimental

Para cumplir con los objetivos de este trabajo, se utilizaron 18 unidades de maduración, donde cada unidad consistió de un tanque y un bioclarificador (Figura 3). En cada unidad se colocaron 43 organismos reproductores con un peso fresco entero promedio de 83.9 ± 16.3 g.



Figura 3. Diagrama del sistema de tanques y filtros que se utilizó para los experimentos de acondicionamiento y maduración de gónadas de reproductores de ostión japonés, a) bioclarificador, b) tanques de maduración, c) tubería de aire.

Se llevaron a cabo en forma simultánea dos experimentos. El primero para probar el efecto del uso de diferentes dietas y el segundo para probar el efecto de diferentes temperaturas en el desarrollo de la gónada del ostión Japonés. En cada uno de los dos experimentos se probaron tres diferentes tratamientos con tres repeticiones cada uno.

En el experimento donde se probaron las dietas, en el primer tratamiento (D1) los organismos se alimentaron con la microalga en pasta *Tetraselmis* 3600 (Reed Mariculture Store, Campbell, CA, EU). En el segundo tratamiento (D2) los organismos se alimentaron con la microalga en pasta *Isochrysis* 1800 (Reed Mariculture Store) y en el tercer tratamiento (D3), los organismos se alimentaron con una mezcla (50-50) de las dos microalgas en pasta (*Tetraselmis* 3600 y *Isochrysis* 1800). Los reproductores se mantuvieron a una temperatura constante de 20 °C durante 72 días.

Para evaluar el efecto de la temperatura en el desarrollo de la gónada de los organismos en el primer tratamiento (T1) se consideró la temperatura ambiente que osciló entre 16 y 24 °C. En el segundo tratamiento (T2), la temperatura se mantuvo constante a 20 °C y en el tercer tratamiento (T3) se consideró una temperatura constante de 24 °C. A todos los organismos en este experimento se les alimentó con una mezcla (50-50) de dos microalgas en pasta (*Isochrysis* 1800 y *Tetraselmis* 3600) y se mantuvieron bajo las condiciones experimentales por 72 días.

La alimentación de los organismos en los dos experimentos se efectuó de forma manual agregando el 2% del peso seco del tejido de los reproductores de ostión en peso seco de pasta. Para calcular el peso seco del tejido y poder determinar la ración alimentaria diaria se muestrearon 30 organismos al inicio del experimento. Los organismos seleccionados fueron sacrificados y se obtuvo el peso húmedo con una precisión de 0.1 g. Posteriormente los organismos se colocaron en forma individual en navecillas de aluminio previamente pesadas y etiquetadas y se secaron en una estufa a 60 °C durante 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de secado las navecillas con el tejido seco se pesaron en una balanza digital de 0.01 g de precisión. La ración alimentaria se ajustó durante todo el

experimento disminuyendo la cantidad de microalga que se agregaba a cada tanque en relación a los organismos retirados para muestreo y debido a la mortalidad.

Para determinar el estado de desarrollo de las gónadas del ostión Japonés *Crassostrea gigas*, se muestrearon nueve ejemplares por semana en forma aleatoria en cada uno de los seis tratamientos (tres organismos por unidad de maduración). A cada organismo muestreado se le tomó el peso entero y el peso de la carne con una balanza digital de 0.01 g de precisión y se midió la longitud (eje mayor) con un ictiómetro de 0.1 cm de precisión.

IV.5.- Análisis Histológico

Para cuantificar el desarrollo gonádico de los organismos en cada uno de los tratamientos se realizaron cortes histológicos para esto, se tomó una fracción del cuerpo blando de cada organismo haciendo un corte transversal oblicuo centrado en la región media de la glándula digestiva, seguido de un segundo corte transversal a ~ 5 mm posterior al primer corte. En forma inmediata las secciones cortadas de cada organismo se colocaron en crio-moldes de vinilo desechables (25 mm x 20 mm x 5 mm marca Tissue Tek[®] 4557), se etiquetaron y se embebieron en un medio congelante para tejidos (O.C.T. Freezing Medium Compound, Tissue Tek[®]) y se congelaron a - 78 °C con CO₂ (hielo seco). Posteriormente las muestras se almacenaron en un ultra-congelador REVCO a -70 °C para su posterior tratamiento y análisis.

Las muestras se sacaron una a una del ultra-congelador y se colocaron en una hielera con hielo seco. Las muestras se colocaron y adhirieron en un porta muestras para criostato utilizando un medio congelante O.C.T..

A cada una de las muestras congeladas se le hizo un corte de 7µm de ancho con un criostato marca Leica modelo CM 1510s a una temperatura de -32 °C que se montó sobre

un porta objetos previamente limpiado con alcohol etílico y enfriado dentro del criostato. Para el análisis histológico se utilizó la tinción rutinaria de hematoxilina-eosina (Humason, 1967) en un tren de tinción manual marca Tissue Tek modelo II. Posterior a la tinción, las laminillas se montaron en resina sintética (Cytoseal TM60 Richard-Allan Scientific) y se cubrieron con un cubre objetos para llevar a cabo el análisis histológico

La evaluación del desarrollo gonadal se estudió en un microscopio marca NIKON modelo ECLIPSE 80i. Las imágenes analizadas se capturaron con una cámara para microscopio (EVOLUTION VF, Media Cybernetics, Canadá). Las imágenes obtenidas con la cámara se procesaron con el software IMAGE PRO PLUS versión 5.1 (EVOLUTION VF, Media Cybernetics, Canadá).

Las gónadas se clasificaron en función de las distintas fases de maduración gonadal de acuerdo a la siguiente clasificación: Indiferenciado (Estadio 1), en desarrollo (Estadio 2), maduro (Estadio 3), desovado (Estadio 4) y en reabsorción (Estadio 5). Se utilizó como método de determinación de las fases de desarrollo gonadal una modificación de la escala de comparación descrita por Steele y Mulcahy (1999) (Tabla I y II).

Tabla I. Descripción de los estadios gonádicos utilizados para clasificar el desarrollo gonadal de las hembras de *Crassostrea gigas*.

Estadio		Descripción
1	Indiferenciado	No hay evidencia o presencia de folículos en el área circundante a la glándula digestiva.
2	Desarrollo	Las oogonias presentes, no hay oocitos libres, mucho tejido conectivo.
3	Maduro	Los folículos están llenos oocitos, los oocitos libres con núcleo y nucléolo visibles.
4	Desovado	Los oocitos libres pero poco compactados, las paredes de los folículos aparentemente rotas, folículos vacíos y presenciade fagocitos.
5	Reabsorción	El tejido conectivo aparente en los folículos, los oocitos pueden ser vistos en proceso de citólisis, y presencia de fagocitos en los folículos.

Tabla II. Descripción de los estadios gonádicos utilizados para clasificar el desarrollo gonadal de los machos de *Crassostrea gigas*.

Estadio		Descripción
1	Indiferenciado	No hay evidencia o presencia de folículos en el área circundante a la glándula digestiva.
2	Desarrollo	Muchos folículos pequeños, espermatogonias y espermatocitos numerosos, puede o no haber espermatozoides, si hay presencia de espermatozoides las colas están en dirección del lumen del folículo, en el centro del folículo.
3	Maduro	El tejido ínter folicular y epitelio germinal no son evidentes, los folículos están llenos de espermatozoides con las colas orientadas hacia el lumen del folículo.
4	Desovado	Los folículos vacíos o parcialmente vacíos, si hay presencia de espermatozoides están poco compactados en los folículos o en los conductos de espermas el tejido conectivo crece rápidamente entre los folículos, citólisis de las células germinales presentes y grandes cantidades de fagocitos.
5	Reabsorción	El tejido conectivo aparente en los folículos, infiltración de fagocitos en los folículos.

IV.6.- Estereología cuantitativa

El método de estereología cuantitativa se utilizó para obtener la proporción de volumen de los diferentes componentes celulares de la gónada (Seed y Suchanek, 1992). La estereología cuantitativa se basa en el principio de Delesse, el cual establece que en una sección bidimensional o fracción de volumen (V_v) de una roca o cualquier otro compuesto sólido (tejido), la naturaleza y distribución de los componentes seccionados está relacionada con su naturaleza tridimensional y su distribución en la estructura de un todo (Briarty, 1975). Este principio parte de que la fracción del volumen (V_v) de los diversos componentes “i” de un compuesto sólido, se puede estimar midiendo sobre secciones tomadas aleatoriamente las áreas relativas de sus perfiles cuya expresión matemática es $A_{ai}=V_{vi}$. La fracción del volumen del componente “i” (V_{vi}) se define como el volumen del componente “i” en la unidad de volumen del espacio de referencia y se evalúa mediante una retícula con 21 puntos alineados (Weibel, 1969), de tal forma que se obtiene V_{vi} contando el número de puntos que se encuentran sobre los perfiles del componente “i” (42 puntos) (Figura. 4).

Para esta estimación es necesario delimitar el espacio de referencia y los componentes. En este trabajo los componentes celulares que se tomaron en cuenta son: las células adipogranulares (AG), las células vesiculares del tejido conectivo (CVT), los gametos maduros (GM), los gametos en desarrollo (GD) y los espacios foliculares (EF) (Figura 5).

Para hacer los conteos de los tipos celulares y tener una representatividad del estado de madurez de los ostiones se tomaron fotos de cinco zonas de la gónada de cada una de las muestras de los diferentes tratamientos. Las observaciones de los componentes de la

gónada se sumaron y se expresaron como fracción del volumen (V_v) expresado en porcentaje:

$$V_v = (\sum cm/n) * 100$$

donde:

cm= sumatoria de las observaciones de los componentes de la gónada

n= número total de conteos realizados

Una representación clara del ciclo gonádico y del tejido de reserva se obtiene mediante los índices gonádico (IG) y somático (IS) que se expresan en porcentaje:

$$IG = V_{vGM} + V_{vGD}$$

$$IS = V_{vAG} + V_{vCVT}$$

Los cambios en los índices gonádico (IG) y somático (IS) pueden ayudar a inferir cuando ocurre la gametogénesis y los procesos de acumulación de reservas.

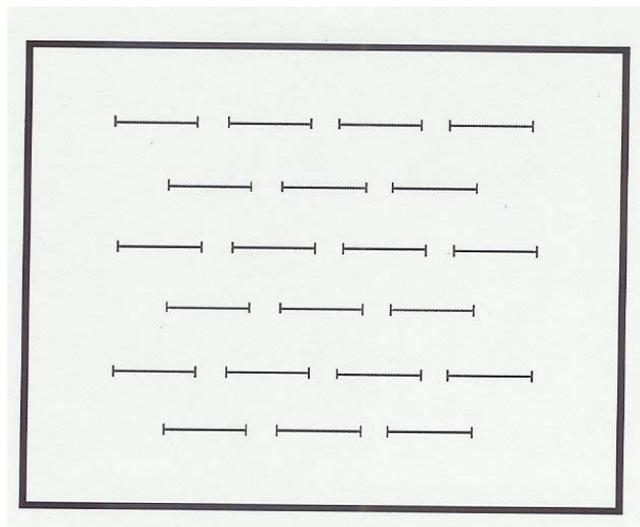


Figura 4. Retícula de Weibel, los extremos de cada línea muestran los lugares de conteo de los componentes de la gónada.

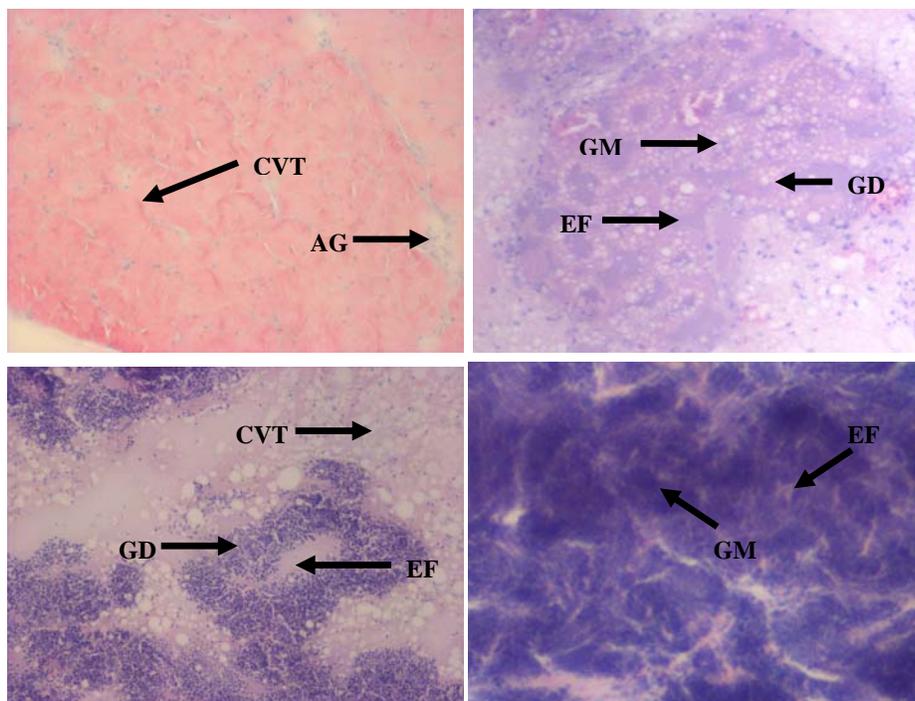


Figura 5. Cortes histológicos de hembras y machos de *C. gigas* donde se observan los componentes celulares de la gónada: las células adipogranulares (AG), las células vesiculares del tejido conectivo (CVT), los gametos maduros (GM), los gametos en desarrollo (GD) y los espacios foliculares (EF)

IV.7.- Análisis estadístico

La temperatura, el oxígeno disuelto, el pH, la salinidad, los compuestos nitrogenados (NAT, NO₂ y NO₃), el peso de los organismos, la talla y la mortalidad se analizaron con una ANOVA de una vía (SAS, 1985, versión 6.12). Cuando se detectaron diferencias significativas en los parámetros, se llevó a cabo una prueba a posteriori de Tukey para encontrar las diferencias entre medias a un nivel de significancia de $P < 0.05$.

Para determinar el efecto de las dietas en el desarrollo gonádico del ostión Japonés se realizó una prueba no paramétrica de Friedman ANOVA con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

Para determinar el efecto de la temperatura en el desarrollo gonádico del ostión japonés se realizó una prueba no paramétrica de Friedman ANOVA con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

V.- RESULTADOS

V.1.- Calidad del agua

En el ensayo en el que se probaron las diferentes dietas no se encontraron diferencias significativas en la temperatura ($P > 0.05$), la temperatura en este experimento osciló entre 20.89 ± 1.7 y 21.15 ± 1.20 °C (Tabla III). No se detectaron diferencias significativas en la concentración de la salinidad, el oxígeno disuelto y el pH entre los tratamientos D1, D2 y D3 (Tabla IV). No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de NH_4 , NO_2 y NO_3 ($P < 0.05$) entre los tratamientos D1, D2 y D3 (Tabla V).

En el ensayo en el que se probaron las diferentes temperaturas, se encontró que en los tres tratamientos la temperatura fue significativamente diferente donde $T_3 > T_2 > T_1$ ($P < 0.0001$) (Tabla III). Se observaron diferencias significativas en la salinidad entre los tres diferentes tratamientos donde $T_3 > T_2 > T_1$ ($P, 0.0001$) (Tabla IV). La concentración de oxígeno disuelto también presentó diferencias significativas, se observó que $T_1 > T_2 > T_3$ ($P < 0.0001$) (Tabla IV). El pH no presentó diferencias significativas entre los tratamientos T1, T2 y T3 a lo largo del experimento (Tabla IV),

No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de NH_4 , NO_2 y NO_3 ($P > 0.05$) entre los tratamientos T1, T2 y T3. (Tabla V).

Tabla III. Temperatura esperada y promedio \pm desviación estándar registrada en los sistemas de recirculación durante el experimento. Subíndices diferentes (a, b, c) y (x, y, z) indican diferencias significativas entre los tratamientos de los dos diferentes experimentos*.

Temperatura (°C)				
Esperado		Observado		
		Promedio	Máximo	Mínimo
D1	20	21.15 \pm 1.20 ^a	23.6	19.5
D2	20	21.11 \pm 1.41 ^a	23.8	19.6
D3	20	20.89 \pm 1.17 ^a	23.3	19.3
T1	16-24	20.04 \pm 1.40 ^z	24.1	15.8
T2	20	21.26 \pm 1.23 ^y	23.9	19.7
T3	24	23.85 \pm 2.01 ^x	26.5	18.6

*D1 = *Tetraselmis* 3600, D2 = *Isochrysis* 1800, D3 = Mezcla de microalgas, T1 = Temperatura variable, T2 = 20°C y T3 = 24 °C.

Tabla IV. Concentración (promedio \pm desviación estándar) de la salinidad, la concentración de oxígeno disuelto y el pH medidos en los sistemas de recirculación durante el experimento. Subíndices diferentes (a, b, c) y (x, y, z) indican diferencias significativas entre los tratamientos de los diferentes experimentos*.

Tratamiento	Salinidad (ppm)	O ₂ (mg/l)	pH
D1	34.4 \pm 1.7 ^a	6.2 \pm 0.6 ^a	7.8 \pm 0.1 ^a
D2	34.7 \pm 1.7 ^a	6.1 \pm 0.6 ^a	7.8 \pm 0.1 ^a
D3	34.4 \pm 1.7 ^a	6.2 \pm 0.5 ^a	7.8 \pm 0.1 ^a
T1	33.8 \pm 1.9 ^z	6.3 \pm 0.5 ^x	7.8 \pm 0.1 ^x
T2	34.7 \pm 1.5 ^y	6.0 \pm 0.5 ^y	7.8 \pm 0.1 ^x
T3	35.3 \pm 1.8 ^x	5.4 \pm 0.6 ^z	7.8 \pm 0.1 ^x

*D1 = *Tetraselmis* 3600, D2 = *Isochrysis* 1800, D3 = Mezcla de microalgas, T1 = Temperatura variable, T2 = 20°C y T3 = 24 °C.

Tabla V. Concentración (promedio \pm desviación estándar) del nitrógeno amoniacal total, los nitratos y los nitritos presentes en los sistemas de recirculación durante el experimento. Subíndices diferentes (a, b, c) y (x, y, z) indican diferencias significativas entre los tratamientos de los diferentes experimentos*.

Tratamiento	NH ₄ (mg/L)	NO ₃ (mg/L)	NO ₂ (mg/L)
D1	0.05 \pm 0.09 ^a	15.21 \pm 5.77 ^a	0.11 \pm 0.14 ^a
D2	0.09 \pm 0.12 ^a	19.90 \pm 8.35 ^a	0.21 \pm 0.16 ^a
D3	0.04 \pm 0.04 ^a	17.92 \pm 9.06 ^a	0.14 \pm 0.15 ^a
T1	0.07 \pm 0.08 ^x	13.54 \pm 5.06 ^x	0.10 \pm 0.14 ^x
T2	0.08 \pm 0.11 ^x	15.42 \pm 5.47 ^x	0.11 \pm 0.10 ^x
T3	0.11 \pm 0.12 ^x	15.52 \pm 5.03 ^x	0.09 \pm 0.11 ^x

*D1 = *Tetraselmis* 3600, D2 = *Isochrysis* 1800, D3 = Mezcla de microalgas, T1 = Temperatura variable, T2 = 20°C y T3 = 24 °C.

V.2.- Parámetros biológicos

V.2.1.- Crecimiento

En el experimento en el que se probaron las tres diferentes dietas no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la longitud y el peso entero final de los ostiones muestreados de los distintos tratamientos. La talla promedio inicial de los tres tratamientos fue de 8.85 ± 1.01 cm de longitud y el peso entero promedio inicial fue de 95.26 ± 22.21 g (Tabla VI). No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el peso húmedo del tejido entre los tratamientos en los que se varió la dieta aunque si se observaron variaciones a lo largo del experimento (Tabla VII).

Tabla VI. Talla inicial y final, peso entero húmedo inicial y final del ostión *Crassostrea gigas* mantenidos durante el experimento. Subíndices diferentes (a, b, c) y (x, y, z) indican diferencias significativas entre los tratamientos de los diferentes experimentos*.

Tratamiento	Talla inicial (cm)	Talla final (cm)	Peso entero inicial (g)	Peso entero final (g)
D1	8.85±1.01 ^a	8.82±0.05 ^a	95.26±22.21 ^a	102.82±8.19 ^a
D2	8.85±1.01 ^a	8.42±0.18 ^a	95.26±22.21 ^a	100.65±10.32 ^a
D3	8.85±1.01 ^a	8.55±0.25 ^a	95.26±22.21 ^a	96.54±4.90 ^a
T1	8.85±1.01 ^x	8.93±0.42 ^x	95.26±22.21 ^x	102.35±7.47 ^x
T2	8.85±1.01 ^x	8.45±0.07 ^x	95.26±22.21 ^x	94.05±1.14 ^x
T3	8.85±1.01 ^x	8.68±0.16 ^x	95.26±22.21 ^x	88.06±6.93 ^x

*D1 = *Tetraselmis* 3600, D2 = *Isochrysis* 1800, D3 = Mezcla de microalgas, T1 = Temperatura variable, T2 = 20°C y T3 = 24 °C.*

Para los tratamientos en los que se varió la temperatura no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la talla y peso entero final (Tabla VI). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la variación del peso húmedo del tejido de los ostiones muestreados a lo largo del experimento (Tabla VII).

V.2.2.- Mortalidad

A nivel de tratamiento se encontraron diferencias significativas ($P=0.03475$) en el experimento donde se varió la dieta. Se encontraron diferencias significativas en la mortalidad en días donde el día 1 fue significativamente diferente y menor que el resto de los días que duro en ensayo ($P < 0.0001$). En el tratamiento D1 (*Tetraselmis* 3600) solo se murió un organismo, lo que equivale a un 99.22 % de sobrevivencia, sin embargo en este experimento la sobrevivencia del tratamiento D2 y D3 no fue menor de 80 % (Tabla VIII).

Para el tratamiento en el que se varió la temperatura no se encontró diferencias significativas en la sobrevivencia ($P > 0.05$) registrada a lo largo del experimento (Tabla VII). Se detectaron diferencias significativas a nivel de días, donde el día 1 presento una mayor mortalidad que el resto de los días ($P < 0.0001$)

Tabla VIII. Porcentaje de sobrevivencia del ostión *Crassostrea gigas* mantenidos en sistema de recirculación en los dos diferentes experimentos*.

Tratamiento	No. Org. Muertos	% Sobrevivencia
D1	1	99.22 ^a
D2	21	83.72 ^b
D3	22	82.95 ^b
T1	10	92.25 ^x
T2	23	82.17 ^x
T3	34	73.64 ^x

*D1=*Tetraselmis* 3600, D2= *Isochrysis* 1800, D3= Mezcla de microalgas, T1=Temperatura variable, T2=20°C y T3= 24 °C.

V.3.- Desarrollo gonadal

V.3.1.- Estadios gonádicos

En el experimento donde se varió la dieta no se encontraron diferencias significativas ($P=0.0752$) en las fases de desarrollo gonadal entre los siete periodos de muestreo de ninguno de los tratamientos (D1, D2 y D3). No fue posible observar una tendencia clara en las observaciones de los estadios de desarrollo gonadal (Tabla IX).

Tabla IX. Desarrollo gonadal del ostión *Crassostrea gigas* de los tratamientos D1, D2 y D3 observados durante el periodo de experimental. Se indica el tratamiento N, número de muestras, M, porcentaje de machos, H, hembras, I, indiferenciados y el número de observaciones de cada estadio.

Tratamiento	Día	N	Sexo %			Estadio				
			M	H	I	1	2	3	4	5
D1	0	28	39	29	32	9	6	4	2	7
	7	9	33	33	33	3	3	2	0	1
	18	5	20	40	40	2	1	1	1	0
	27	9	25	50	25	3	1	1	3	1
	33	7	14	86	0	0	2	0	1	4
	41	9	38	38	25	2	4	0	1	2
	48	9	33	33	33	3	0	1	3	2
	72	6	20	60	20	2	1	1	1	1
D2	0	28	39	29	32	9	6	4	2	7
	7	9	33	11	56	5	4	0	0	0
	18	6	20	80	0	1	2	2	0	1
	27	9	22	67	11	1	2	5	1	0
	33	6	50	50	0	0	2	1	3	0
	41	9	44	33	22	2	3	1	1	2
	48	9	0	56	44	4	0	2	1	2
	72	6	33	67	0	0	0	2	2	2
D3	0	28	39	29	32	9	6	4	2	7
	7	8	38	38	25	2	3	1	2	0
	18	6	50	17	33	2	3	0	1	0
	27	9	63	38	0	0	6	0	1	2
	33	7	33	67	0	0	1	0	3	3
	41	9	33	33	33	3	0	1	2	3
	48	7	50	25	25	2	0	3	3	1
	72	6	17	67	17	1	0	3	2	0

D1 = *Tetraselmis* 3600, D2 = *Isochrysis* 1800 y D3 = mezcla de microalgas

Tabla X. Desarrollo gonadal del ostión *Crassostrea gigas* de los tratamientos T1, T2 y T3 observados durante el periodo de experimental. Se indica el tratamiento N, número de muestras, M, porcentaje de machos, H, hembras, I, indiferenciados y el número de observaciones de cada estadio.

Tratamiento	Día	N	Sexo %			Estadio				
			M	H	I	1	2	3	4	5
T1	0	28	39	29	32	9	6	4	2	7
	7	9	22	67	11	2	0	4	2	1
	18	6	17	33	50	3	1	1	1	0
	27	9	33	33	33	3	1	4	0	1
	33	7	29	57	14	1	2	3	1	0
	41	9	78	22	0	0	3	3	2	1
	48	9	22	67	11	1	1	7	0	0
	72	6	17	33	50	3	0	0	2	1
T2	0	28	39	29	32	9	6	4	2	7
	7	9	50	25	25	3	3	1	2	0
	18	5	20	40	40	2	1	1	0	1
	27	9	22	67	11	1	2	2	4	0
	33	6	50	17	33	2	3	0	1	0
	41	8	22	22	56	4	3	1	0	0
	48	9	50	0	50	4	4	1	0	0
	72	3	33	0	67	2	0	0	1	0
T3	0	28	39	29	32	9	6	4	2	7
	7	9	22	11	67	6	1	1	1	0
	18	6	17	33	50	3	1	0	2	0
	27	9	22	33	44	4	1	2	2	0
	33	6	50	50	0	0	2	1	2	1
	41	9	44	22	33	3	1	5	0	0
	48	9	44	44	11	1	0	6	2	0
	72	6	20	40	40	3	0	1	2	0

T1 = Temperatura variable, T2 = 20°C y T3 = 24 °C

En el experimento realizado para probar el efecto de la temperatura en el desarrollo de las gónadas de reproductores de ostión Japonés no se encontraron diferencias significativas en los estadios de desarrollo gonadal entre los siete periodos de muestreo en ninguno de los tratamientos probados (T1, T2 y T3), en este

experimento tampoco fue posible observar una tendencia clara en las observaciones del desarrollo gonadal (Tabla X).

V.3.2.- Variación de las fracciones de volumen de los componentes de la gónada

El cambio en las fracciones de volumen de los componentes de la gónada, en específico, el incremento en el porcentaje de gametos maduros muestran los cambios obtenidos con cada tratamiento. En los dos experimentos la fracción del volumen de los componentes de la gónada varió a lo largo del experimento (Figura 6 y 7).

En el experimento en el que se varió la dieta el tratamiento D1 (alimentados con *Tetraselmis* 3600) no mostró cambios en el volumen de gametos maduros a lo largo del experimento manteniéndose con valores menores al 13 %. El volumen de células vesiculares de tejido conectivo (CVT) se mantuvo casi constante a lo largo del periodo experimental, además fue en el que se observó el mayor porcentaje de CVT (> 50%) de los tres tratamientos (Figura 6). En el tratamiento D2 (alimentados con *Isochrysis* 1800) el mayor porcentaje de gametos maduros fue de 24.52 % observado al día 33 del periodo experimental. Al igual que en D1, el mayor porcentaje de componente celular fue el CVT (~ 55 %) sin embargo hubo un incremento en GM a partir del día 18 manteniéndose entre 13 y 22 % durante el resto del periodo experimental (Figura 6). En el tratamiento D3 (mezcla de microalgas) se observa una tendencia de aumento en el porcentaje de gametos maduros conforme incrementa el tiempo, el mayor porcentaje de gametos maduros (44.68%) se observó a los 72 días del periodo experimental, el volumen de gametos maduros en el día 72 del periodo experimental del tratamiento D3 presentó diferencias significativas con respecto al volumen encontrado en los tratamientos D1 y D2 en el mismo día (Figura 6).

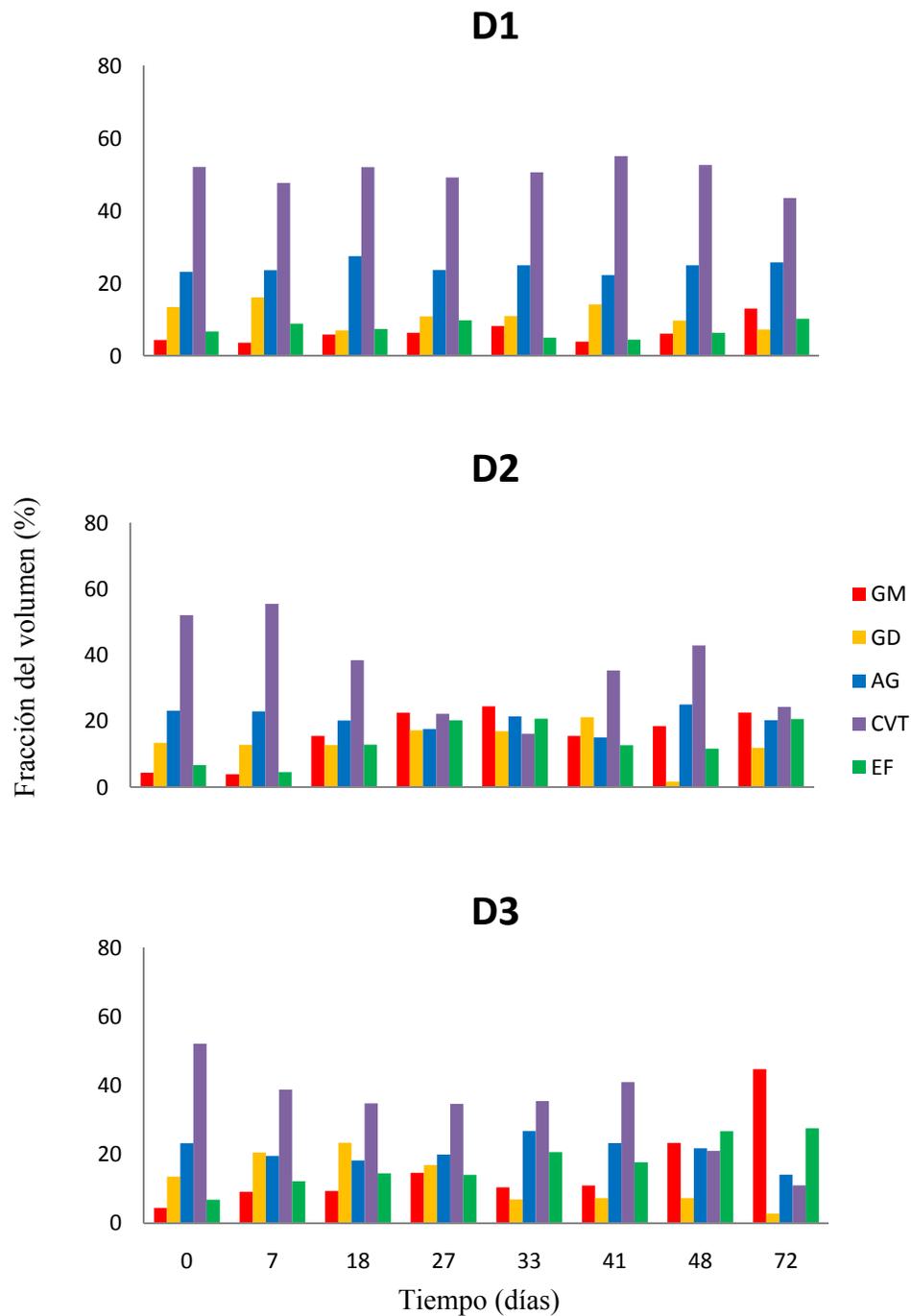


Figura 6. Volumen de los componentes celulares de la gónada de los reproductores de ostión para los tratamientos D1, D2 y D3 (Gametos Maduros (GM), Gametos en Desarrollo (GD), Células Adipogranulares (AG), Células Vesiculares de Tejido Conectivo (CVT) y Espacios Foliculares (EF) (temperatura constante de 20 °C. D1 = *Tetraselmis* 3600, D2 = *Isochrysis* 1800 y D3 = *Tetraselmis* 3600 + *Isochrysis* 1800).

En el experimento en el que se varió la temperatura, el tratamiento T1 (temperatura variable) presentó el porcentaje de gametos maduros más alto de los tres tratamientos con 48.36 % al día 48. Se observa una tendencia a incrementar el volumen de gametos maduros a lo largo del periodo experimental, pero para el día 72 el volumen de gametos maduros disminuyó hasta menos del 10 %. El Tratamiento T2 (20 °C) el porcentaje de gametos maduros se mantuvo muy bajo (máximo 19.79 %), no se observó una tendencia clara en los cambios de volumen de ninguno de los componentes celulares. El tratamiento T3 (24 °C) se observa una tendencia a incrementar el volumen de los gametos maduros con respecto al tiempo, aunque el porcentaje máximo de gametos observados fue de solo 35.67% observado el día 48 del periodo experimental. En este ensayo el mejor tratamiento fue el T1 ya que se observó una tendencia clara en la maduración de las gónadas y el volumen de gametos maduros fue mayor (Figura 7).

V.3.3.- Índice gonádico y somático

La representación gráfica del ciclo gonádico (IG) y del tejido de reserva (índice somático) (IS) muestran con claridad las diferencias cualitativas que hubo entre los tratamientos (Figura 8). En el caso de los tratamientos en los que se varió la dieta D1 (*Tetraselmis* 3600) los dos índices (IG e IS) se mantienen constantes a lo largo del experimento, lo que indica que no hubo cambios en el estadio de maduración de los organismos mantenidos con esta dieta (Figura 8). En el tratamiento D2 (*Isochrysis* 1800) se observa un incremento en el IG y un decremento en el IS entre el día 27 y 33 del periodo experimental, lo que indica un cambio en la maduración de las gónadas de los reproductores, sin embargo el porcentaje del IG es bajo.

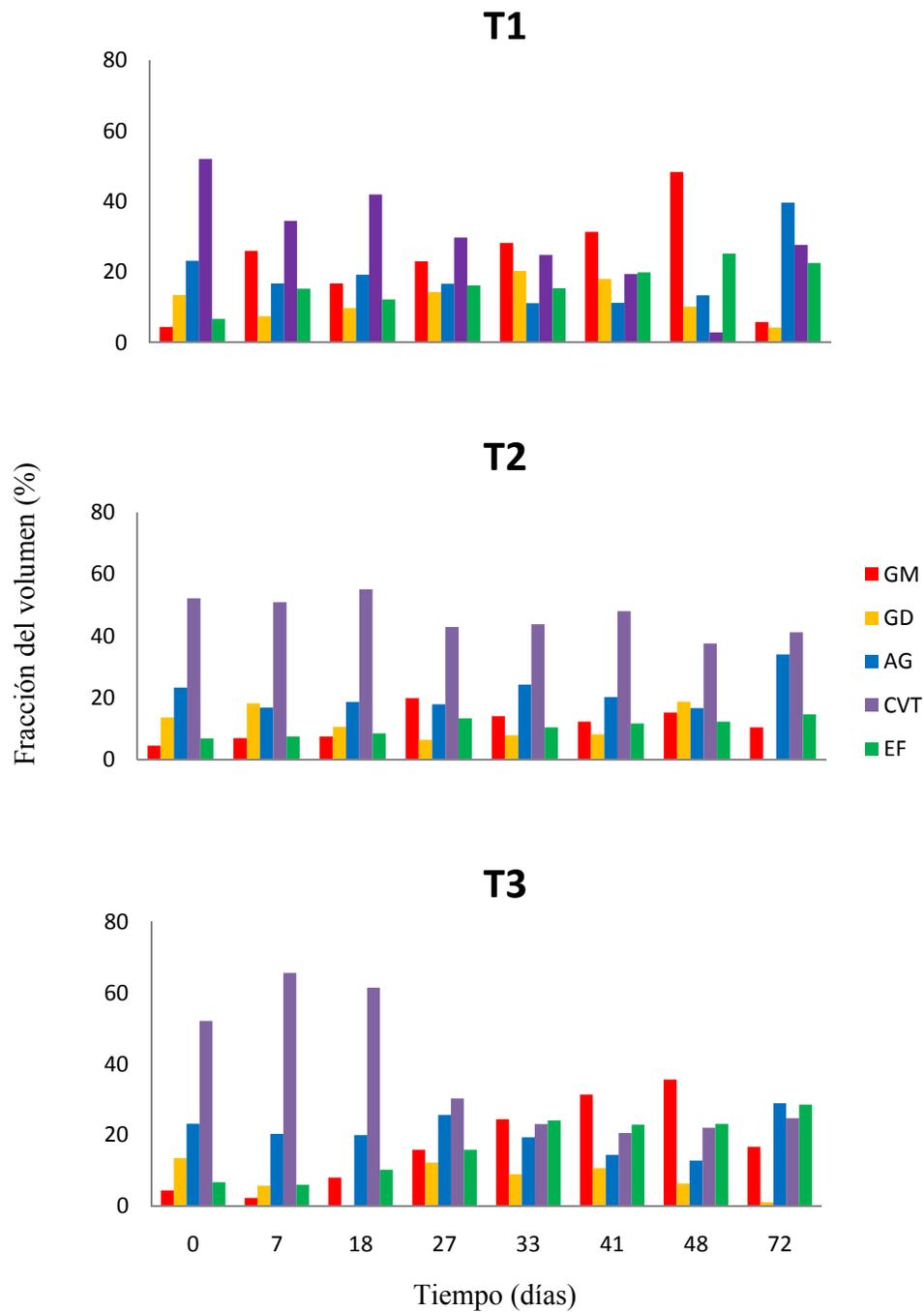


Figura 7. Volumen de los componentes celulares de la gónada de los reproductores de ostión para los tratamientos T1, T2 y T3 (Gametos Maduros (GM), Gametos en Desarrollo (GD), Células Adipogranulares (AG), Células Vesiculares de Tejido Conectivo (CVT) y Espacios Foliculares (EF) (alimentados con la mezcla de microalgas, T1 = temperatura variable, T2 = 20°C y T3 = 24°C).

En el tratamiento D3 (mezcla de microalgas) se observó un cambio en las proporciones de los índices IG e IS para el día 72, la tendencia de incremento en IG del tratamiento D3 es gradual aunque no es posible determinar si la proporción de IG seguiría aumentando después del último muestreo. Con los resultados de proporción de IG en el experimento en el que se varió la dieta no es posible determinar cuál es el mejor tratamiento ya que las proporciones de IG fueron bajas ($< 50\%$) en todas las tres condiciones experimentales (Figura 8).

En el segundo experimento en el que se probaron las tres diferentes temperaturas el tratamiento T1 (temperatura variable) presentó un incremento gradual en el IG hasta el día 48, el porcentaje de IG en este tratamiento llegó hasta más del 60%. Para el día 72 el IG de T1 disminuyó hasta menos del 20 %, lo que indica la presencia de organismos maduros en el día 48 y un posible desove entre los días 48 y 72 (Figura 9). Los índices IG e IS en el Tratamiento T2 (20 °C) se mantuvieron prácticamente constantes durante todo el experimento, solo para el día 72 se observó un decremento en el porcentaje de IG (Figura 9). En el Tratamiento T3 (24 °C) el IG incrementó de forma gradual hasta el día 48 del periodo experimental obteniendo poco más de 40 %. En el día 72, se observó un porcentaje de IG de aproximadamente 20 %, ésta disminución de porcentaje indica un posible desove o reabsorción de gametos en los reproductores mantenidos en las condiciones experimentales de T3 (Figura 9).

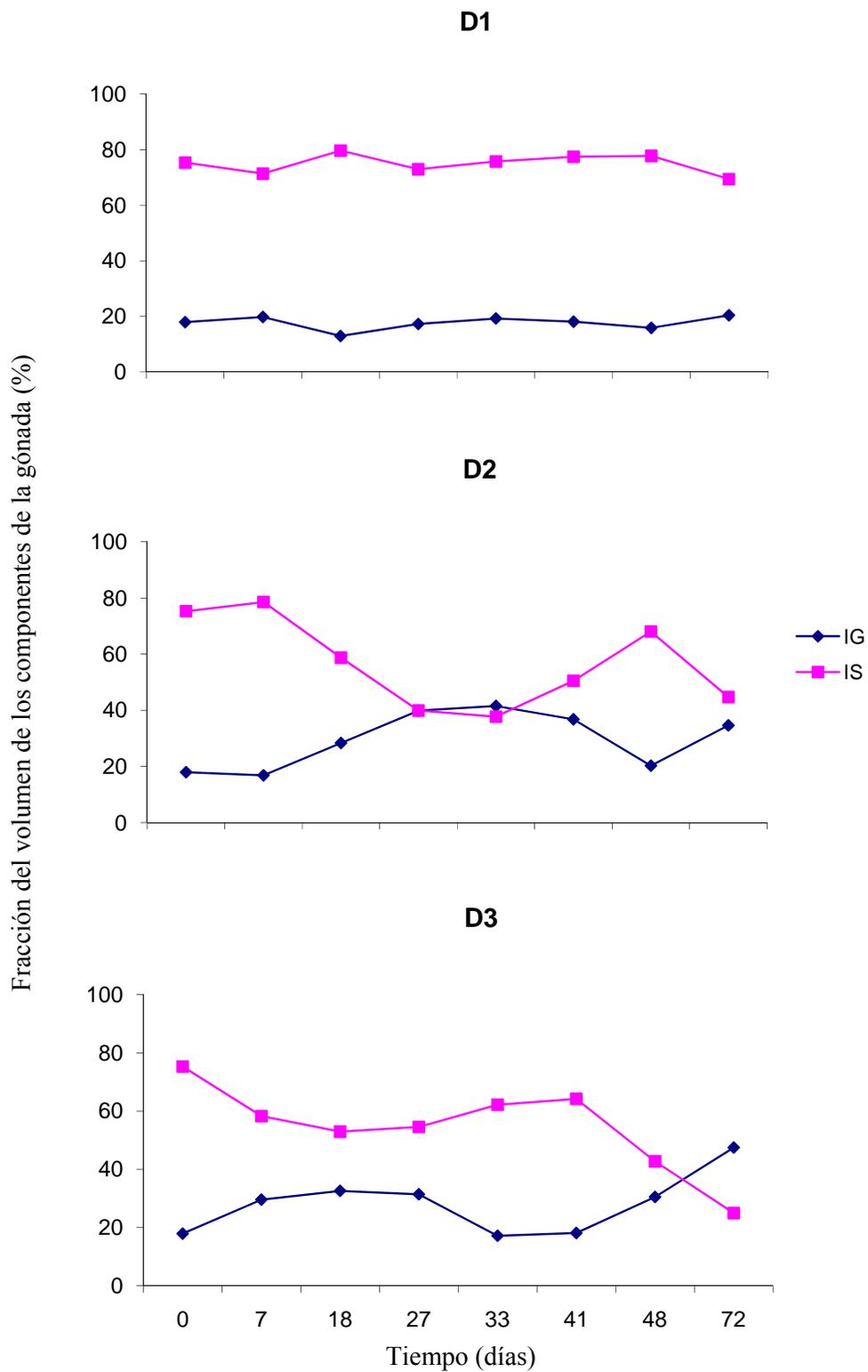


Figura 8. Variación del índice somático (IS) y gonádico (IG) de los ostiones en el tratamiento D1, D2 y D3 (temperatura constante de 20°C). D1=*Tetraselmis* 3600, D2=*Isochrysis* 1800 y D3= mezcla de microalgas.

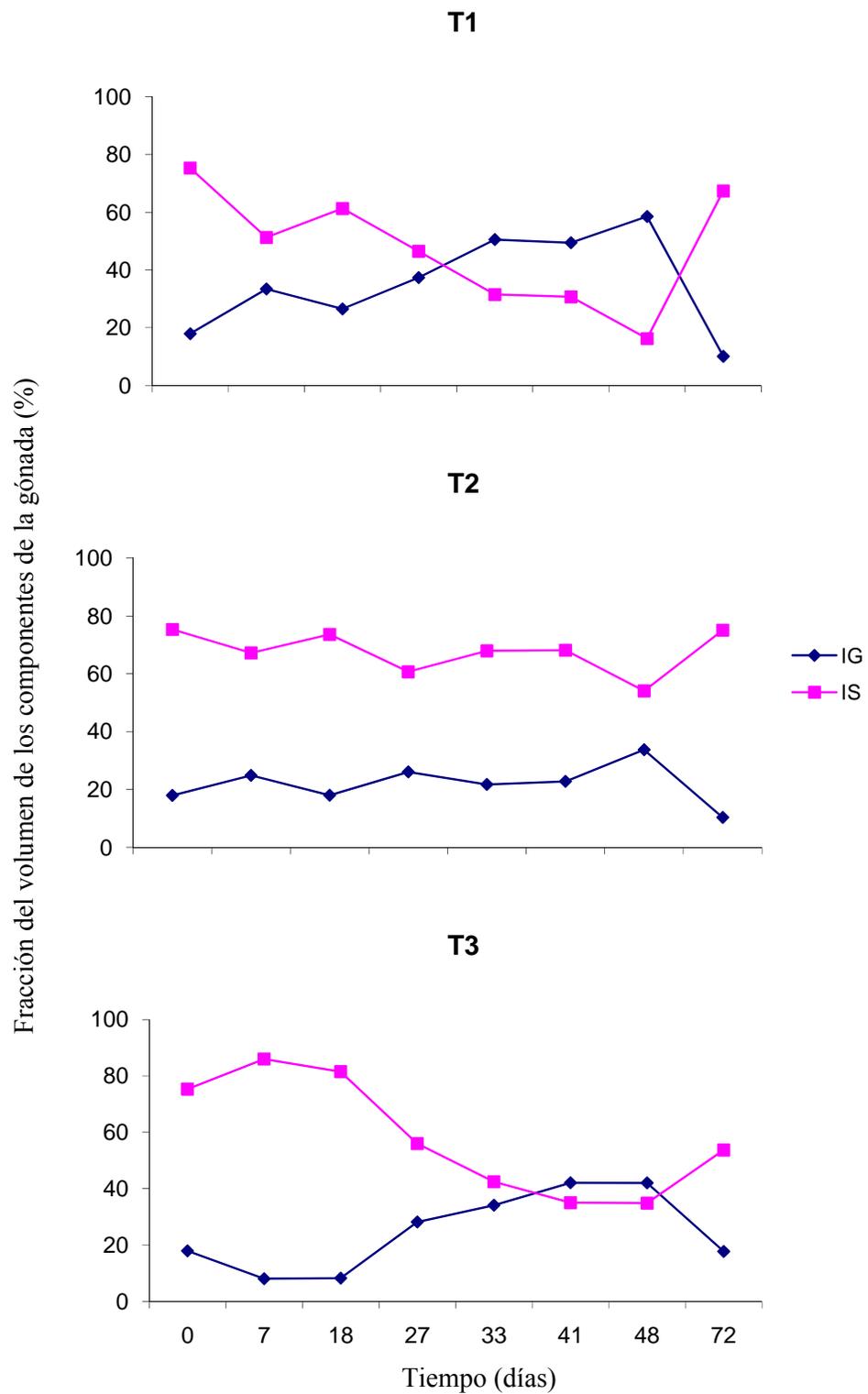


Figura 9. Variación del índice somático (IS) y gonádico (IG) de los ostiones en el tratamiento T1, T2 y T3 (alimentados con la mezcla de microalgas, T1= temperatura ambiente, T2= 20°C y T3= 24°C).

VI.- DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar el conocimiento y la tecnología para poder mantener, acondicionar y madurar ostiones en sistemas de recirculación. Aun cuando ya existen algunos trabajos en los que se han mantenido a los organismos en sistemas de recirculación por periodos largos (Epifanio y Mootz, 1976; Macmillan *et al.*, 1994), son pocos los trabajos en los que se utiliza este tipo de sistemas para manipular el ciclo reproductivo de los ostiones (Buchanan *et al.*, 1998). Una de las ventajas de utilizar los sistemas de recirculación es el bajo gasto de agua (Timmons y Palacios, 2001), a la par permite reproducir condiciones de calidad de agua específicas para cada especie o estadio. Estos sistemas permiten una producción continua a lo largo el año, con volúmenes constantes de producto por medio de la manipulación de las cinco operaciones unitarias (Masser *et al.*, 1998; Timmons *et al.*, 2002). Estas operaciones se incluyeron en el diseño del prototipo esta investigación. En este sistema, para la remoción de sólidos y para la nitrificación se utilizó un filtro de tipo granular de cuentas flotantes de polietileno de baja densidad que llevó a cabo el trabajo de filtración mecánica (remoción de sólidos) y biológica la cual fue llevada a cabo por la técnica de película fija (eliminación de compuestos nitrogenados disueltos) (Malone y Beecher, 2000; Zhu y Chen, 2001). El funcionamiento adecuado de este biofiltro está íntimamente ligado a la cantidad de superficie específica sobre la cual se puedan adherir las bacterias y a la cantidad de oxígeno y nutrientes que puedan obtener que en este caso fue de $(1050 \text{ m}^2/\text{m}^3)$ (Avault, 1996; Timmons *et al.*, 2002). Las desventajas que presenta, es que al proceso de nitrificación lo afecta la acumulación de sólidos, por lo que es necesario retrolavarlos periódicamente para desechar del medio los sólidos

capturados. Este proceso de retrolavado también permite remover el exceso de biopelícula mejorando el proceso de nitrificación (Golz *et al.*, 1999).

Los sistemas de recirculación en acuicultura se consideran sistemas de alto consumo de energía debido a que es necesario mantener recirculando el agua a través del sistema para su constante re-acondicionamiento. El método más común para mantener el agua en movimiento es el uso de bombas centrífugas. Una alternativa en el sistema de bombeo de agua es el uso de bombeo con aire, el cual utiliza el movimiento obtenido por la entrada de burbujas para levantar y mover el agua. Algunos estudios realizados por Reinemann y Timmons (1987) y Turk *et al.* (1991), indican que el uso de bombeo por aireación es substancialmente más eficiente en términos de energía que mover el agua con bombas de tipo centrífugas. Por otra parte, a la par de recircular el agua, este tipo de bombeo permite llevar a cabo la aireación que es el proceso en el que se adiciona aire u oxígeno al agua y la desgasificación, que es el proceso en que se elimina el dióxido de carbono acumulado en el sistema (Losordo *et al.*, 1992a; Loyless y Malone, 1998). El uso de bombeo por aire para recircular el agua en esta tesis permitió mantener óptimas concentraciones de oxígeno disuelto (> 5 mg/L) y al mismo tiempo removió el dióxido de carbono (desgasificación) eficientemente. El bombeo de agua con aire en sistemas de recirculación puede reducir hasta un tercio del costo de energía que se gastaría utilizando sistemas convencionales de bombeo y aireación, además de que la simplicidad del diseño hace que los costos de mantenimiento sean muy bajos (Reinemann y Timmons, 1987).

El bajo consumo de agua, es la mayor ventaja que se presenta en el uso de tipo de sistemas de recirculación ya que solo se recambia el 10 % del volumen total de agua (Timmons y Palacios, 2001). En esta tesis, el recambio de agua fue de 5 % diario de

volumen total. En este caso, al haber realizado, previo a los experimentos, un balance de masa, ayudo a determinar en forma precisa el flujo requerido en base a la biomasa, lo que se vio reflejado en el mantenimiento de niveles óptimos de NAT, NO₂, NO₃, CO₂, SST y el oxígeno disuelto (Timmons *et al.*, 2002; Colt *et al.*, 2006).

La temperatura tiene un efecto indirecto sobre otros parámetros como la salinidad, la concentración de oxígeno disuelto y la tasa de nitrificación. En el caso del primer experimento en el que se variaron las dietas, no se encontraron diferencias significativas en la temperatura de los tres tratamientos de este experimento (D1, D2 y D3) ni en ninguno de los demás parámetros que pudieran ser afectados por la temperatura.

En el segundo experimento en que se vario la temperatura, las diferencias en este parámetro fueron significativas entre los tres tratamientos y su efecto se reflejó en la salinidad y el oxígeno disuelto. Las diferencias en la salinidad entre los tres diferentes tratamientos se explican por las diferentes tasas de evaporación las cuales aumentaron conforme a las temperaturas establecidas para cada tratamiento. La temperatura es uno de los parámetros de mayor importancia ya que afecta directamente diversos procesos fisiológicos de los organismos, como la tasa de respiración, la eficiencia en la asimilación de los alimentos, la tasa de crecimiento y la reproducción (Timmons *et al.*, 2002). Por otra parte, la temperatura tiene un efecto en el control de la gametogénesis y otros procesos fisiológicos pero son complejos y difíciles de explicar (Thompson *et al.*, 1996; Shumway, 1996)

En el caso de la salinidad para tratar de evitar el efecto de este parámetro sobre la gametogénesis de los organismos se trató de mantener en concentraciones constantes. En los tratamientos en los que se varió la dieta, como se menciona anteriormente, no se

encontraron diferencias significativas en la salinidad, sin embargo, durante el desarrollo de este experimento se presentó un decremento brusco en la salinidad (hasta de 6 ppm) en todos los tratamientos, la salinidad se incrementó poco a poco hasta llegar a la concentración del agua de mar que se tiene normalmente en el edificio de Acuicultura del CICESE (36 ppm). En el caso del ostión *C. gigas*, se ha observado que la gametogénesis se afecta de forma negativa cuando la salinidad es menor a 30 ppm (Muranaka y Lannan, 1984), por lo que el desarrollo gonadal pudo verse afectado. El decremento en la concentración de la salinidad pudo hacer que el tiempo de la gametogénesis se incrementara y que no fuera posible observar cambios en el porcentaje de gametos maduros en la mayoría de los días de los tratamientos D1, D2 y D3. En el caso de los tratamientos T1, T2 y T3, si se presentaron diferencias significativas entre los tres tratamientos. En este caso, los tratamientos que presentan la salinidad más baja y más alta son en los que se observa un mayor incremento en el volumen de gametos maduros en este segundo experimento, y en los que fue posible observar los cambios en el volumen de gametos maduros a lo largo del experimento aún cuando las diferencias en el volumen de gametos maduros producidos no sean significativas entre ninguno de los tratamientos. Con esto se puede decir que la combinación de diferentes factores exógenos puede generar resultados similares. En el ostión americano *Crassostrea virginica*, la salinidad es un factor abiótico determinante que afecta todos los procesos biológicos como la alimentación, la respiración, la utilización de las reservas, el desarrollo gonadal, el tiempo de desove, las interacciones parásitos-enfermedades, el crecimiento y la distribución de los organismos (Shumway, 1996).

El oxígeno disuelto también presentó diferencias significativas entre los tres tratamientos del experimento en el que se varió la temperatura. Algunos autores (Timmons *et al.*, 2002; Lekang, 2007) mencionan que el oxígeno disuelto es el parámetro fisicoquímico más importante y crítico y que requiere de monitoreo constante. Uno de los problemas operativos más importantes con la concentración de oxígeno es que la saturación de este compuesto disminuye conforme se incrementa la temperatura, lo cual es lo opuesto para las necesidades básicas para el metabolismo y conversión de alimento de los organismos acuáticos, ya que, al incrementar la temperatura los organismos incrementan su metabolismos y requieren una mayor concentración de oxígeno, mientras que a temperaturas mas bajas los organismos requieren menos oxígeno ya que disminuye su metabolismo. (Avault, 1996; Timmons *et al.*, 2002). En general, se menciona que la concentración de oxígeno más adecuada para que los organismos crezcan más rápido, se alimenten mejor y se mantengan en mejores condiciones no debe ser < 5 mg/l (Timmons *et al.*, 2002). En el segundo ensayo, aún cuando se incrementaba la aireación, la saturación del oxígeno estaba en función de la temperatura del agua en el tratamiento. En este caso, no se inyectó aire por medio de piedras difusoras en el agua, la saturación de oxígeno se llevó a cabo por el bombeo de agua con aire, lo que simplificó la operación del sistema de maduración.

El pH se usa para medir de forma indirecta la salud del biofiltro y la eficiencia de nitrificación. Con el buen manejo del biofiltro (retrolavados periódicos y remoción de los sólidos suspendidos totales) permitió mantener el pH y los compuestos nitrogenados sin diferencias significativas entre los tratamientos de los diferentes experimentos. Buchanan (1998), encontró incrementos en la concentración de los compuestos nitrogenados (NH_4 , NO_2 y NO_3) en su sistema de recirculación para

acondicionar y madurar ostiones *C. virginica*, obteniendo concentraciones tóxicas en los primeros días y fue disminuyendo gradualmente hasta llegar a concentraciones indetectables. De las posibles diferencias entre su trabajo y el expuesto en este documento es el tiempo previo en el que se promovió la fijación y el crecimiento de bacterias nitrificantes (maduración) en el medio filtrante y la manipulación de la proporción carbono: nitrógeno en el biofiltro (Zhu y Chen, 2001). En este trabajo el medio filtrante se mantuvo poco más de dos meses dentro del agua a temperatura ambiente y se adicionaba periódicamente cloruro de amonio como alimento para promover el crecimiento de bacterias nitrificantes.

En el caso del crecimiento en talla de los reproductores de ostión mantenidos en las diferentes condiciones experimentales, se observó en casi todos los tratamientos un decremento en la talla al final del experimento (Tabla VI). La razón por la que el promedio de talla al inicio del muestreo es mayor que el del final, se debió a que todos los organismos se midieron y pesaron antes de distribuirlos en sus respectivos tanques, por lo que no se tiene la talla inicial de cada tanque para poder tomar en cuenta el crecimiento por repetición de cada tratamiento. Las diferencias en el peso entero final se pueden explicar en parte por los cambios en el peso de tejido que se encontraron a lo largo del experimento y que fueron resultado del efecto del tratamiento en la condición o estadio de maduración de las gónadas de los reproductores de ostión. Las variaciones en el peso del tejido a lo largo del experimento son un reflejo del incremento de tejido conectivo o de incremento en la madurez de las gónadas. En los casos de disminución en peso puede ser explicado a la presencia de organismos desovados o en reabsorción.

No se tiene bien definido cuál fue el motivo de la alta mortalidad en algunos de los tratamientos ya que no se hicieron análisis para conocer la causa de su muerte. Son

varias las posibilidades por las que se dan este tipo de eventos, Buchanan *et al.* (1998) quien utilizó un sistema de recirculación para la maduración de reproductores de *C. virginica*, mencionó que la presencia de un agente infeccioso como *P. marinus* puede causar mortalidades altas y una disminución en la condición fisiológica y reproductiva. Otros autores mencionan que la mortalidades de las poblaciones de ostiones se deben a una compleja interacción entre el ambiente y algunos patógenos (Cheney, *et al.*, 2000). Chávez *et al.* (2007) sugieren que el aumento en la mortalidad de los organismos la pueden causar incrementos significativos en la temperatura del agua y a la disponibilidad del alimento, así como por la acelerada actividad reproductiva y los altos índices de condición. En este trabajo sería difícil identificar cual fue la razón de las altas mortalidades, pero se pudo deber a que se aceleró la actividad reproductiva ya que el porcentaje de mortalidad coincide con la observación del incremento en el índice gonádico. El que tuvo el menor cambio en el índice gonádico fue el tratamiento que tuvo el menor porcentaje de mortalidad y el tratamiento que registró mayor mortalidad fue en el que se observó un mayor porcentaje de gametos maduros.

Como se menciona anteriormente, no se encontraron diferencias significativas en los resultados obtenidos de los estadios de desarrollo gonadal entre los siete periodos de muestreo con excepción del tratamiento D3. En los análisis de las fases de madurez, se encontró que los organismos mostraban diferentes estadios en el mismo día de muestreo, la causa probable es que esta especie tiene desoves asincrónicos. Longwell y Stiles (1973), mencionan que la asincronía es para garantizar que no se produzcan cruces consanguíneos, y así se disminuye la endogamia evitando la disminución de la sobrevivencia larval, esta estrategia reproductiva también fue observada por Paniagua y Acosta (1995). En este trabajo al examinar el desarrollo gonadal por separado se

encontró dicha asincronía entre machos y hembras, pero debido a la baja cantidad de organismos muestreados por semana, no fue posible separar los sexos para tratar de encontrar diferencias significativas en los estadios de desarrollo ya que había muestras en las que no se encontraron machos o hembras en el mismo muestreo.

La alimentación junto la temperatura, son los dos factores exógenos más importantes en la gametogénesis de los moluscos bivalvos (Thompson, *et al.*, 1996; Gosling, 2003). El alimento que se utiliza normalmente en los laboratorios de producción de semilla de ostión es una mezcla de diferentes microalgas (Robinson, 1992b), normalmente la combinación de varias especies de microalgas acelera el crecimiento (Romberger y Epifanio, 1981; Tan Tiu *et al.*, 1989), el acondicionamiento y maduración de las gónadas de los ostiones, mejorando la calidad y cantidad de huevos producidos (Utting y Millican, 1997; Epifanio y Mootz, 1998, Hurtado *et al.*, 2008). Estas cualidades se atribuyen a que la combinación de microalgas provee una mezcla balanceada de nutrientes esenciales (Webb y Chu, 1983). Berge y Barnathan (2005), mencionan que para la almeja *Pecten maximus*, una dieta de varias especies de microalgas es necesaria para obtener los nutrientes necesarios (ácidos grasos insaturados n-3) para obtener una mayor concentración de lípidos en los ovocitos y posteriormente un mejor porcentaje de eclosión. En el experimento en el que se variaron las dietas el volumen de gametos maduros no presentó diferencias significativas entre los tratamientos D1, D2 y D3 durante los primeros 48 días del periodo experimental, fue hasta el día 72 en el que el tratamiento D3 (mezcla de microalgas) presentó un incremento significativo en el volumen de gametos maduros siendo al final el mejor de los tratamientos de este experimento en relación a la producción de gametos maduros.

Prácticamente todos los laboratorios utilizan alimento del medio natural bombeando agua directamente desde esteros o del mar para alimentar a sus reproductores, también es común que algunos produzcan microalgas vivas para alimentar tanto a reproductores como a la semilla que producen. En este trabajo se utilizaron dietas en pasta, este tipo de alimento ya se ha utilizado por otros autores para evaluar el crecimiento y la sobrevivencia de semilla de ostión y mencionan que no existe diferencia en el desarrollo y sobrevivencia comparado con lo obtenido alimentando a los organismos únicamente con microalgas vivas (McCauslan, *et al.*, 1999). La razón por la que se utilizó la pasta en este trabajo fue para tratar de disminuir los costes de la alimentación. La ventaja de utilizar las pastas como alimento para los reproductores es que es posible tener una disponibilidad constante de alimento en altas concentraciones sin el gasto de bombeo, ni de nutrientes y demás equipo para producir las microalgas vivas. Buchanan (1998) utilizó microalgas en pasta para alimentar a reproductores de ostión mantenidos en un sistema de recirculación y encontró niveles altos de gametogénesis y poca mortalidad, aunque menciona que los resultados de gametogénesis que obtuvo en el sistema de recirculación fueron menores a los encontrados en el medio natural y menciona que posiblemente fue debido a la falta de una mejor y mas completa dieta. Para este trabajo el mayor volumen de gametos maduros se observó en el tratamiento en el que se adiciono una dieta mixta (D3), los organismos que se alimentaron con una dieta monoespecífica no presentaron mortalidades altas y se mantuvieron con índices somáticos (IS) altos, lo que comprueba que las dietas con mezcla de microalgas tienen un efecto en la gametogénesis de los reproductores de ostión.

Cacéres *et al.* (2004), describieron el ciclo gonadal de *C. gigas* en dos localidades de Bahía Falsa, Baja California México, una de las cuales es de donde se obtuvieron los organismos para este experimento. Ellos empezaron a observar gametos maduros desde febrero con un máximo en mayo y junio y mencionan que los periodos no reproductivos se observan desde septiembre hasta enero. Paniagua y Acosta (1995) también describen el ciclo gonadal de *C. gigas* cultivados en Bahía Falsa, ellos encontraron el mayor porcentaje de gametos maduros en los meses de septiembre y octubre (37%) y el mínimo porcentaje de gametos maduros en abril (7%), también mencionan haber encontrado desoves parciales desde julio hasta octubre. En esta tesis los organismos fueron recolectados de la misma zona (denominada “La Boca”) de donde obtuvieron sus resultados Paniagua y Acosta (1995) y Cacéres *et al.* (2004) durante el mes de mayo y el primer muestreo (día cero) se realizó en los primeros días de junio por lo que en teoría según la descripción del ciclo gonádico realizado por Cacéres *et al.* (2004), los organismos deberían de estar en su máximo grado de madurez para esta fecha; sin embargo, en el primer día de muestreo se encontró uno de los porcentajes más bajos de gametos maduros. Los mayores porcentajes de maduración en los organismos muestreados en el mes de agosto se encontraron en los tratamientos D3, T1 y T3 que aparentemente mostraron un adelanto de un mes al ciclo gonádico en relación a lo descrito por Paniagua y Acosta (1995). Solo en el D2 se observó un mayor porcentaje de gametos maduros (para ese tratamiento) a mediados de julio (día 33), aunque la presencia de gametos maduros es muy baja en casi todos los tratamientos, solo en el tratamiento D3 el volumen de gametos maduros (44 %) fue significativamente diferente a los volúmenes obtenidos en los demás tratamientos. Sin

embargo, el tratamiento T1 también presenta volumen alto de gametos maduros (48%) aunque no es significativamente diferente.

Las diferencias observadas en los periodos del ciclo reproductivo de la misma especie y en la misma localidad puede estar relacionada a las variaciones en las condiciones ambientales que ocurren en cada año en particular (Seed 1976), aunque también se sugieren que se deben a la variación genética de las poblaciones sembradas (Barber, *et al.*, 1991). Gosling (2003) menciona que los factores ambientales que mayor efecto tienen en la regulación de la gametogénesis son la temperatura, el alimento, la salinidad y el fotoperiodo. En este trabajo no se varió el fotoperiodo, pero si hubo cambios y diferencias entre los tratamientos en la temperatura, el alimento (dieta) y la salinidad.

Mann (1979) usó el concepto de Grados-Día (day-degree) para calcular el tiempo de exposición requerida a cierta temperatura para lograr la maduración de *C. gigas* y encontró que existe un mínimo absoluto de requerimiento de temperatura para estimular la gametogénesis. Este método también lo describen Utting y Spencer (1991) y mencionan que, para la mayoría de los ostiones, D° (grados-día) está entre 300 y 500 y que la temperatura a la que la mayoría de las especies de ostión pueden empezar a desarrollar gónada es de 10 a 14 °C. Siguiendo la ecuación de grados día para los tratamientos D1, D2 y D3 el tiempo para llegar a la maduración de las gónadas sería de 30-50 días, en el tratamiento D1 no se encontró un incremento en el porcentaje de gametos maduros. En el D2 se observó un incremento del porcentaje de gametos maduros en el tiempo estimado con la fórmula de Mann (1979), aunque el porcentaje fue bajo y en el D3 el incremento en el volumen de gametos maduros se observó hasta los 72 días y no entre los 30 y 50 días. Para los tratamientos T1, T2 y T3 los valores de

los días necesarios para encontrar organismos maduros no coincide con los obtenidos con la fórmula de Mann (1979). Estas diferencias en el desarrollo gonádico que existe entre lo que se describe por Paniagua y Acosta (1995), Cacéres *et al.* (2004) y los resultados obtenidos con la fórmula descrita por Mann (1979) sugieren que los tratamientos evaluados tienen un efecto directo sobre el tiempo en el que se puede llevarse a cabo la maduración y sobre el volumen de gametos obtenidos. En base a estos resultados, el concepto de Grados-Días debe modificarse para el acondicionamiento y maduración de bivalvos cultivados en un sistema de recirculación, ya que las temperaturas y dietas se pueden manipular o en su defecto crear un nuevo concepto sobre este método. En el trabajo de Chávez *et al.* (2002), los resultados de la observación de los gametos maduros encontrados en los experimentos coinciden con los que se obtienen al calcularlos con la fórmula descrita por Mann (1979). Chávez *et al.* (2002) también ajustaron sus resultados y obtuvieron un modelo para predecir el crecimiento de los oocitos utilizando la temperatura y el tiempo como los parámetros principales que coincide con los resultados que se obtienen con la fórmula de D°. Chávez *et al.* (2002), menciona que a pesar de que el modelo se ajusta bien a los resultados obtenidos es necesario aplicarlo para probar su eficiencia. Además es necesario experimentar para crear otros modelos fisiológicos en los que se integren más parámetros incrementen la gametogénesis de los ostiones. Estos modelos ya se han descrito para explicar el crecimiento en otras especies de moluscos (Ross y Nibeth, 1990, Pouvreau *et al.*, 2000). En cuanto a la dieta, el tratamiento D3 (mezcla de microalgas) fue la que mayor porcentaje de gametos maduros produjo al final del periodo experimental y fue el único tratamiento en el que se observó una diferencia significativa, estos resultados coinciden con los obtenidos por Romberguer y Epifanio

(1981) y Tan Tiu *et al.* (1989) que mencionan que la mezcla de microalgas acelera el crecimiento, el acondicionamiento y maduración de las gónadas. Además, Utting y Millican (1997), Epifanio y Mootz (1989) y Hurtado *et al.* (2008) agregan que se mejora la calidad de los gametos e incrementa la cantidad de gametos producidos.

En este estudio, el desarrollo de los gametos no se presentó de forma clara entre los tratamientos probados y no se pudo encontrar diferencias significativas, aunque se observaron algunas tendencias. Las condiciones experimentales de los tratamientos D1 y T2 lograron mantener a los organismos con índices somáticos altos durante un periodo más largo que el que presentan en el medio natural. Estas diferencias permitirían mantener un grupo de reproductores con índices somáticos (IS) altos durante periodos largos de tiempo y cambiarles las condiciones ambientales cuando sea necesario para que se favorezca la maduración de las gónadas y obtener gametos maduros para obtener larvas y semilla en épocas del año en las que no es común encontrarlos. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos es evidente que es posible manipular el acondicionamiento y maduración de los reproductores de ostión Japonés *C. gigas* en el prototipo en el prototipo de sistema de recirculación que se diseñó para este experimento, además se abren las puertas a nuevas opciones de biotecnias diferentes para la maduración de ostión que permitan sacar mejor provecho de los organismos cultivados.

El proceso reproductivo es bien conocido en el ostión japonés. Se sabe que los eventos reproductivos están coordinados por factores endógenos, como la cantidad de nutrientes almacenados y presencia de diversos compuestos neuroendocrinos, y por factores exógenos tales como la salinidad y la temperatura. Sin embargo, en un sistema de recirculación donde los factores exógenos se pueden manipular, es necesario volver a

definir y delimitar la importancia de cada uno de ellos y considerar otros que se van a generar con los altos tiempos de residencia hidráulica. Al controlar la cantidad de alimento y los intervalos de temperatura vamos a poder enfocarnos en entender la interrelación entre el almacenamiento de energía (glicógeno), el crecimiento y la reproducción con el fin de lograr eventos reproductivos sincronizados y exitosos.

VII.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

VII.1.- Conclusiones

- Los parámetros de calidad de agua se mantuvieron dentro de los intervalos aceptables por lo que en términos generales el prototipo de sistema de recirculación diseñado es eficiente para los propósitos establecidos en este trabajo.
- No hay diferencias significativas que sugieran que alguna de las dietas probadas en este experimento presenta ventajas en la maduración de los reproductores de ostión.
- El tratamiento D1 (alimentados con *Tetraselmis* 3600 y mantenidos a 20 °C), se puede utilizar si se desea mantener a los reproductores de ostión con alto volumen de tejido conectivo y sin gametos maduros hasta que el productor necesite madurarlos para obtener semilla.
- El tratamiento D1 fue el mejor tratamiento en términos de sobrevivencia.
- En este estudio no se encontraron diferencias significativas que sugieran que alguno de los tratamientos de temperatura presente ventajas en la maduración de reproductores de ostión.
- A pesar de no encontrarse diferencias significativas, el tratamiento T1 (alimentados con mezcla de microalgas y mantenidos con variación de temperatura) puede servir para obtener mayor volumen de gametos maduros en

vez de utilizar tratamientos convencionales en los que se mantienen a los organismos a temperaturas elevadas (20- 24 °C) constantes para su maduración.

- Es posible realizar observaciones de desarrollo gonadal utilizando como metodología histológica muestras tratadas en congelación y cortadas en el criostato.

VII.2.- Recomendaciones

- Es necesario realizar estudios en los que se prueben diferentes intervalos de temperatura para evaluar si es posible incrementar el volumen de gametos maduros producidos en los reproductores de ostión y comparar si hay diferencias en la mortalidad.
- Es recomendable realizar estudios en el que se pueda manipular el acondicionamiento y maduración de los organismos cuando éstos estén en su mayoría recién desovados para evaluar mejor el desarrollo gonadal bajo los tratamientos elegidos.
- Es necesario manipular los parámetros de calidad de agua y alimentación que duren más tiempo para conservar los cambios que existen en periodos más largos.

LITERATURA CITADA

- Avault, J.W. 1996. Fundamentals of aquaculture. AVA Publishing Company Inc. Baton Rouge, LA. 889 pp.
- Badillo, C. 2006. Utilización de micropartículas inertes y alimentación en pulsos como alternativas para el cultivo de postlarvas tempranas del ostión, *Crassostrea gigas*. Tesis de licenciatura. UABC. FCM. Ensenada, Baja California, México. 53 pp.
- Barber B., Ford, S., Wargo, R. 1991. Genetic variation in the timing of gonadal maturation and spawning of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Biol. Bull. 181: 216-221 p.
- Berge, J.y G., Barnathan. 2005. Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. Advances Biochemical and Biotechnology 96: 49-125 p.
- Bolton, E., (Editor), 1982. Intensive Marine Bivalve Cultivation in Controlled Recirculating Seawater prototype System. University of Delaware. U. S. 165 pp.
- Breese, W. y R. Malouf. 1975. Hatchery manual for the pacific oyster. Oregon State University. Sea Grant College Program. Publication no. ORESU-H-75-002. Agricultural Experiment station. Special Report no. 443.
- Brown, M. y A. McClausland. 1999. Increased production of juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) through supplementary feeding. Fisheries Research and Development Corporation. 159 pp.
- Brown, M., 2002. Nutritional value of microalgae for aquaculture. In: Cruz, L, D. Ricque, M., Tapia, M., Gaxiola, M., Simoes, (Editores), Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Briarty, L.G. 1975. Stereology: methods for quantitative light and electronmicroscopy. Science Progress. 62: 1-32 p.
- Burris, V.L., D. F. McGinni, J. C. Little. 2002. Predicting oxygen transfer and water flow rate in airlift aerators. Water Research. 36: 4605-4615 p.

- Buchanan, J. T., G. S. Ruppolo, J. E. Supan y T. R. Tiersch. 1998. Conditioning of de Eastern Oyster in a closed recirculating system. *Aquaculture Research*. 17: 1183-1189 p.
- Cáceres J., S. Curiel, R. Vásquez y P. Macías. 2004. Reproductive cycle and mortality of the Japanese, Oyster *Crassostrea gigas* cultured in Bahía falsa, Baja California, México. *Journal of Shellfish Research*. 23: 3, 195-801 p.
- Castagna, M., M. Gibbons y K. Kurkowski. 1996. Culture application. In: Kennedy, V., R. Newell y A. Eble (Eds.). 1996. The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. 675-690 p.
- Chávez, J., C. Mingant, J. Cochard y M Le Pennec. 2001. Gametogenese chez l'huitre *Crassostrea gigas* de l'Alber Benoit (Bretagne, France). A la limite nord de son aire de reproduction. *Haliotis*. 30: 1-12 p.
- Chávez, J., J. Pommier, J. Andriamiseza, S. Pouvreau, J. Barret, j. Cochard y M. Le Pennec. 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: Origen and temperature effect. *Aquaculture*. 214: 115-130 p.
- Chávez, J., J. Cochard, M. Le Pennec, J. Barret, M. Enríquez y C. Cáceres. 2003. Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*. 22 (3): 721-731 p.
- Chávez J., R. Villelas y C. Cáceres. 2007. Reproduction, Condition and Mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, Mexico. *Aquaculture Research*. 38, 268-278.
- Cheney, D. P., B. F. MacDonald y R. A., Leston, 2000. Summer mortality of Pacific oysters. *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *Journal of Shellfish Research*, 19, 353-359.
- Cordero, B., D. Voltolina. 1994. Growth of *Mytilus galloprovincialis* fed with four microalgae and two feeding regimens. *Journal of World Aquaculture Society*. 25(3): 471-475 p.
- Coutteau, J. y P. Sorgeloos. 1992. The use of algal substitutes and the requirement of live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *Journal of Shellfish Research*. 11: 467-476 p.
- De la Rosa, J., M. T. Gutierrez y R. Radilla, 1991. El ostricultivo en Bahía San Quintín, B.C., México: Aspectos geneticos. *Ciencias Marinas*. 17(3): 133-145 p.

- Epifanio, C. y C. Mootz. 1976. Growth of oysters in a recirculating maricultural system. Proc. National Shellfish Association. 65: 32-36 p.
- Fabiux, C., A. Huvet, P. Le Souchu, M. Le Penne y S. Pouvreau, 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. Aquaculture. 250: 458-470 p.
- FAO, (2008). El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA). SOFIA – 2006. FAO Departamento de Pesca y Acuicultura, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 170 pp.
- Gallager, S.M. y R. Mann. 1986. Growth and survival of larva of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. Aquaculture. 56: 105– 121 p.
- Golz, W. J.,K.A. Rusch y R. F. Malone. 1999. Modeling the major limitations on nitrification in floating-bead filters. Aquaculture Engineering 20:43 -61 p.
- Gosling, E. 2003. Bivalve Molluscs. Biology, Ecology and Culture. Fishing News Books una division de Blackwell Publishing. Iowa. 443.
- Grant, J. y P. J. Cranford. 1989. The effect of laboratory diet conditioning on tissue and gonad growth in the sea scallop *Placopecten magrllanicu~*. In: Ryland, J.S., Tyler, P.A. (Eds.), Proceedings of the 23rd European Marine Biology Symposium: Reproduction, Genetics and Distributions of Marine Organisms, 5-9 September 1988, School of Biological Sciences, University of Wales. Swansea. Olsen and Olsen.Denmark.. 955-105 pp.
- Gutierrez, M. T. 1988. Utilizacion de productos en la alimentacion de las larvas de ostión japonés *Crassostrea gigas* (Thundberg) en condiciones de laboratorio. Tesis de Maestria. C.I.C.E.S.E., Ensenada, Baja California. 67 pp.
- Humason, G. L. 1967. Animal Tissue Techniques. (Ed.). W. H. Freeman and Company. Second Edition. San Francisco. 569pp.
- Hurtado, M. A. y J.L. Ramirez, C. Rodriguez-Jaramillo, D.Tovar, A.M. Ibarra, P. Soudant y E. Palacios. 2008. Comparison of continuous and batch feeding systems on maturation, biochemical composition and immune variables of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951). Aquaculture Research 1-9.

- Ibarra, S. E. 1980. Lagunas costeras de Baja California. Ciencia y Desarrollo XVI. 92: 39-49 p.
- Laing, I. 1987. The use of artificial diets in rearing bivalve spat. Aquaculture. 65: 243-249 p.
- Laing, I. y Millican, 1986, Relative growth efficiency of *Ostrea edulis* L. spat fed various algal diets. Aquaculture 54: 245-262 p.
- Laing I., y P., Millican, 1992. Indoor nursery cultivation of juvenile mollusks using diets of dried algae. Aquaculture. 102: 231-243 p.
- Lango, F., J. Chávez, J., Cochard y M. Le Penne. 2000. Oocyte size, a jeans to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassosrea gigas* (Thunberg). Aquaculture. 190: 183-199 p.
- Lanza Espino, G. 1998. Aspectos fisicoquímicos que determinan la calidad de agua. En: Ecología de los sistemas acuícolas. L.M. Martinez (Editor). AGT Editor. México. 227 pp.
- Lara, J. R. 1975. Ciclo anual de clorofilas y producción orgánica primaria en Bahía San Quintín, B. C. Tesis de Licenciatura Escuela Superior de Ciencias Marinas. U.A.B.C. Ensenada, Baja California. 89 pp.
- Lekang, O. I. 2007. Aquaculture engineering. Blackwell Publishing, Markono Print Media, Singapore, Hong Kong. 340 pp.
- Libey, G.S. 1993. Evaluation of a drum filter for removal of solids. In J.K. Wang, editor. Techniques for modern aquaculture. American Society of Agricultural Engineers, St. Joseph, Michigan. pp 519-532.
- Longwell A.C. y S. S. Stiles. 1973. Oyster genetics and the probable future role of genetics in aquaculture. Malacological Review. 151-177 p.
- Losordo, T.M; J. Rakocy y M. Masser. 1992a. Recirculating Aquaculture Tank Production Systems: component options. Southern Regional Aquaculture Center. Fact Sheet No. 453
- Losordo, T.M; M. Masser y J. Rakocy, 1992b. Recirculating Aquaculture Tank Production Systems: an overview of critical considerations principles of biofiltration. Southern Regional Aquaculture Center. Fact Sheet No. 451.

- MacMillan R., R. Crawthorn, S. Whyte y P. Lyon. 1994. Design and system maintenance of a closed artificial seawater system for longterm holding of bivalve shellfish. *Aquaculture Engineering*. 13: 241-250 p.
- McCausland M., M. Brown, S. Barrett, J. Diemar, M. y Heasman 1999. Evaluation of live microalgae and microalgae pastes as supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 174: 323-342 p.
- Malone, R. F. y L.E. Becheer. 2000. User of floating bead filters to recondition recirculating waters in warm water aquaculture production systems. *Aquaculture Engineering* 22: 57-73 p.
- Mann, R. 1979. Some biochemical and physiological aspects of the growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *Journal of Marine Biology Association. U. K.* 59: 95-110 p.
- Martoja, R. y M. Martoja. 1967. In: Mason et cie (Ed). *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Paris, p. 1232.
- Masser, M. P., J. Rakocy y T. M. Losordo. 1998 *Recirculating aquaculture tank production systems*. Southern Regional Aquaculture Center No. 452. 11 pp.
- Matthiessen, G. 2001. *Oyster Culture*. Fishing News Books. Osney Mead, Oxford. 162 pp.
- McCausland, M., M. Brown, S. Barret, J. Diemar y M. Heasman. 1999. Evaluation of live and pasted microalgae as supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 174: 323-342 p.
- MacMillan, R. J. R. J. Cawthorn, S. K. Whyte & P. R. Lyon. 1994. Design and System maintenance of a closed artificial seawater system for long term holding of bivalve shellfish. *Aquaculture. Engineering*. 13:241-250 p.
- Millican, P. y M. Helm. 1994. Effects of nutrition on larvae production in the European flat oyster. *Ostrea edulis*. *Aquaculture*. 123, 83-94 p.
- Muranaka, M.S. y J. E. Lannan. 1984. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture*. 39: 217-228 p.

- O'Connor, W., M. Heasman y S. O'Connor, 2000. Algal diets for broodstock maintenance of the doughboy scallop *Mimachlamys asperrima* (Lamarck). *Aquaculture Research*. 31: 627-635 p.
- Paniagua, C. y M. Acosta. 1995. Desarrollo gonadal de *Crassostrea gigas* en Bahía San Quintín, Baja California, México. *Ciencias Marinas*, 20 (2): 225-242 p.
- Powell, E., E. Bochenek, J. Klinck y E. Hofmann. 2002. Influence of quality and quantity on the growth and development of *Crassostrea gigas* larvae: a modeling approach. *Aquaculture*. 210: 89-117 p.
- Pouvreau, S., Tiapari, J., Gangnery, A., Lagarde, F., Garnier, M., Teissier, H., Haumani, G., Buestel, D., Bodoy, A., 2000. Growth of black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, in suspended culture under hydrobiological conditions of Takapoto lagoon (French Polynesia). *Aquaculture*. 184: 133-154 p.
- Pronker, A.E., N.M. Nevejan, F. Peene, Geijssen, P. Sorgeloos. 2008. Hatchery broodstock conditioning of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758). Part I. Impact of different micro-algae mixtures on broodstock performance. *Aquaculture International* 16, 297-307.
- Price, K. S. & D. Maurer. 1971. Holding and spawning Delaware Bay oysters (*Crassostrea virginica*) out of season II. Temperature requirements for maturation of gonads. *Proc. Natl. Shellfish. Assoc.* 61:29-34.
- Reinemann, D. J. y M. B. Timmons. 1987. Prediction of oxygen transfer and total dissolved gas pressure in airlift pumping. *Aquacultural Engineering*. 8: 29-46 p.
- Robinson, A. 1992a. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas* kumamoto (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oyster and larval culture. *Aquaculture*. 106: 89– 97 p.
- Robinson, A., 1992b. Dietary supplements for reproductive conditioning of *Crassostrea gigas* Kumamoto (Thunberg). I. Effects on gonadal development, quality of ova and larvae through metamorphosis. *Journal of Shellfish Research*. 11 (2): 437-441 p.
- Ross, A. y R. Nibet. 1990. Dynamic models of growth and reproduction of the mussel *Mytilus edulis* L. *Funct. Ecol. E.* 777-787 p.
- SAGARPA, 2001. Anuario Estadístico de Pesca. Gobierno de México. Poder Ejecutivo Federal.

- Seed, R. 1976. Ecology. In: *Marine Mussels: their Ecology and Physiology* (ed. B.L. Bayne) Cambridge University Press, Cambridge. 13-65 pp.
- Seed, R. y T. H. Suchanek. 1992. Population and community ecology of *Mytilus*. En: E. Gosling (Ed). *The Mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier, Amsterdam. 87-157 p.
- Simmonel, I., G. D. Boardman, B. J. Waten y B. L. Brazil. 2002. Factor influencing the nitrification efficiency of fluidized bed filter with plastic bead medium. *Aquacultural Engineering*. 26: 41-59 p.
- Spencer, B., M. Akester y I. Mayer. 1986. Growth and survival of seed oysters in outdoor pumped upwelling systems supplied with fertilized sea water. *Aqueaculture*. 55: 173-189 p.
- Steel, S. y M. F. Mulcahy. 1999. Gametogenesis of oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 70: 673-668 p.
- Stephenson, R. 1973. Some aspects of reproduction of the oyster (*Ostrea edulis* L.) in the field and laboratory. Ph. D. Thesis, Marine Science Laboratory, University College of North Wales. 88 pp.
- Timmons M .B, J. M. Ebeling, F. W. Wheaton, S. T. Summerfelt y B. J. Vinci. 2002. *Recirculating Aquaculture Systems*. Segunda Edicion. EUA. 769 pp.
- Thompson, R., R., Newell, V. Kennedy y R. Mann. 1996. Reproductive processes and early development. In: V. Kennedy, R. Newell y A. Eble (Editors). *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland: Maryland Sea Grant Book. 335-370 pp.
- Uriarte, I., A. Fariás, J. Hernandez, C. Schafer y P. Sorgeloos. 2004. Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Agropecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): effects of enriched diets. *Aquaculture*. 230: 349-357 p.
- Utting, S. 1993. Procedures for maintenance and hatchery conditioning of bivalve broodstock. *World Aquaculture*. 24: 78-82 p.
- Utting, S. y P. F. Millican. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*. 155: 45– 54 p.
- Utting, S. y B. Spencer. 1991. The hatchery culture of bivalve mollusk larvae and juveniles. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Directorate of Fisheries Research. 32 pp.

- Villareal, G. 1993. Impacto ambiental de un cultivo del ostion *Crassostrea gigas* en Bahía Falsa, Baja California, Mexico. Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Mexico, D.F. 60 pp.
- Wang, Jaw-Kai. 2003. Conceptual design of microalgae-based recirculating oyster and shrimp system. *Aquacultural Engineering*. 28: 37-46 p.
- Webb, K. y F., Chu, 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In Pruder, G., C.J., Langdon y D., Conklin (Editores). *Proceedings of the Second International Conference of Aquaculture nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to shellfish Nutrition*, 27-29 octubre, 1981, Lewes/Rehoboth Beach, Delaware. Louisiana State University.
- Weibel, E. R. 1969. Stereological principles for morphometry in electron microscope cytology. *Internal Review in Cytology*. 26: 235-302 p.
- Wheaton, F. 1977. *Aquaculture Engineering*. John Wiley and Sons, Inc. Printed in U. S. 708 pp.
- Zhu, S. y S. Chen. 2001. Effect of organic carbon on nitrification rate in fixed film biofilters. *Aquacultural Engineering*. 2001 : 1-11 p.

CONTENIDO (continuación)

V.- RESULTADOS	22
V.1.- Calidad del agua	22
V.2.- Parámetros biológicos	24
V.2.1.- Crecimiento	24
V.2.2.- Mortalidad	27
V. 3.- Desarrollo Gonadal	28
V. 3.1.- Estadios gonádicos	28
V.3.2.- Variación de las fracciones de volumen de los componentes de la gónada	30
V.3.3.- Índice gonádico y somático	32
VI.- DISCUSIÓN	37
VII.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	51
VII.1.- Conclusiones	51
VII.2.- Recomendaciones	52
VIII.- LITERATURA CITADA	53

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sistema de maduración con bioclarificador que se utilizó para los experimentos. a) Tanque de maduración, b) tubería de desagüe, c) bioclarificador, d) retorno de agua filtrada, e) cuentas de plástico.	11
2	Diagrama del biofiltro utilizado para la remoción de sólidos y oxidación de compuestos nitrogenados. a) tanque de maduración, b) fraccionador de espuma, c) medio expandible granular, d) desagüe para retrolavado, e) tubería de retorno.	12
3	Diagrama del sistema de tanques y filtros que se utilizó para los experimentos de acondicionamiento y maduración de gónadas de reproductores de ostión Japonés, a) bioclarificador, b) tanques de maduración, c) tubería de aire.	13
4	Retícula de Weibel, los extremos de cada línea muestran los lugares de conteo de los componentes de la gónada.	19
5	Cortes histológicos de hembras y machos de <i>C. gigas</i> donde se observan los componentes celulares de la gónada: las células adipogranulares (AG), las células vesiculares del tejido conectivo (CVT), los gametos maduros (GM), los gametos en desarrollo (GD) y los espacios foliculares (EF).	20
6	Volumen de los componentes celulares de la gónada de los reproductores de ostión para los tratamientos D1, D2 y D3 (Gametos Maduros (GM), Gametos en Desarrollo (GD), Células Adipogranulares (AG), Células Vesiculares de Tejido Conectivo (CVT) y Espacios Foliculares (EF) (temperatura constante de 20°C, D1= <i>Tetraselmis</i> 3600, D2= <i>Isochrysis</i> 1800 y D3= <i>Tetraselmis</i> 3600 + <i>Isochrysis</i> 1800).	31
7	Volumen de los componentes celulares de la gónada de los reproductores de ostión para los tratamientos T1, T2 y T3 (Gametos Maduros (GM), Gametos en Desarrollo (GD), Células Adipogranulares (AG), Células Vesiculares de Tejido Conectivo (CVT) y Espacios Foliculares (EF) (alimentados con la mezcla de microalgas, T1= temperatura variable, T2= 20°C y T3= 24°C).	33

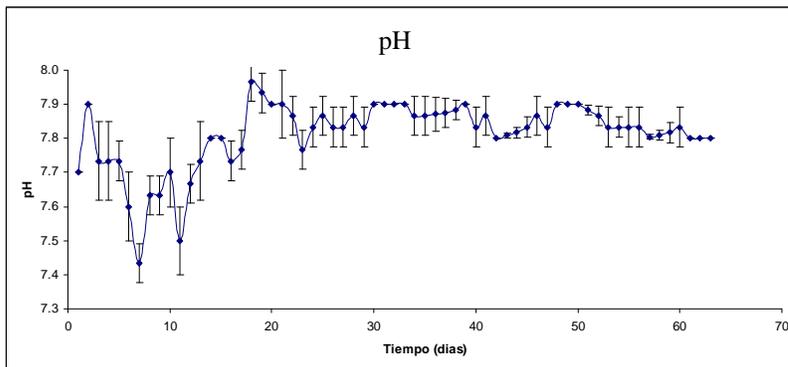
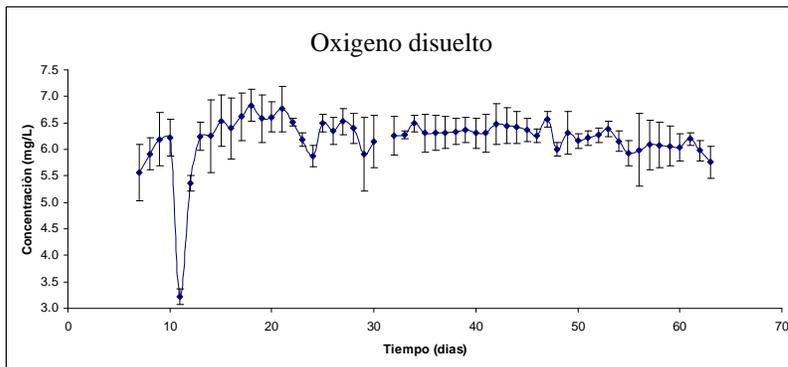
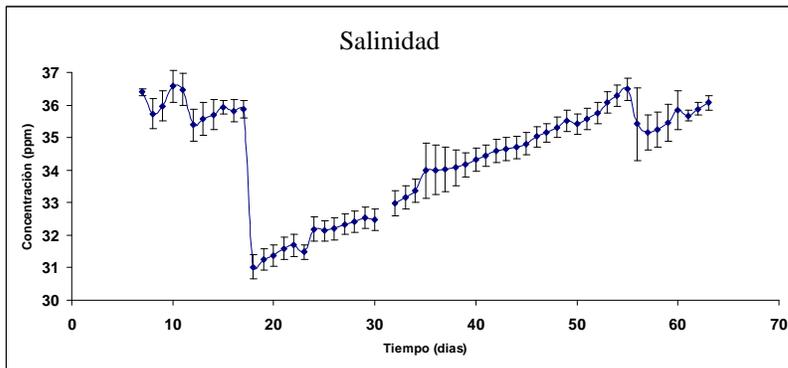
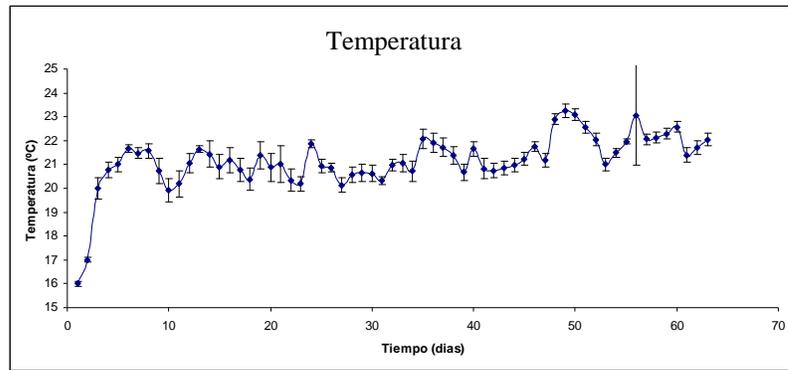
LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Pagina
8	Variación del índice somático y gonádico de los ostiones en los tratamientos D1, D2 y D3 (temperatura constante de 20°C), D1= <i>Tetraselmis</i> 3600, D2= <i>Isochrysis</i> 1800 y D3= mezcla de microalgas.	35
9	Variación del índice somático y gonádico de los ostiones en los tratamientos T1, T2 y T3 (alimentados con la mezcla de microalgas, T1= temperatura ambiente, T2= 20°C y T3= 24°C).	36

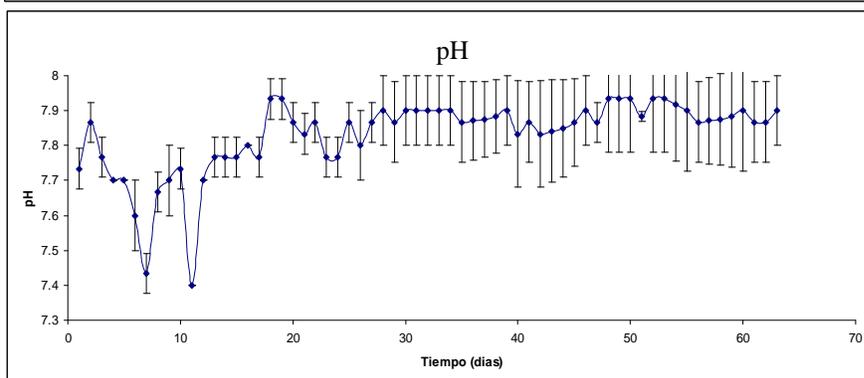
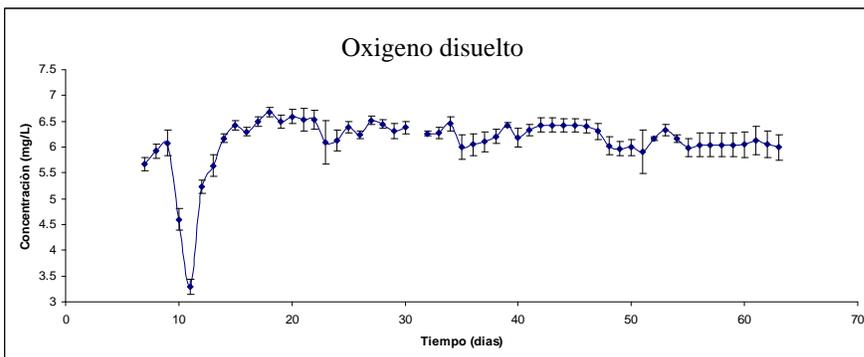
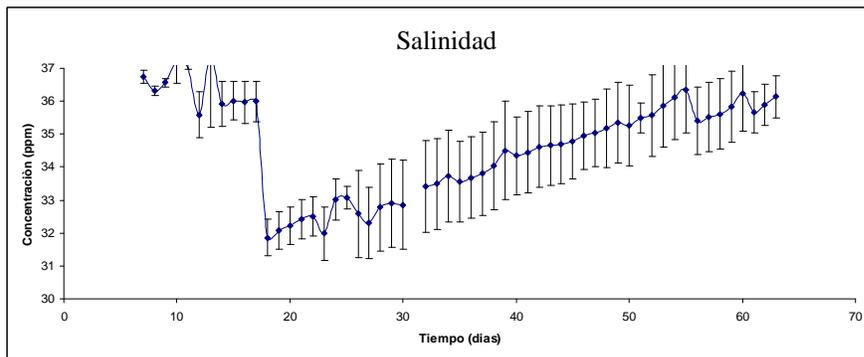
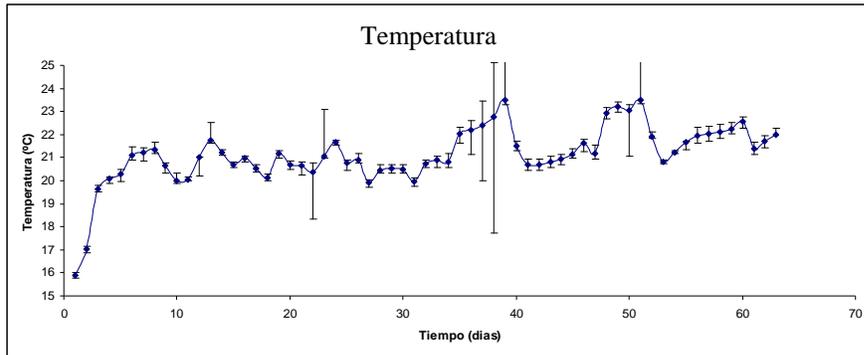
LISTA DE TABLAS

Tabla		Pagina
I	Descripción de los estadios gonádicos utilizados para clasificar el desarrollo gonadal de las hembras de <i>Crassostrea gigas</i> .	17
II	Descripción de los estadios gonádicos utilizados para clasificar el desarrollo gonadal de los machos de <i>Crassostrea gigas</i> .	17
III	Temperatura esperada y promedio \pm desviación estándar registrada en los sistemas de recirculación durante el experimento. Subíndices diferentes (a, b, c) y (x, y, z) indican diferencias significativas entre los tratamientos de los dos diferentes experimentos*.	23
IV	Concentración (promedio \pm desviación estándar) de la salinidad, la concentración de oxígeno disuelto y el pH medidos en los sistemas de recirculación durante el experimento. Subíndices diferentes (a, b, c) y (x, y, z) indican diferencias significativas entre los tratamientos de los diferentes experimentos*.	23
V	Concentración (promedio \pm desviación estándar) del nitrógeno amoniacal total, los nitratos y los nitritos presentes en los sistemas de recirculación durante el experimento. Subíndices diferentes (a, b, c) y (x, y, z) indican diferencias significativas entre los tratamientos de los diferentes experimentos*.	24
VI	Talla inicial y final, peso entero húmedo inicial y final del ostión <i>Crassostrea gigas</i> mantenidos durante el periodo experimental. Subíndices diferentes (a, b, c) y (x, y, z) indican diferencias significativas entre los tratamientos de los diferentes experimentos*.	25
VII	Peso húmedo en gramos (promedio \pm desviación estándar) del tejido de ostión de <i>Crassostrea gigas</i> mantenidos durante el experimento. Subíndices diferentes (a, b, c) y (x, y, z) indican diferencias significativas entre los tratamientos de los dos diferentes experimentos*.	26
VIII	Porcentaje de sobrevivencia del ostión <i>Crassostrea gigas</i> mantenidos en sistema de recirculación en los dos diferentes experimentos*.	27

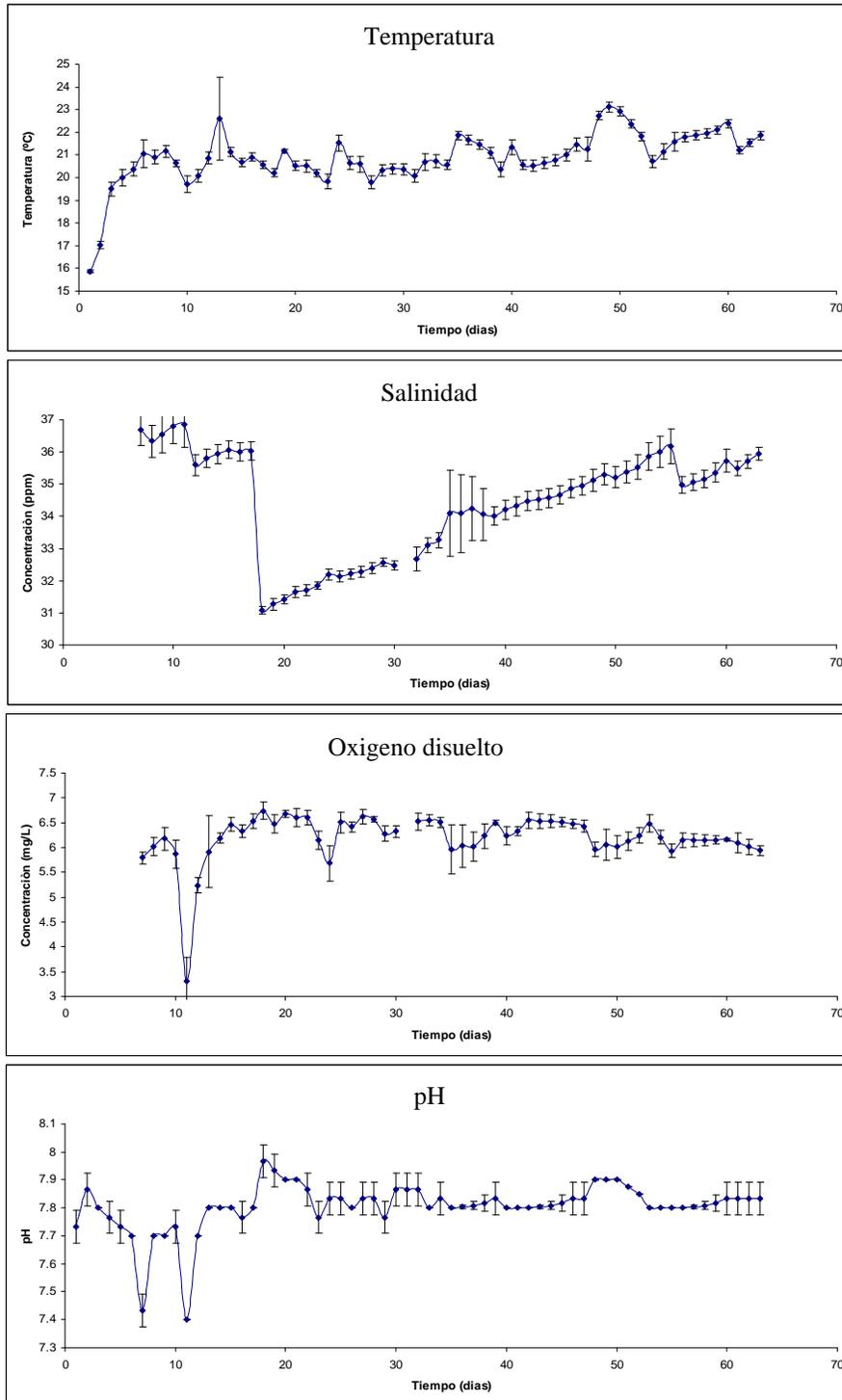
ANEXOS



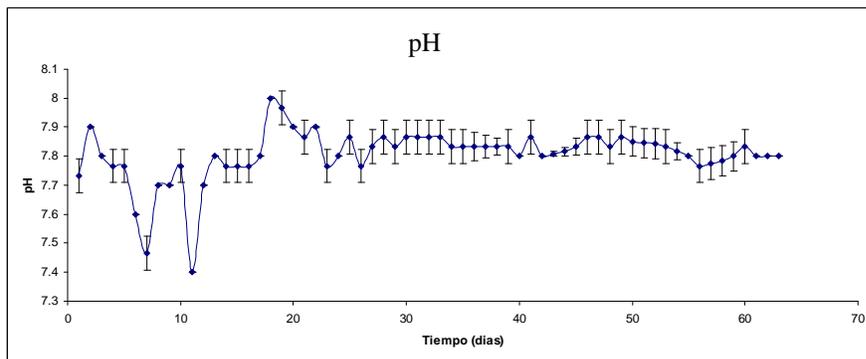
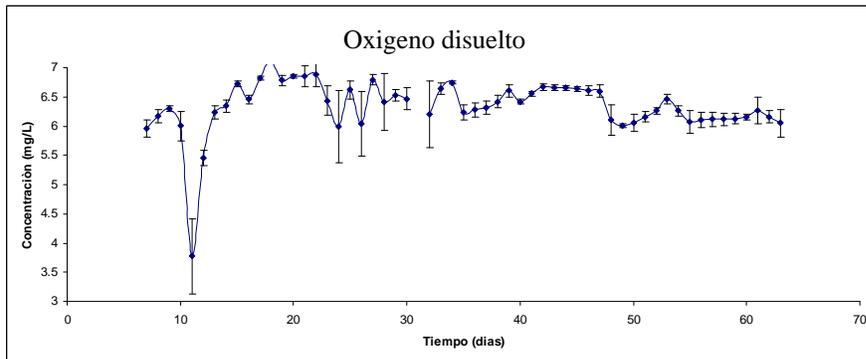
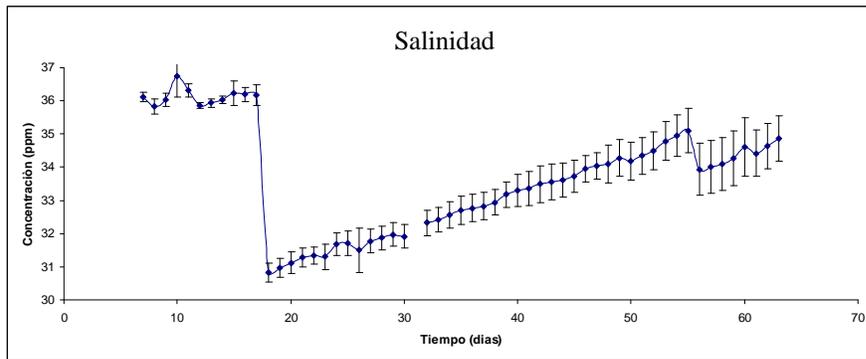
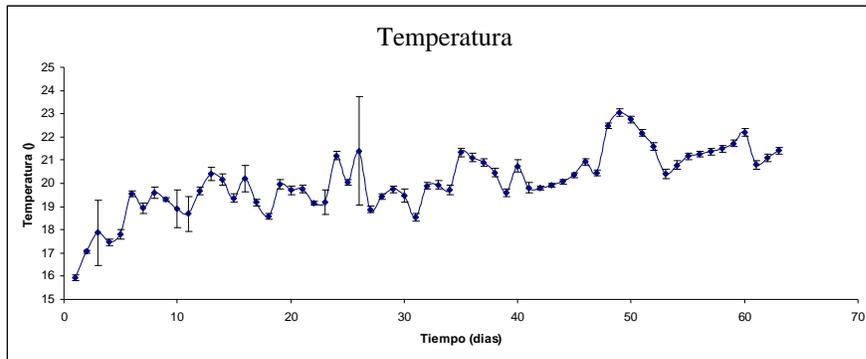
Anexo 1.- Graficas de los parámetros fisicoquímicos registrados en D1 a lo largo del periodo experimental.



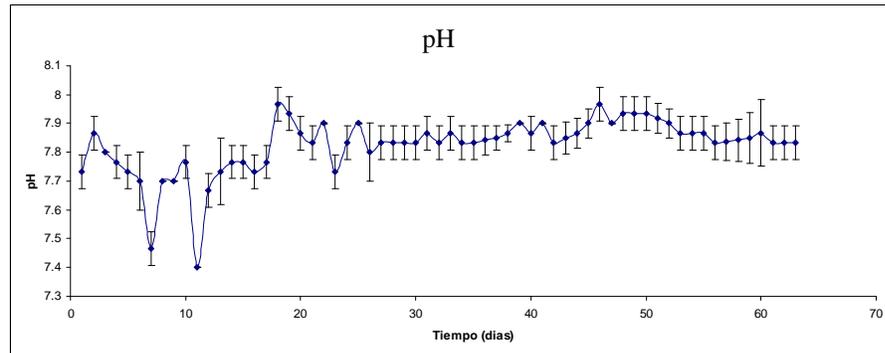
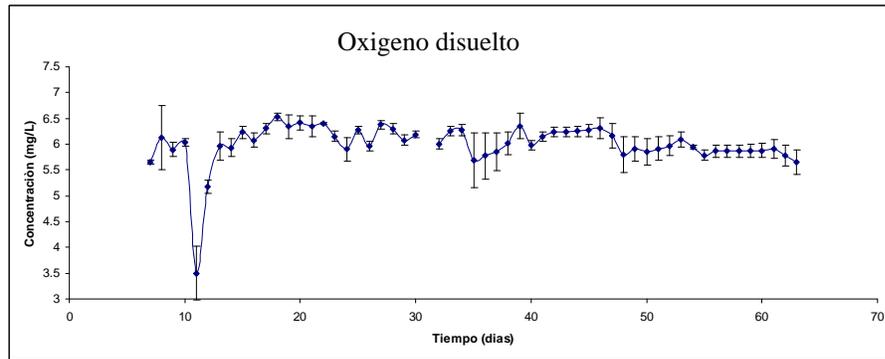
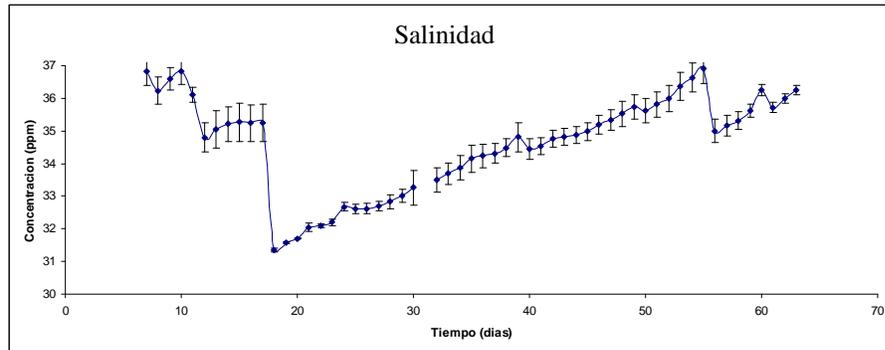
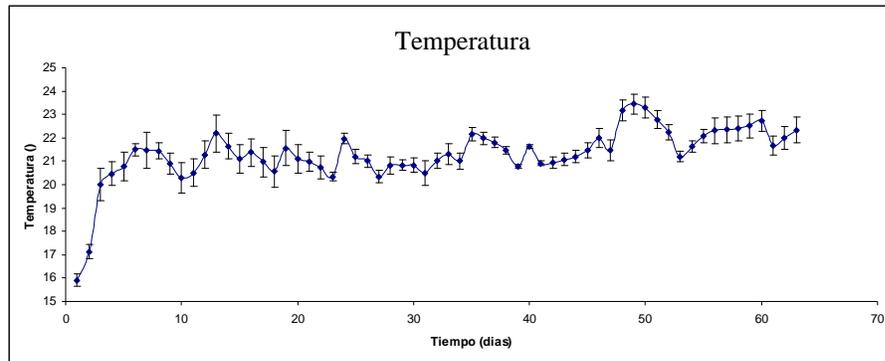
Anexo 2.- Graficas de los parámetros fisicoquímicos registrados en D2 a lo largo del periodo experimental.



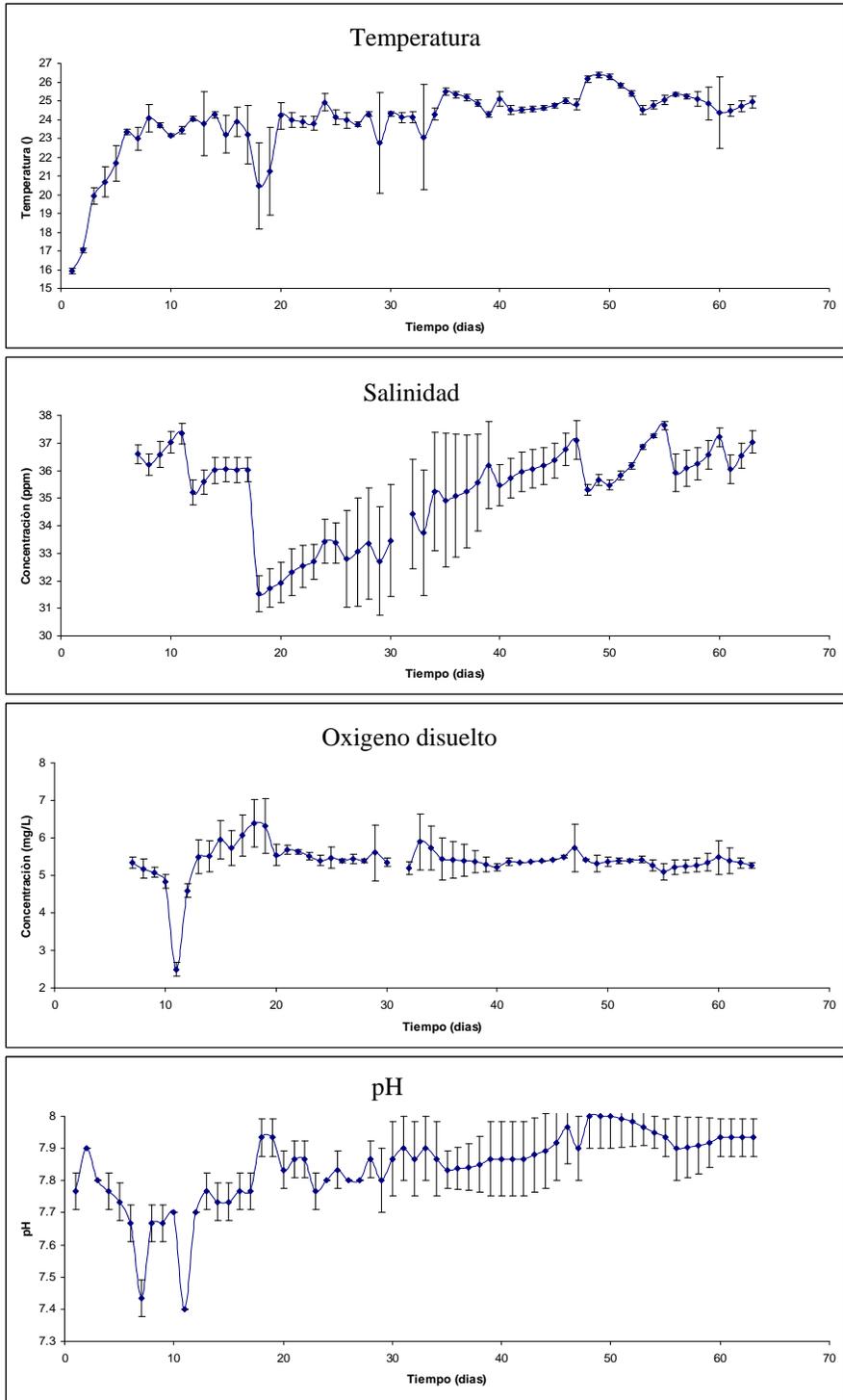
Anexo3.- Graficas de los parámetros fisicoquímicos registrados en D3 a lo largo del periodo experimental.



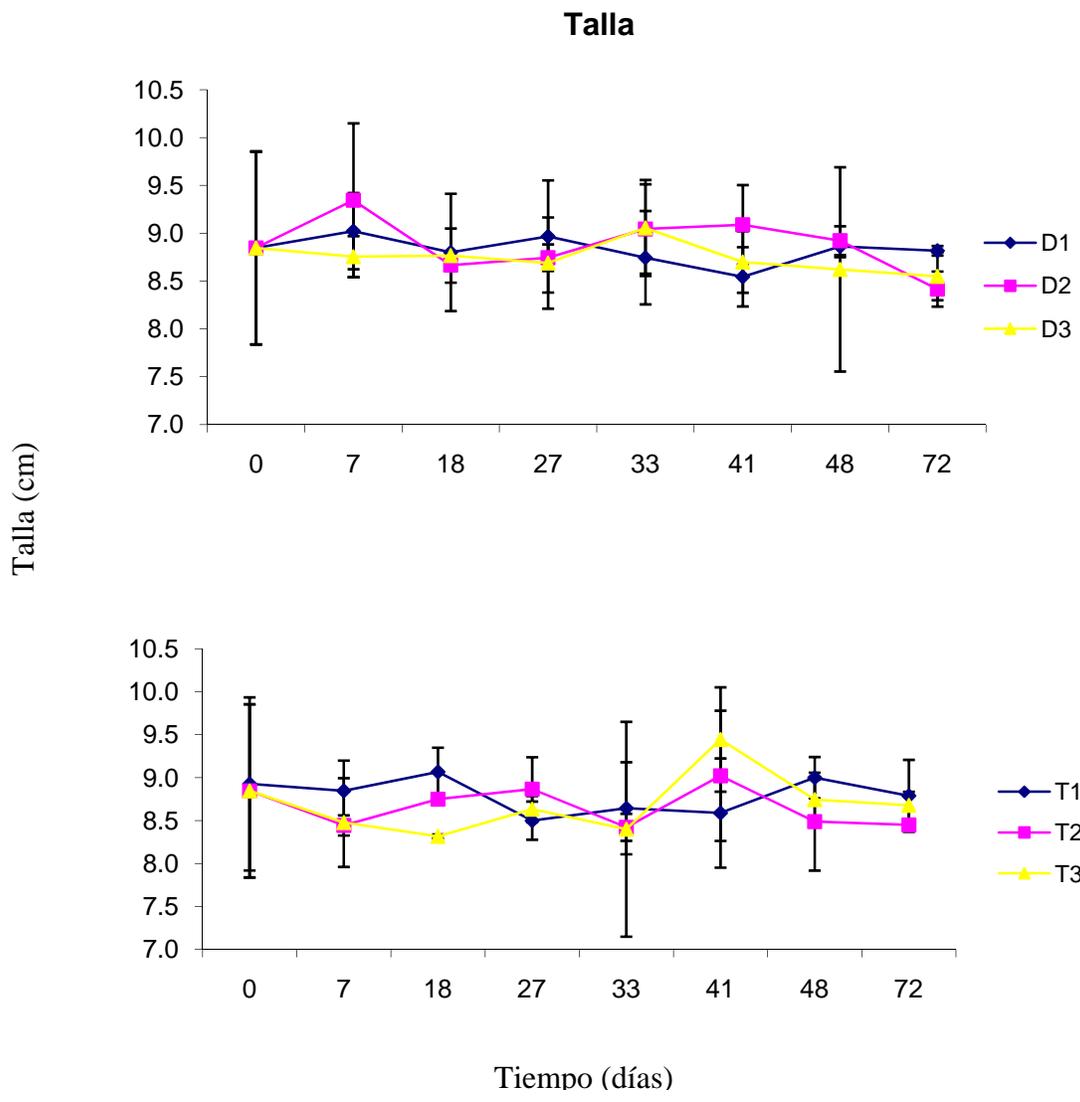
Anexo 4.- Graficas de los parámetros fisicoquímicos registrados en T1 a lo largo del periodo experimental.



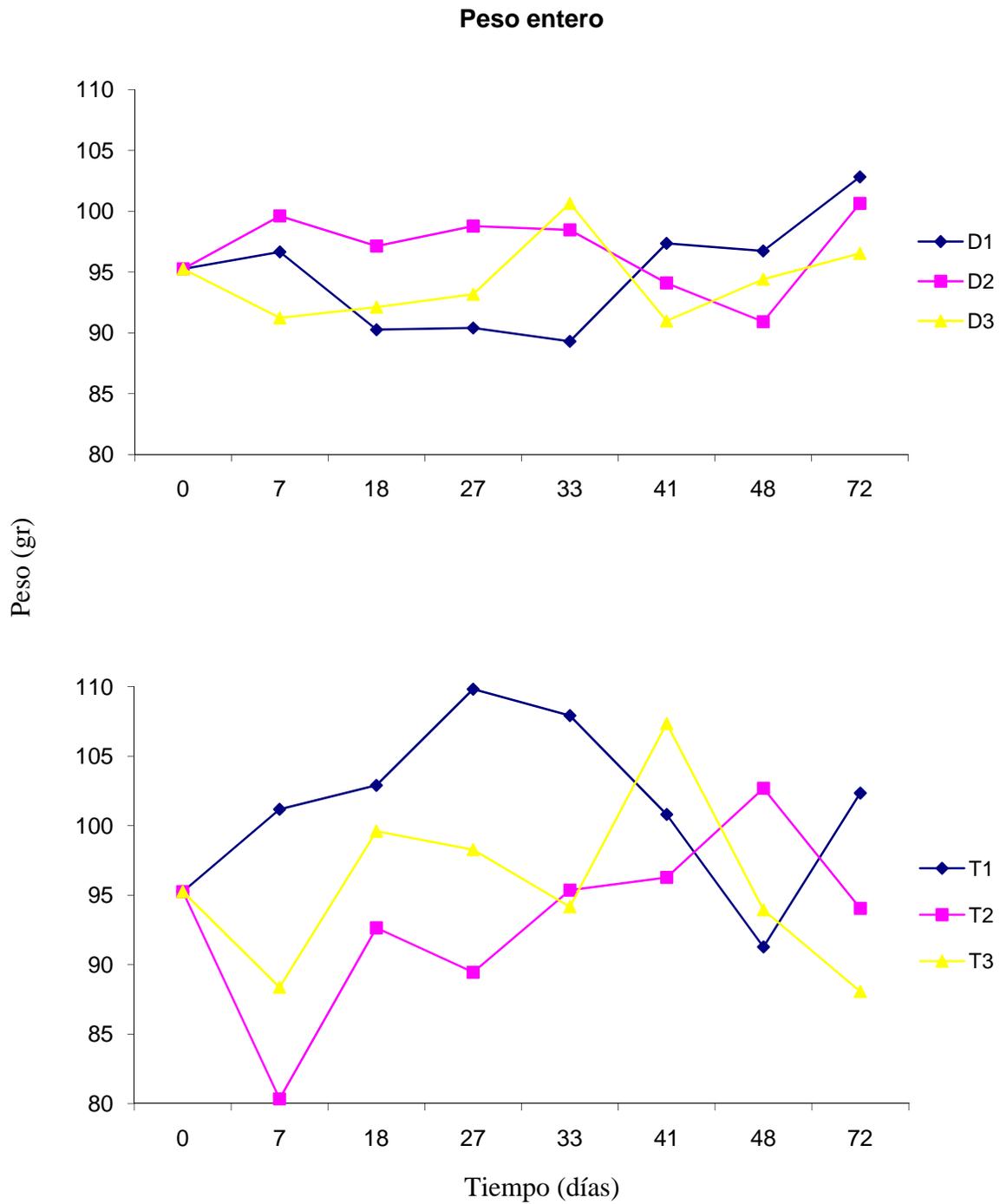
Anexo 5.- Graficas de los parámetros fisicoquímicos registrados en T2 a lo largo del periodo experimental.



Anexo 6.- Graficas de los parámetros fisicoquímicos registrados en T3 a lo largo del periodo experimental.

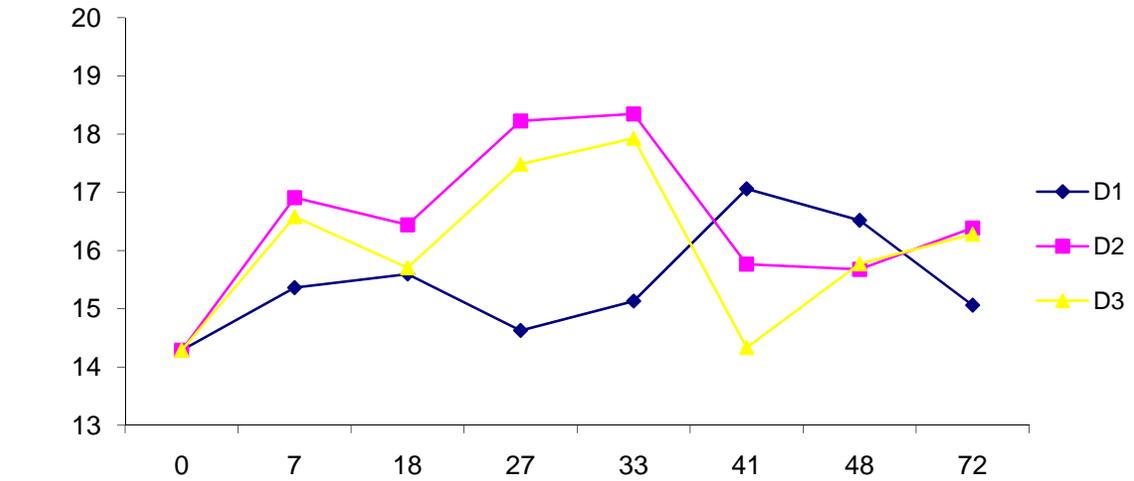


Anexo 7.- Promedio de tallas de los diferentes tratamientos experimentales registrados a lo largo del periodo experimental.

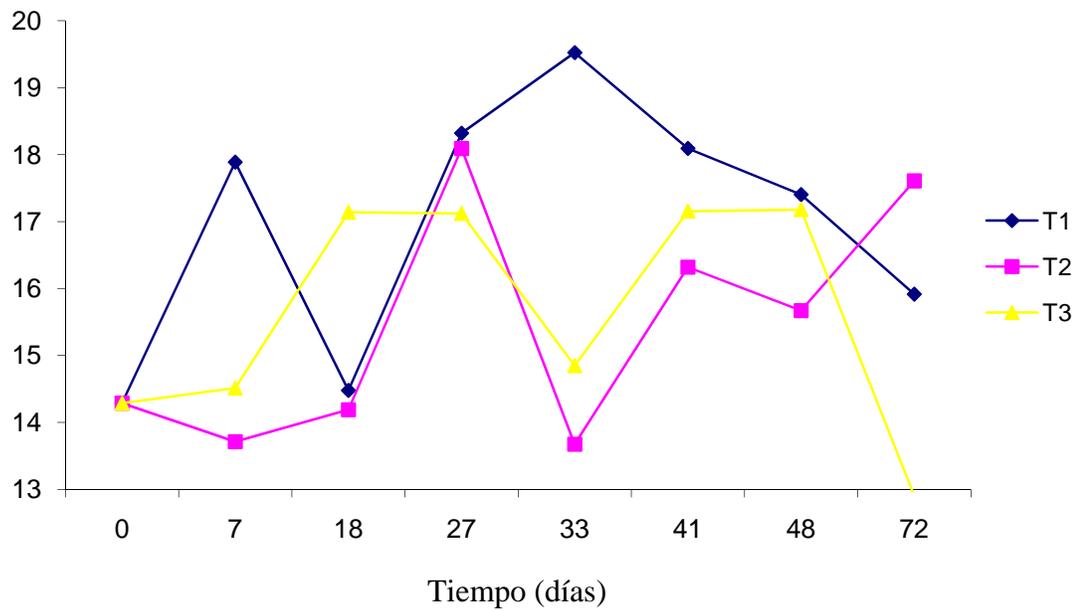


Anexo 8.- Promedio del peso entero del ostión *Crassostrea gigas* registrados a lo largo del periodo experimental.

Peso tejido



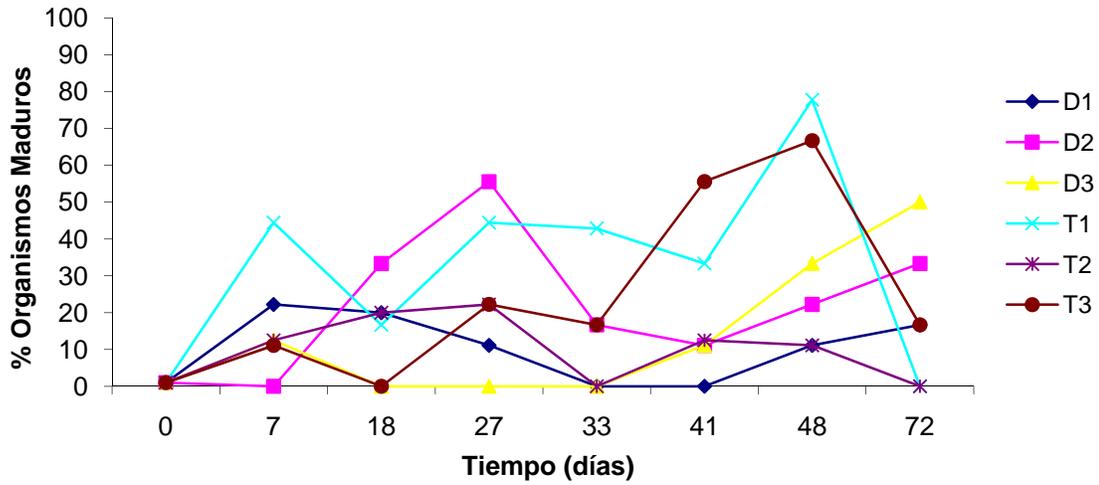
Peso (gr)



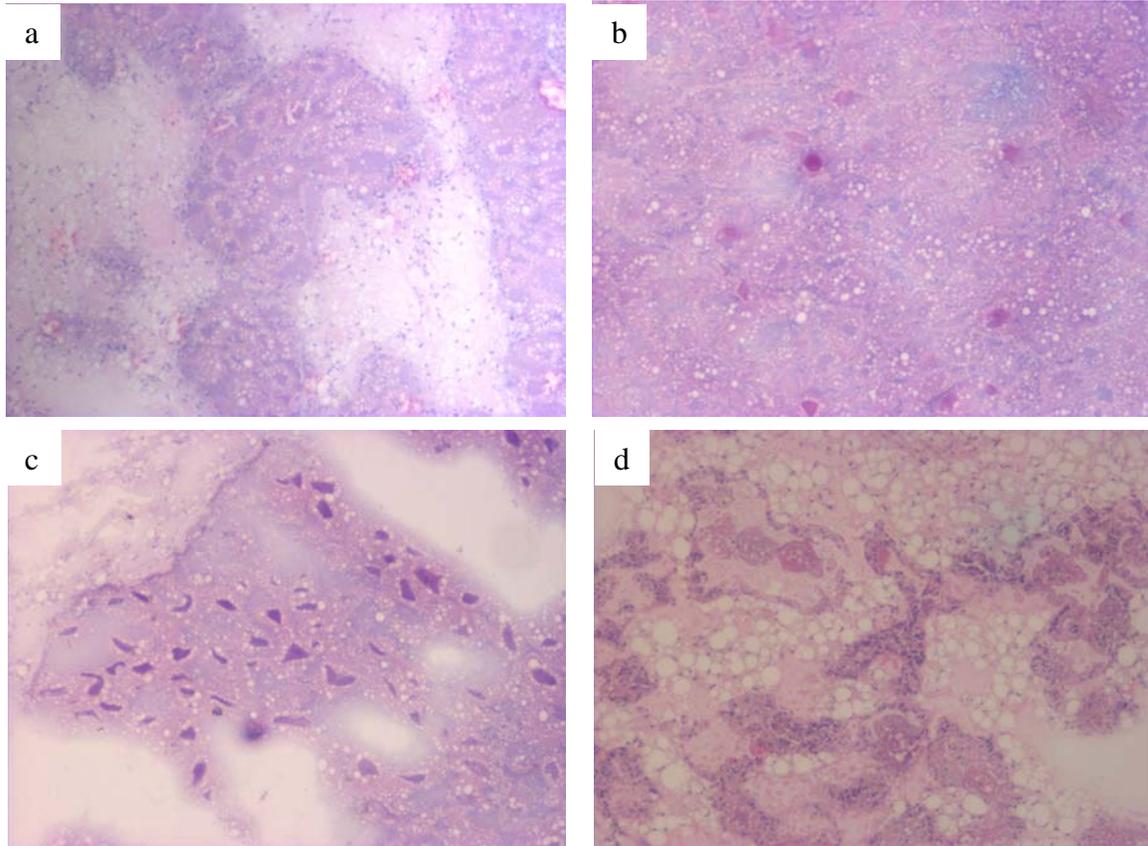
Tiempo (días)

Anexo 9.- Promedio del peso de tejido del ostión *Crassostrea gigas* registrados a lo largo del periodo experimental.

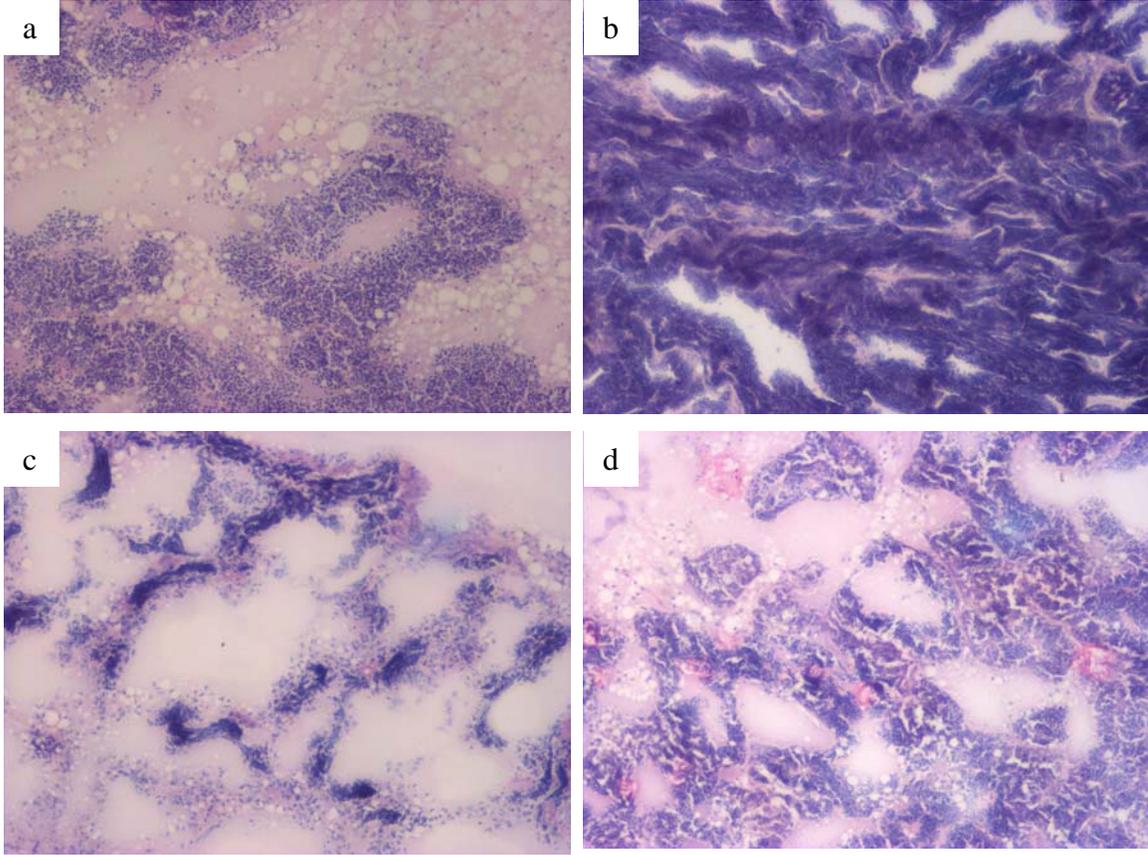
% de Organismos Maduros (estadio 2)



Anexo 10.- Porcentaje de organismos maduros en cada uno de los seis tratamientos registrados a lo largo del periodo experimental.



Anexo 11.- Estadios de desarrollo de hembras. a) Estadio 2 (en desarrollo), b) Estadio 3 (maduro), c) Estadio 4 (desovado) y d) Estadio 5 (reabsorción).



Anexo 12.- Estadios de desarrollo de machos. a) Estadio 2 (en desarrollo), b) Estadio 3 (maduro), c) Estadio 4 (desovado) y d) Estadio 5 (reabsorción).

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		Pagina
IX	Desarrollo gonadal del ostión <i>Crassostrea gigas</i> de los tratamientos D1, D2 y D3 observados durante el periodo de experimental. Se indica el tratamiento N, número de muestras, M, porcentaje de machos, H, hembras, I, indiferenciados y el número de observaciones de cada estadio.	28
X	Desarrollo gonadal del ostión <i>Crassostrea gigas</i> de los tratamientos T1, T2 y T3 observados durante el periodo de experimental. Se indica el tratamiento N, número de muestras, M, porcentaje de machos, H, hembras, I, indiferenciados y el número de observaciones de cada estadio.	29