

COMITÉ TUTORIAL Y REVISOR DE TESIS

Dr. Alfonso N. Maeda-Martínez

Director de Tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
La Paz, B.C.S., México
Ecofisiología y cultivo de moluscos, CIBNOR

Dra. Dalila Aldana Aranda

Co-Tutor
Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados
Mérida, Yuc., México
Cultivo de moluscos

Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez

Co-Tutor
Centro de Investigación Científica y Educación
Superior de Ensenada
Ensenada, B.C., México
Ecofisiología

Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez

Co-Tutor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
La Paz, B.C.S., México
Ecotoxicología

Dr. Alejandro M. Maeda-Martínez

Co-Tutor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
La Paz, B.C.S., México
Ecología Acuática

COMITÉ SINODAL

Dr. Alfonso N. Maeda-Martínez
Dra. Dalila Aldana Aranda
Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez
Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez
Dr. Alejandro M. Maeda-Martínez

Dr. Gopal Murugan

Suplente
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
La Paz, B.C.S., México
Ecología Acuática

RESUMEN

En el presente trabajo se estudiaron los límites de tolerancia y resistencia superior e inferior y la salinidad óptima para el crecimiento, y se estudiaron el balance hídrico y los mecanismos de osmoconformación a diferentes salinidades en la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*.

La tolerancia se analizó mediante el método de concentración letal media (LC_{50}), exponiendo a los organismos a cambios repentinos de salinidad 37 ups a 15, 20, 25, 30, 37, 42, 47, 50 y 60 ups durante 4 días. El análisis de Probit señaló una halotolerancia entre 23.5 y 53.8 ups y no se encontraron diferencias significativas en la LC_{50} superior o inferior a 24, 48, 72 y 96h de exposición. Con respecto a la resistencia, no hubo mortalidad entre 22 y 52 ups ante la exposición de los organismos a cambios graduales de 3 ups cada tercer día partiendo de 37 ups. Al rebasar esos valores, se registró una mortalidad elevada.

La salinidad óptima de crecimiento se estimó a través del potencial de crecimiento restando la energía perdida por respiración y excreción amoniaca de la energía absorbida en organismos expuestos a diferentes salinidades. Los resultados se corroboraron con un estudio de crecimiento y además se calculó la eficiencia neta de crecimiento K_2 y la relación O/N. Los resultados indicaron que la salinidad óptima de crecimiento fue 37 ups aunque también el potencial de crecimiento fue positivo entre 30 y 43 ups. Fuera de ese rango el potencial de crecimiento fue negativo. Estos resultados concordaron con el K_2 y la relación O/N.

El balance hídrico y la osmoconformación fueron estudiados exponiendo individuos de almeja mano de león a cambios graduales de 3 ups cada tercer día partiendo de 37 ups, y midiendo las variaciones en el contenido de agua en los tejidos, el volumen total de hemolinfa y algunas propiedades del plasma incluyendo, la presión osmótica, los solutos inorgánicos (cationes) y orgánicos compatibles (proteínas, carbohidratos, lípidos y aminoácidos libres). El contenido de humedad en los tejidos se incrementó al disminuir la salinidad. La pérdida en el peso seco de tejido ocurrió cuando las almejas se expusieron a un medio diluido o a un medio concentrado. En condiciones hipersalinas, los lípidos incrementaron siete veces la concentración. Esto indica una función de los lípidos durante el estrés hiperosmótico. Con estos resultados se concluye que la almeja mano de león es un osmoconformador con alta capacidad de resistir cambios de salinidad en el rango de 22-52 ups.

ABSTRACT

The upper and lower salinity tolerance and resistance were investigated in the Pacific lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. The optimum salinity for growth was also determined as well as the water balance and some osmoconformation mechanisms, at different salinities.

Salinity tolerance was determined with the LC₅₀ method exposing the individuals to sudden changes in salinity from 37 psu to 15, 20, 25, 30, 37, 42, 47, 50 and 60 psu during 4 days. The Probit analysis indicated a tolerance between 23.5 and 53.8 psu and there were no significant differences of upper and lower LC₅₀ at 24, 48, 72 and 96 h exposure. With regard to resistance, there was no mortality in the range from 22 to 52 psu when the organisms were exposed to changes of 3 psu every three days. Beyond this range abrupt mortality was registered in both directions. Optimum salinity for growth was obtained by measuring the scope for growth at different salinities. This was confirmed with a growth experiment and also by measuring the net growth efficiency (K₂) and the O/N ratio. Results indicated a maximum scope for growth at 37 psu although a positive scope for growth was obtained at 30 and 43 psu. These results were in agreement with those from the growth experiment, the K₂ and O/N ratio determinations. A negative scope for growth was obtained beyond this range. Water balance and osmoconformation were studied by exposing *N. subnodosus* individuals to gradual changes in salinity of 3 psu every three days, starting from 37 psu. Tissue water content, haemolymph volume and some properties of plasma including osmotic pressure, inorganic

(cations) and organic compatible solutes (proteins, carbohydrate, lipids and free amino acids) were measured. Tissue water content increased with decreasing salinity. There was a loss of dry tissue weight in organisms exposed to diluted and concentrated media. A seven fold increase in the lipid concentrations were obtained when the organisms were exposed to hypersaline conditions. This indicates a certain function of lipids during the hyperosmotic stress. With these results it can be concluded that this species is a perfect osmoconformer with a high capacity to withstand salinities in the range of 22-52 psu.

DEDICATORIA

A mi querida familia:

A mi mamá Lucelly y a mi papá Arturo quienes me han ayudado a caminar en la vida; estoy orgullosa de ser su hija!

También a ti Luis Fernando, por ser un hermano único!

A mi abuelita Nela y mi abuelita Reneé, mis dos ángeles que me cuidan y están siempre conmigo!

A Agustín, mi querido esposo, con quien he compartido estos últimos años maravillosos!

Al regalo más hermoso que Dios me ha dado, mi pequeño Agustín!

A Dios por la vida y permitirme terminar el Doctorado, un gran sueño!

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Alfonso N. Maeda Martínez, Director de tesis, por su valioso apoyo incondicional y amistad.

A los miembros de mi Comité Tutorial, Dr. Alfonso N. Maeda Martínez, Dra. Lía Méndez, Dr. Alejandro Maeda Martínez, Dra. Dalila Aldana Aranda, Dr. Fernando Bückle, quienes siempre amablemente estuvieron dispuestos a ayudarme y por dar seguimiento a mi trabajo. También agradezco la amistad y su apoyo en todas las etapas de mi doctorado. Gracias por aceptar formar parte de este gran sueño!

Mi agradecimiento al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. quien me brindó un espacio para mi superación académica, a través del Programa de Posgrado y en especial a la Dra. Thelma Castellanos Cervantes por todo el apoyo necesario en cada etapa de mi doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de esta tesis de Doctorado y por el financiamiento a través del proyecto SEP-CONACYT 33593-B "Relación entre la Fisiología antemortem y la bioquímica posmortem en la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*" dirigido por el Dr. Alfonso N. Maeda-Martínez.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. en Hermosillo, Son., en especial a Dr. Ramón Pacheco Aguilar y a la Dra. Guillermina García Sánchez por su apoyo en la determinación de aminoácidos.

A Ing. Edgar Yuen Sánchez y Lic. Ma. Esther Ojeda Castro de la Subdirección de Informática por la búsqueda de información siempre oportuna. También a la Lic. Ana María Talamantes y al amigo de todos Tony, por su gran amistad y apoyo para la búsqueda de algún libro.

Agradezco el apoyo del personal de los siguientes laboratorios y áreas del CIBNOR: Larvicultura de Especies Marinas: Téc. Pablo Ormart, B.M. Francisco Flores; Microalgas: Téc. Cinthya Aldana; Bioquímica Fisiológica: M. en C. Roberto Hernández Herrera; Histología e Histoquímica: M. en C. María del Carmen Rodríguez Jaramillo; Espectrofotometría de Absorción Atómica: I.B.Q. Baudilio Acosta; Cromatografía: Téc. Lilia I. Ibarra Martínez; Análisis Químico de Agua: I.B.Q. Ibán Murillo Murillo; Cómputo: Lic. Horacio Sánchez, Lic. Manuel Melero; Redes: Ing. Héctor Campos, Ing. Pedro Tsuchiya, Ing. Roberto Morales Hernández; Soporte Técnico: Josefina Villa; Ecofisiología de Organismos Acuáticos: M. en C. Armando Monge; Genética: Ing. José Luis Ramírez, Ing. Susana Ávila; Posgrado: Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio, Lic. Beatriz Gálvez González.

A todos mis grandes amigos de La Paz; gracias por estar siempre presentes, por la convivencia y los ánimos cuando me sentía sola y lejos de mi familia. Ustedes forman parte de mi vida, GRACIAS POR TODO!!.

A mi familia en La Paz: Chava, Tere, Chavita y Rodri. Gracias por apoyarme en todo momento, por el cariño que siempre me han dado y por hacerme sentir siempre feliz!. LOS QUIERO!!.

También agradezco a mi otra familia en La Paz: Sra. Olga, Dr. Lluch, Montse, Liliana, Daniel, Lili y Dany, quienes desde el primer día que me conocieron me brindaron su confianza y cariño. Gracias, están siempre en mi corazón!!

Con mucho cariño, agradezco a mi mamá Lucelly, mi suegra Elda, mis cuñadas Paula y Carolina y en especial a mi esposo Agustín, quienes cuidaron con mucho amor a mi hijo Agustín mientras estuve haciendo una estancia en el CIBNOR en la etapa final de mi doctorado, no tengo palabras para agradecerles todo lo que hicieron. GRACIAS!!.

Con mucho amor a mi familia: mis papás, Lucelly y Arturo, gracias por confiar y creer en mí, por apoyarme en todos mis proyectos!. A Luis Fernando, mi hermano, a Carolina, mi cuñada y a mis niños, Luis Fernando y Diana Carolina, gracias por estar en mi vida y por compartir momentos tan felices en familia. LOS AMO!!

A mi esposo Agustín, por apoyarme para concretar este gran sueño: mi Doctorado; gracias por tu amor, tu amistad y por tu confianza; y a mi hijo Agustín, quien es mi motor para continuar superándome. Gracias por existir hijo. LOS AMO!!

A mis tíos, tías, primos y primas quienes a pesar de la distancia siempre los sentía muy cerca de mí; gracias por las “porras”. LOS QUIERO!!

ÍNDICE

Introducción General	1
Objetivos	3
Hipótesis	3
Capítulo 1	
Tolerancia y resistencia a la salinidad en la almeja mano de león (<i>Nodipecten subnodosus</i>)	4
Introducción	4
Materiales y Métodos	5
Organismos experimentales	5
Tolerancia a la salinidad	7
Resistencia a la salinidad	10
Resultados	12
Tolerancia a la salinidad	15
Resistencia a la salinidad	16
Discusión	34
Capítulo 2	
Salinidad óptima para el crecimiento en la almeja mano de león (<i>N.</i> <i>subnodosus</i>)	19
Introducción	19
Materiales y Métodos	27
Organismos experimentales	27
Potencial de crecimiento	27
Tasa de absorción	28
Tasa de ingestión	28
Eficiencia de absorción	33
Tasa respiratoria	34
Tasa de excreción	38
Crecimiento	39
Eficiencia neta de crecimiento (K_2)	40
Relación O/N	41
Resultados	42
Potencial de crecimiento	42
Tasa de absorción	42
Tasa de ingestión	42
Eficiencia de absorción	43
Tasa respiratoria	45
Tasa de excreción	45
Crecimiento	49
Eficiencia neta de crecimiento (K_2)	51
Relación O/N	52

	Supervivencia	53
Discusión		54
Capítulo 3		
Balance hídrico de solutos y osmoregulación en la almeja mano de león (<i>N. subnodosus</i>)		59
Introducción		77
Materiales y Métodos		62
	Organismos experimentales	62
	Contenido de agua en tejidos y volumen de hemolinfa en músculo abductor	62
	Presión Osmótica (hemolinfa vs medio externo) y Solutos Inorgánicos en plasma y medio externo	65
	Solutos orgánicos en plasma	65
	Proteínas	66
	Carbohidratos	67
	Lípidos totales	67
	Aminoácidos	68
Resultados		69
	Contenido de agua, volumen de la hemolinfa y peso seco de tejido	69
	Presión osmótica	72
	Solutos inorgánicos en plasma y medio externo	74
	Solutos orgánicos en plasma	76
Discusión		79
Discusión General		85
Conclusiones		89
Literatura Citada		90
Apéndice A		109
Artículos		114

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Localización del sitio de cultivo de los juveniles de la almeja mano de león (<i>Nodipecten subnodosus</i>) en la Laguna Manuela, Baja California Sur.	6
2.	Modelo experimental utilizado en la determinación de la tolerancia a la salinidad de la almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> .	9
3.	Diseño experimental del estudio de resistencia a la salinidad, utilizando siete grupos de 20 almejas mano de león <i>N. subnodosus</i> , incrementando a 3 contenedores 3 ups cada tercer día y disminuyendo 3 contenedores al mismo tiempo. El grupo control permaneció a 37 ups.	11
4.	Mortalidad acumulada de las almejas mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> (6.0 ± 0.3 cm de altura de la concha) aclimatadas a la salinidad de 37 ups y a una temperatura de 22° C, expuestas a cambios agudos de salinidad durante 4 días de experimentación. Los valores son la media ± desviación estándar.	12
5.	Valores de LC ₅₀ y límites de salinidad al 95% de confianza de <i>Nodipecten subnodosus</i> (6.0 ± 0.3 cm de altura de la concha) aclimatadas a 37 ups y a una temperatura de 22° C a diferentes tiempos de exposición. Los valores son la media ± desviación estándar. LC ₅₀ Superior (a); LC ₅₀ Inferior (b).	14
6.	Mortalidad acumulada de <i>Nodipecten subnodosus</i> (6.0 ± 0.3 cm de altura de la concha) expuestas a cambios graduales de salinidad (± 3 ups cada 3 días), en un rango de salinidad de 16 a 55 ups a una temperatura de 22° C. Los valores son la media ± desviación estándar.	15
7.	Sistema de flujo continuo para el monitoreo de tasas fisiológicas utilizado con la almeja mano de león (<i>Nodipecten subnodosus</i>).	30

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
9.	Toma de muestra del agua (20 mL) de la cámara para analizar la concentración de partículas.	32
10.	Oxímetro Microx TX utilizado para la determinación de oxígeno disuelto (PO_2) en la almeja mano de león (<i>Nodipecten subnodosus</i>).	36
11.	Sensor de oxígeno de fibra óptica (microoptode) del Oxímetro Microx TX (E) montado en una celda de flujo continuo (CFC), el cual aparece colocado a la salida del distribuidor de cuatro vías para las determinaciones de oxígeno disuelto.	36
12.	Ejemplo del registro de Oxígeno disuelto desplegado en la pantalla de la PC conectada al Oxímetro Microx TX durante un experimento. Las crestas y los valles corresponden a los valores del agua antes y después de pasar por una cámara con organismos.	37
13.	Tasa de Ingestión en juveniles de almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> a diferentes salinidades.	43
14.	Eficiencia de Absorción (%) en juveniles de la almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> a diferentes salinidades.	44
15.	Tasa de Absorción en juveniles de almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> a diferentes salinidades.	45
16.	Tasa Respiratoria en juveniles de almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> aclimatados a diferentes salinidades.	46
17.	Tasa de Excreción en juveniles de almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> aclimatados a diferentes salinidades.	46
18.	Potencial de crecimiento en juveniles de almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> a diferentes salinidades. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
19.	Crecimiento de juveniles de la almeja mano de león (<i>Nodipecten subnodosus</i>) a diferentes salinidades, durante 58 días de experimentación. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar.	49
20.	Incremento en peso seco de tejidos de la almeja mano de león (<i>Nodipecten subnodosus</i>) sometida a tres tratamientos de salinidad durante 58 días. Los valores representan la media \pm la desviación estándar.	50
21.	Eficiencia neta de crecimiento de la almeja mano de león (<i>Nodipecten subnodosus</i>) sometida a diferentes salinidades.	51
22.	Relación O/N de las almejas mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> expuestas a diferentes salinidades.	52
23.	Supervivencia de la almeja mano de león (<i>Nodipecten subnodosus</i>) durante 58 días de experimentación sometidas a tres salinidades diferentes.	53
24.	Extracción de hemolinfa en el músculo abductor de la almeja mano de león (<i>Nodipecten subnodosus</i>).	64
25.	Efecto de la salinidad en el peso seco de tejido de la almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> (a) y el peso seco de tejido expresado como porcentaje del peso húmedo de tejido (b). Los valores son la media \pm desviación estándar, n= 9.	71
26.	Presión Osmótica de la hemolinfa de la almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> expuesta a un amplio rango de salinidades. Los valores son la media \pm desviación estándar, n= 27.	73
27.	Variaciones de las concentraciones de los aminoácidos libres en plasma de la almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> expuesta a una salinidad de 25 y 49 ups en relación a la concentración de una salinidad de 37 ups.	78

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Tolerancia a la salinidad inferior y superior de algunas especies de pectínidos y los métodos empleados para las determinaciones.	17
II	Resistencia a la salinidad inferior y superior de algunas especies de pectínidos y los métodos empleados para las determinaciones.	18
III	Efecto de la salinidad en el peso húmedo y peso seco de tejido, contenido de agua en tejido, volumen de hemolinfa, y presión osmótica de la hemolinfa y medio externo de la almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> (6.0 ± 0.3 cm de altura de la concha) a 22 °C.	70
IV	Concentraciones de los solutos inorgánicos en medio externo y plasma de la almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> (6.0 ± 0.3 cm de altura de la concha) a diferentes salinidades y a 22 °C.	75
V	Concentración de los solutos orgánicos en el plasma de las almejas mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> expuestas a tres salinidades y a una temperatura de 22 °C.	77

INTRODUCCIÓN GENERAL

Existen tres especies de pectínidos de importancia comercial en México: la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*), almeja voladora (*Pecten vogdesi*) y la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) (Keen y Coan, 1974). Esta última, es una de las especies más grandes y de mayor interés comercial de esta familia de bivalvos de la región Iberoamericana. Se distribuye desde las costas del Perú hasta la Laguna Ojo de Liebre, en Baja California Sur, México (Keen, 1971), la cual es normosalina en la boca que conecta con el Océano Pacífico e hipersalina en el fondo (Roldán-Carrillo *et al.*, 2005). En este último sitio se lleva a cabo una pesquería de almeja mano de león desde hace 20 años cuyo rendimiento ha fluctuado entre 150 y 300 ton de músculos por año (Massó-Rojas *et al.*, 2000). Individuos extraídos en la pesquería, llegan a alcanzar 22 cm de altura, 1,900 g de peso total húmedo y 250 g de peso de músculo abductor (Maeda-Martínez *et al.*, 2001). Son organismos epibentónicos que a diferencia de otros bivalvos, carecen de la capacidad de cerrar herméticamente las valvas para poder aislarse del medio externo ante condiciones adversas. A pesar de que se desconocen los límites de tolerancia y resistencia de esta especie a la salinidad, ha sido considerada candidato para ser cultivada en zonas hipersalinas de Ojo de Liebre e incluso hiposalinas como en algunos cuerpos de agua de Sinaloa y Nayarit.

La salinidad es una de las variables ambientales que determina la distribución de las especies e influye en los procesos fisiológicos de organismos marinos y

estuarinos (Kinne, 1967; Davenport, 1979; Widdows, 1985; Navarro y González, 1998). El nivel y sus variaciones tienen un impacto en la composición y osmolaridad de los fluidos corporales, entre los cuales algunos grupos o especies poseen habilidades fisiológicas de osmoregulación. La osmoregulación puede ser considerada como una función adaptativa de los organismos para ocupar hábitats con una alta, baja o salinidad variable, donde se requiere una amplia tolerancia para sobrevivir. La osmoregulación en moluscos ha sido ampliamente estudiada (Robertson, 1964; Avens y Sleight, 1965; McAlister y Fisher, 1968; Pierce, 1970; Bedford, 1971; Gilles, 1972; Gilles, 1974; Gilles, 1975; Schoffeniels y Gilles, 1972; Pierce y Greenberg, 1973; Hoyaux *et al.*, 1976; Shumway, 1977; Burton, 1983; Singnoret-Brailovsky *et al.*, 1996; Navarro y González, 1998). De acuerdo con esta literatura, los pectínidos son estenohalinos y osmoconformadores perfectos ya que carecen de mecanismos para compensar la presión osmótica y la pérdida o ganancia de agua, donde la composición iónica de la hemolinfa es similar a la del agua de mar.

En el presente trabajo se estudiaron los límites de tolerancia y resistencia superior e inferior y la salinidad óptima para el crecimiento en organismos de la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*). Así mismo, se analizó el balance hídrico y los mecanismos de osmoconformación a diferentes salinidades.

OBJETIVOS

- 1.- Estudiar la tolerancia y resistencia a la salinidad en la almeja mano de león.
- 2.- Investigar la salinidad óptima de crecimiento a través de un estudio de marco de crecimiento, crecimiento, eficiencia neta de crecimiento (K_2) y la relación O/N.
- 3.- Estudiar los mecanismos de osmoconformación a través del balance hídrico, las variaciones en los solutos inorgánicos y orgánicos, y la osmoregulación a diferentes salinidades.

HIPÓTESIS

Los rangos de tolerancia, resistencia y salinidad óptimas de la almeja mano de león son más amplios que en otros pectínidos debido a las condiciones de salinidad variable de Laguna Ojo de Liebre donde habita. Dentro de esos rangos la especie se comporta como un osmoconformador perfecto.

CAPÍTULO 1

TOLERANCIA Y RESISTENCIA A LA SALINIDAD EN LA ALMEJA MANO DE LEÓN (*Nodipecten subnodosus*)

INTRODUCCIÓN

Los pectínidos son considerados bivalvos estenohalinos carentes de capacidad para resistir amplios rangos de salinidad. Esto ha sido demostrado en *Argopecten irradians* (Mercaldo y Rhodes, 1982; He *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001), *Chlamys opercularis* (Paul, 1980), *Mimachlamys asperrima* (O'Connor y Heasman, 1998), *Nodipecten nodosus* (Rupp y Parsons, 2004); *Patinopecten yessoensis* (Sakurai *et al.*, 2000), *Pecten maximus* (Strand *et al.*, 1993; Christophersen y Strand, 2003), y *Placopecten magellanicus* (Frenette y Parsons, 2000; Frenette *et al.*, 2001).

Debido a su amplia distribución geográfica, la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* es un organismo que aparentemente tolera un gran intervalo de salinidades. Sin embargo, se ignoran los límites de tolerancia y de resistencia a esta variable que permitan seleccionar los sitios potenciales de cultivo para esta especie.

La tolerancia y la resistencia de las variables ambientales pueden ser determinadas por dos procesos generales sugeridos por Fry (1947) y Sprague

(1973). El método de tolerancia LC_{50} consiste en mantener contenedores constantes a varias salinidades en los cuales se introducen los organismos y se anota el tiempo que demoran en morir. El método de resistencia expone a los organismos a un incremento o decremento de salinidad constante hasta que el organismo muera. El primer método cubre las condiciones ecológicas, en el cual las especies se pueden encontrar, y el segundo, aunque tiene la desventaja de involucrar dos variables, tiempo y salinidad, permite monitorear los cambios internos que ocurren en el organismo a lo largo del experimento hasta que el organismo muere. En este capítulo, se presentan los resultados de la aplicación de ambos métodos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos experimentales

Ejemplares de almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) de 6.0 ± 0.3 cm de altura cultivados en Laguna Manuela B.C.S. México ($28^{\circ} 07'51.8''$ N; $114^{\circ} 04'1''$ W) (Figura 1), fueron transportados al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste siguiendo el método descrito por Maeda-Martínez *et al.* (2000). Este es un método de transporte en seco cuyo principio radica en evitar la desecación de los organismos manteniendo las valvas cerradas en un ambiente húmedo, y en la disminución del estrés por hipoxia o anoxia, enriqueciendo la atmósfera de la

cámara de transporte con oxígeno puro. Los organismos se empacaron en un sándwich formado con tapas de triplay y capas de hule espuma de 110 cm de largo x 100 cm de ancho x 2.5 cm de espesor, a razón de 290 almejas por capa.

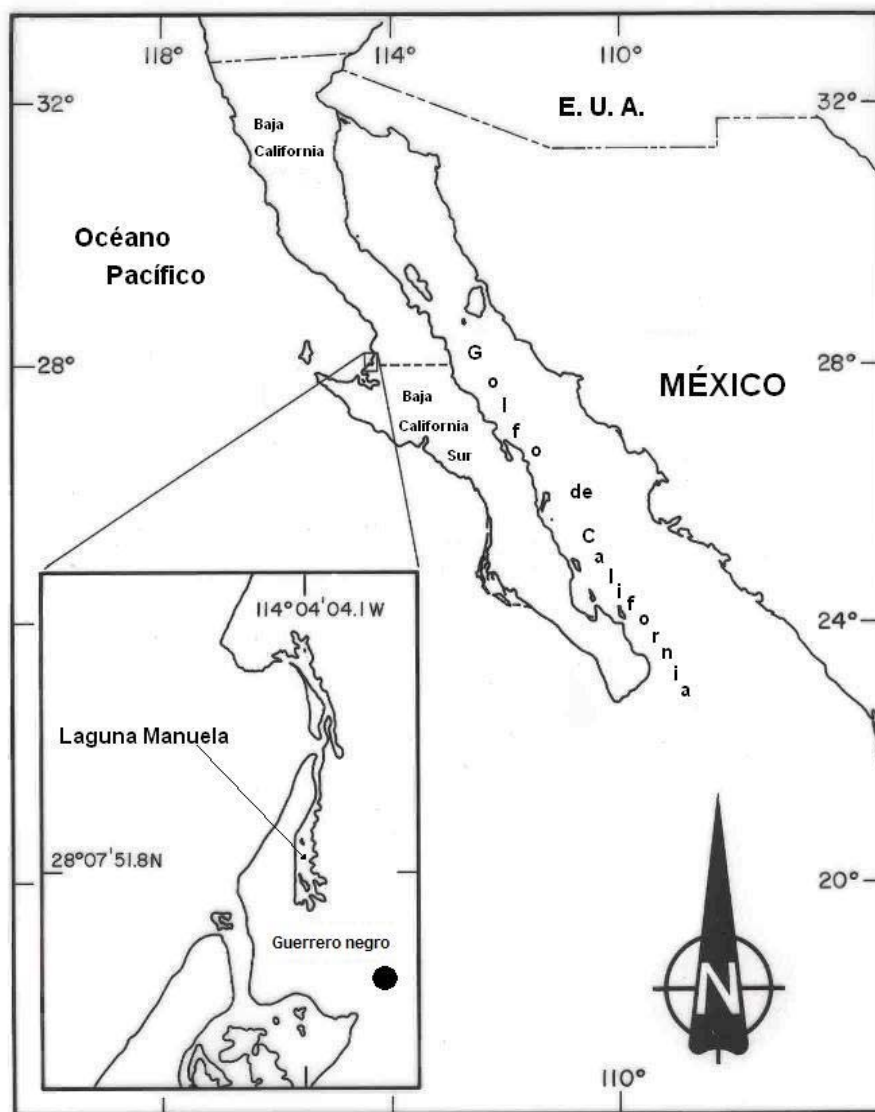


FIGURA 1. Localización del sitio de cultivo de los juveniles de la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) en la Laguna Manuela, Baja California Sur.

La tapa superior fue perforada para permitir la entrada de agua de mar que periódicamente se vaciaba para mantener humedecidas las capas de hule espuma. El sándwich fue colocado dentro de una bolsa de plástico, la cual a su vez se introdujo a una hielera de 1 m³ de capacidad. Posteriormente, se introdujo una manguera de plástico de 0.6 cm de diámetro conectada a un tanque de oxígeno y un electrodo de oxígeno y se selló herméticamente para evitar la fuga de gas. Después la bolsa se infló con oxígeno y se selló la hielera con su tapa. La hielera se mantuvo a 19°C introduciendo bolsas de hielo cuando fuese necesario según lo indicaba un termómetro digital. La concentración de oxígeno se mantuvo entre 50 y 60 ppm, abriendo la válvula del oxígeno cuando era necesario.

Una vez en el CIBNOR, los organismos se colocaron en recipientes de plástico de 500 L con agua marina filtrada a 1 µm a 22 °C de temperatura, 37 ups de salinidad y aireación constante durante 15 días. Las almejas se alimentaron diariamente con dos raciones diarias de 1.0 x 10⁹ cél/almeja/día de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* en proporción 1:1.

Tolerancia a la Salinidad

La tolerancia a la salinidad inferior y superior en juveniles de mano de león se determinó empleando el método de dosis letal media (LC₅₀) durante 4 días. Diez juveniles fueron transferidos por triplicado a contenedores de 70L, conteniendo

40L de agua marina filtrada a 1 μm , aireada y a diferentes salinidades (15, 20, 25, 30, 37, 42, 47, 50 y 60 ups) (Figura 2). Los medios hiperosmóticos se prepararon disolviendo sal obtenida de la Compañía Exportadora de Sal en Guerrero Negro, B.C.S. en agua marina filtrada. El medio hipoosmótico fue preparado diluyendo el agua de mar filtrada con agua destilada. Los experimentos preeliminares mostraron que la proporción de los principales iones en ambos medios era similar al obtenido en el agua de mar. La salinidad del medio se ajustó con un salinómetro YSI, con una resolución de 0.1 ups de resolución. El agua de los tanques se renovó diariamente en un 100%. Los organismos fueron alimentados como se indicó anteriormente. La mortalidad se registró cada 60 min durante las primeras 24 horas y cada 4 horas hasta el final del experimento (96 horas desde que inició del experimento). Los criterios para considerar a un organismo muerto fueron cuando los individuos mantuvieron las valvas abiertas, retracción completa del manto y la inmovilidad del manto o del músculo abductor al introducirle una aguja de disección (Ledwell, 1995; Frenette, 2004). Los valores superiores e inferiores de salinidad del método LC_{50} y sus límites de confianza al 95% fueron calculados para las 24, 48, 72 y 96 h con un programa de computadora basado en un método descrito por Finney (1971), el cual consiste en transformar los datos de mortalidad en una mortalidad Probit. Con este método, se determinó la línea probit estimada y los resultados de una prueba X^2 para el ajuste de los datos. También se realizó una prueba z para comparar los dos valores de LC_{50} obtenidos.

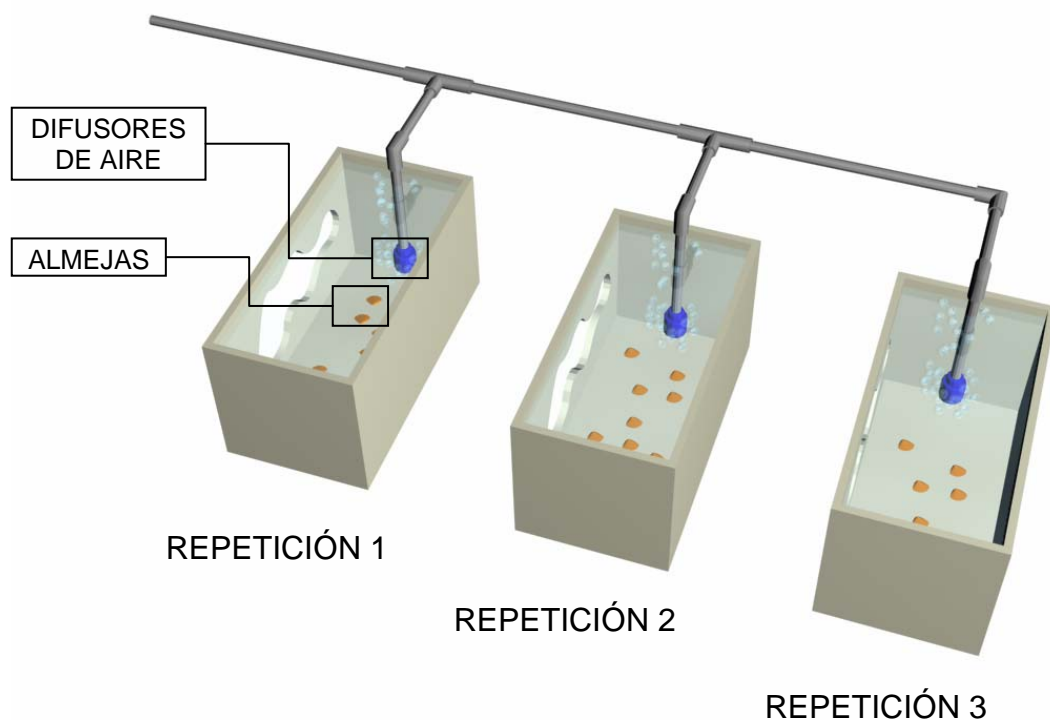


FIGURA 2. Modelo experimental utilizado en el estudio de tolerancia a la salinidad de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*.

Resistencia a la Salinidad

La resistencia a la salinidad se determinó utilizando el método del cambio gradual, donde los organismos fueron expuestos a un incremento o decremento de salinidad, partiendo de la salinidad normal (37 ups).

Siete grupos de 20 organismos se colocaron en contenedores de plástico de 70L con agua marina a 22 °C y 37 ups, y fueron alimentados con la misma dieta del experimento anterior. La salinidad de tres contenedores se incrementó 3 ups cada tercer día y a los otros tres se les disminuyó la salinidad al mismo tiempo. Un contenedor fue mantenido a 37 ups y funcionó como un control (Figura 3). La mortalidad se registró diariamente hasta que todas las almejas murieron. Durante el experimento, se removían los organismos muertos del contenedor para evitar la contaminación del agua.

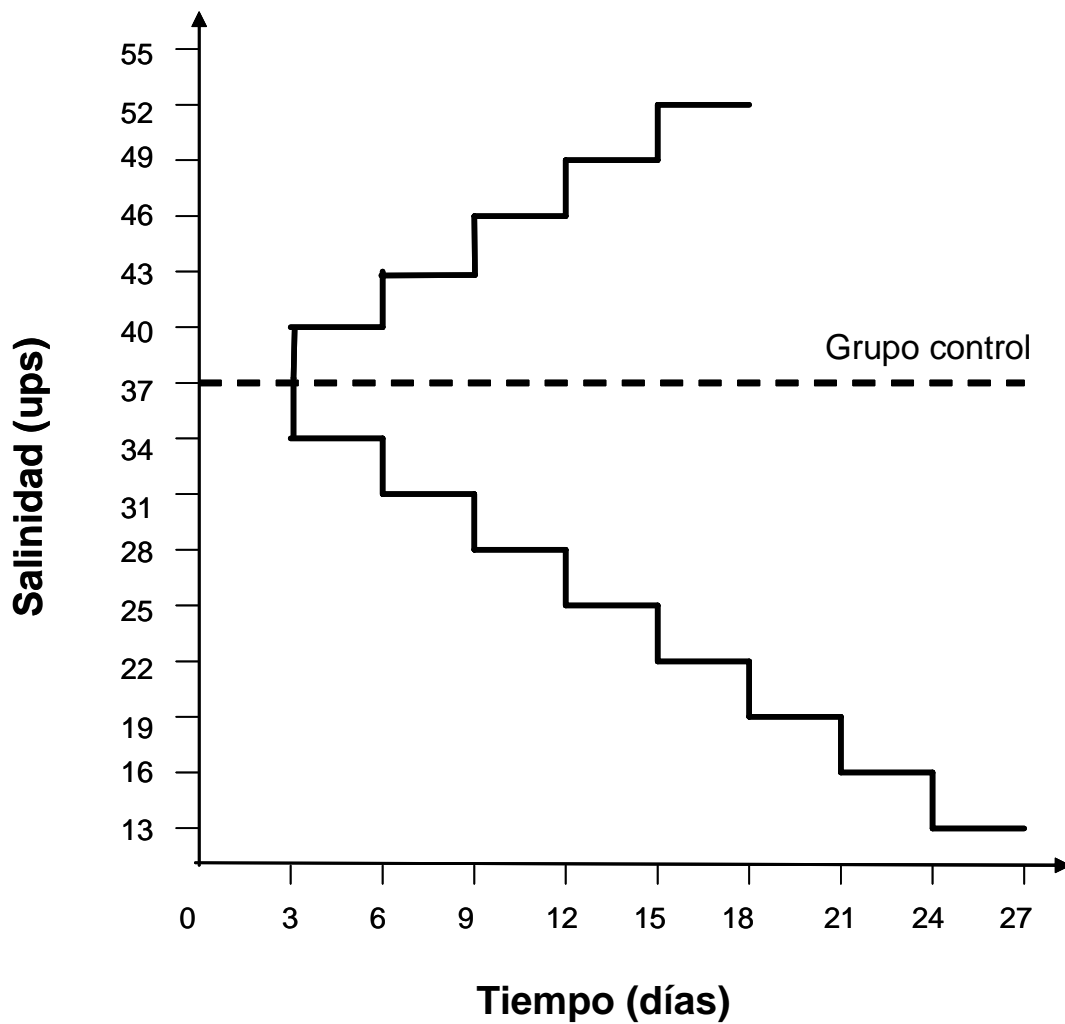


FIGURA 3. Diseño experimental del estudio de resistencia a la salinidad, utilizando siete grupos de 20 almejas mano de león *N. subnodosus*, incrementando a 3 contenedores 3 ups cada tercer día y disminuyendo 3 contenedores al mismo tiempo. El grupo control permaneció a 37 ups.

RESULTADOS

Tolerancia a la salinidad

La mortalidad acumulada a diferentes salinidades se muestra en la Figura 4. La supervivencia de *N. subnodosus* no fue afectada por los cambios agudos de salinidad con un intervalo de 30 a 47 ups. La exposición de las almejas a la salinidad de 25 ups y 50 ups produjo una mortalidad gradual comenzando a las 24 h en el tratamiento a 25 ups y a 60 h en el tratamiento a 50 ups, hasta que el 40% de la mortalidad fue alcanzada en ambos tratamientos a las 96 h.

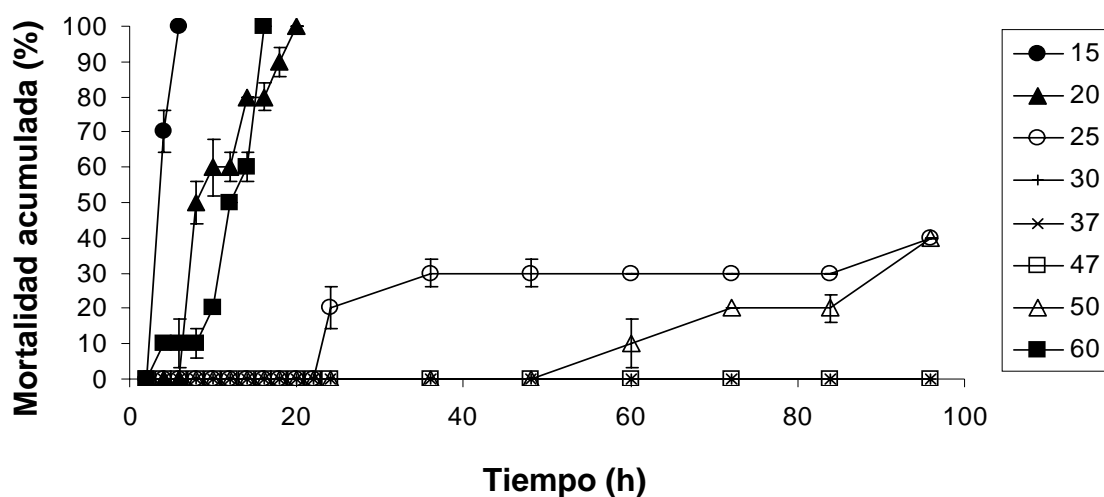


FIGURA 4. Mortalidad acumulada de las almejas mano de león *Nodipecten subnodosus* (6.0 ± 0.3 cm de altura de la concha) aclimatadas a la salinidad de 37 ups y a una temperatura de 22° C, expuestas a cambios agudos de salinidad durante 4 días de experimentación. Los valores son la media \pm desviación estándar.

La mortalidad total ocurrió a la salinidad de 15, 20 y 60 ups en menos de 24 h. Con estos resultados, la salinidad letal media superior calculada a 24, 48, 72 y 96 h (Figura 5a) varió de un promedio de 50.4 a 53.8 ups. La salinidad letal media inferior varió de 23.5 a 24.4 ups de 24 a 96 h de exposición (Figura 5b). La prueba z señaló que no hay diferencias significativas entre los valores de salinidad letal media a diferentes tiempos de exposición tanto en los experimentos de la salinidad superior como la inferior.

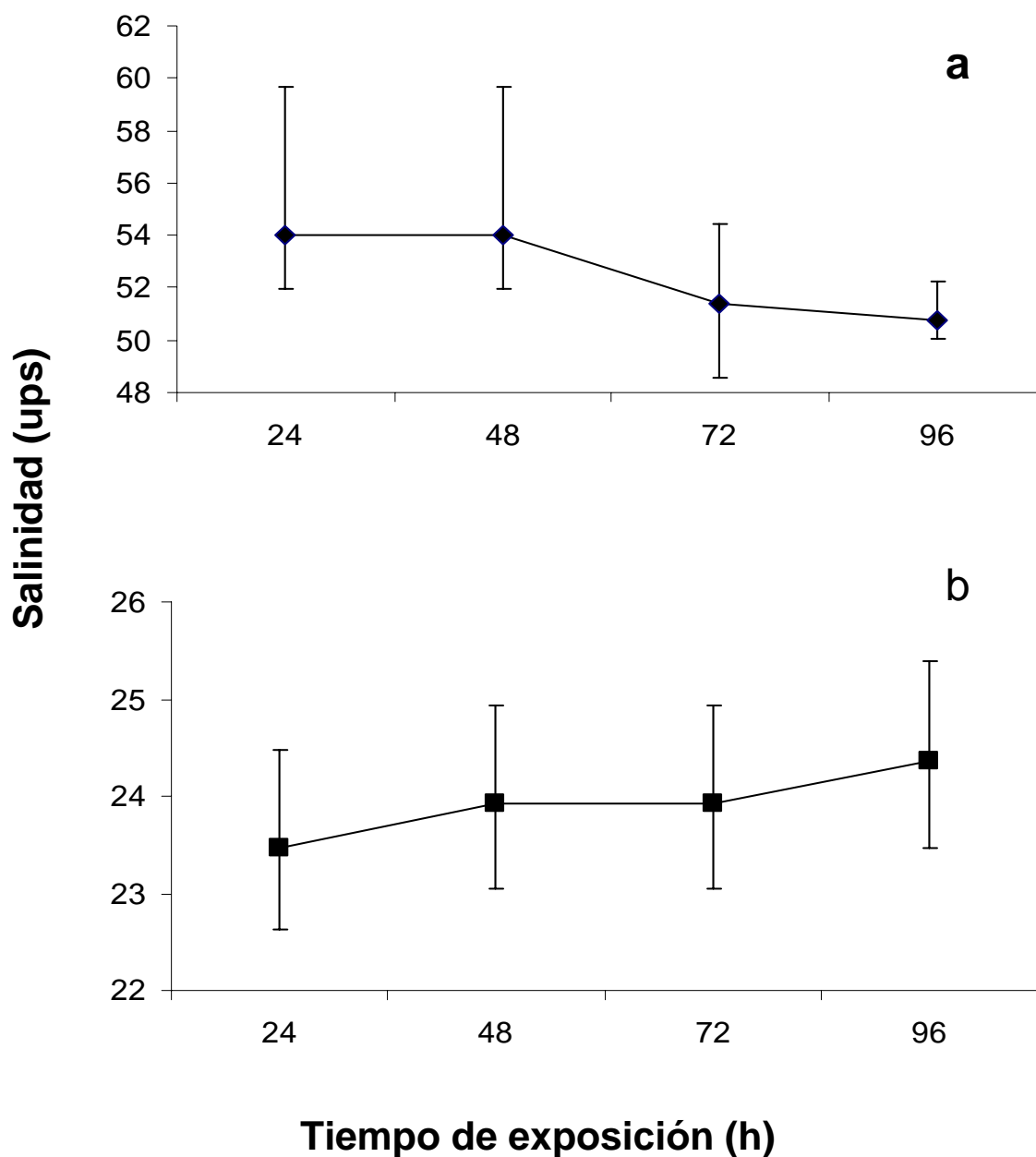


FIGURA 5. Valores de LC₅₀ y límites de salinidad al 95% de confianza de *Nodipecten subnodosus* (6.0 ± 0.3 cm de altura de la concha) aclimatadas a 37 ups y a una temperatura de 22° C a diferentes tiempos de exposición. Los valores son la media ± desviación estándar. LC₅₀ Superior (a); LC₅₀ Inferior (b).

Resistencia a la salinidad

La resistencia a la salinidad con cambios graduales al aumentar o disminuir 3 ups cada tres días (Figura 6) indicó que no hubo muertes entre 22 y 52 ups, pero existió una mortalidad abrupta con exposiciones más allá de este rango.

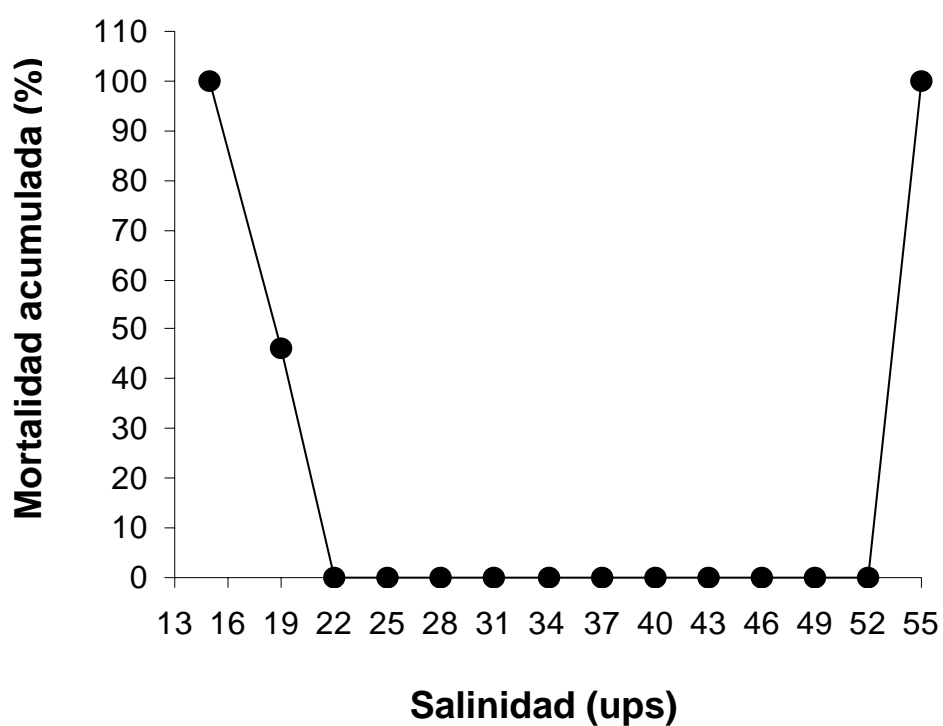


FIGURA 6. Mortalidad acumulada de *Nodipecten subnodosus* (6.0 ± 0.3 cm de altura de la concha) expuestas a cambios graduales de salinidad (± 3 ups cada 3 días), en un rango de salinidad de 16 a 55 ups a una temperatura de 22° C. Los valores son la media \pm desviación estándar.

DISCUSIÓN

Los resultados indican que los valores de tolerancia de salinidad superior e inferior fueron similares a los valores de resistencia a la salinidad superior e inferior en la almeja mano de león. Los valores de tolerancia a la salinidad en *N. subnodosus* fue solamente 2 ups más alto que el nivel de resistencia a bajas salinidades, de 24 a 22 ups, y fue prácticamente el mismo que el límite superior final (52 ups). Inicialmente se esperaba que la diferencia entre la tolerancia y la resistencia fuese mayor debido a que al método gradual para resistencia le permite al organismo adaptarse a un nuevo nivel (Fry, 1947). Esto, junto con el amplio intervalo de tolerancia y resistencia a los cambios de salinidad de alrededor de 28 ups, entre 24 y 52 ups a una temperatura óptima de 22° C (González-Estrada, 2001), sugieren que no se trata de una especie estenohalina. En la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*), el rango de resistencia de solamente 20 ups, entre 27 y 47 ups (Singnoret-Brailovsky *et al.*, 1996). De acuerdo a la literatura (Tabla I), la almeja mano de león posee los límites de tolerancia a la salinidad superior más altos que todas las especies de pectínidos estudiados, aunque esto se basa solamente en los artículos donde reportan la tolerancia a la salinidad superior en escalopas (Singnoret-Brailovsky *et al.*, 1996). En contraste, *N. subnodosus* es una de las especies más sensibles a bajas salinidades, después de *N. nodosus* y *A. ventricosus* con valores mínimos de 23.6 y 22 ups respectivamente (Tablas I y II). Los mecanismos que gobiernan la capacidad de *N. subnodosus* para adaptarse más eficientemente a salinidades altas y ser más sensibles a un medio diluido que

otras especies aún no son conocidos, pero esto puede resultar de una adaptación a largo plazo a condiciones hipersalinas.

TABLA I. Tolerancia a la salinidad inferior y superior de algunas especies de pectínidos y los métodos empleados para las determinaciones.

Especies	Salinidad		Método	Referencia
	Mínimo (ups)	Máximo (ups)		
<i>Chlamys opercularis</i>	16	-	LC ₅₀ 24h	Paul, 1980
<i>Nodipecten nodosus</i>	20.1-23.6	-	LC ₅₀ 48h	Rupp y Parsons, 2004
<i>Nodipecten subnodosus</i>	24	52	LC ₅₀ 96h	Este estudio
<i>Patinopecten yessoensis</i>	18	-	LC ₅₀ 24h	Sakurai <i>et al.</i> , 2000
<i>Placopecten magellanicus</i>	20	-	LC ₅₀ 96h	Frenette y Parsons, 2000

TABLA II. Resistencia a la salinidad inferior y superior de algunas especies de pectínidos y los métodos empleados para las determinaciones.

Especies	Salinidad		Método	Referencia
	Mínimo (ups)	Máximo (ups)		
<i>Argopecten irradians</i>	10	-	Cambio gradual	Mercaldo y Rhodes, 1982
<i>Argopecten ventricosus</i>	27	47	Cambio gradual (5 ups/día)	Singnoret-Brailovsky <i>et al.</i> , 1996
<i>Nodipecten subnodosus</i>	22	52	Cambio gradual 3ups/3 días	Este estudio
<i>Pecten maximus</i>	20	-	Cambio gradual	Christophersen y Strand, 2003; Strand <i>et al.</i> , 1993

CAPITULO 2

SALINIDAD ÓPTIMA PARA EL CRECIMIENTO EN LA ALMEJA MANO DE LEÓN (*Nodipecten subnodosus*)

INTRODUCCIÓN

El crecimiento refleja el aumento del tamaño corporal y/o el desarrollo de tejidos especializados que muestra un organismo a lo largo de su vida (Carillo *et al.*, 2000). Representa la respuesta integrada de los procesos fisiológicos de adquisición y pérdida de energía donde el organismo cuenta con energía libre para realizar funciones distintas a su mantenimiento corporal (Bricelj y Shumway, 1991). Incluye numerosos procesos (*metabolismo*) que tienen un alto grado de organización. Durante el crecimiento la incorporación de moléculas estructurales (*anabolismo*) se da a una velocidad más rápida que la de degradación (*catabolismo*). Generalmente, el crecimiento incluye la división real y multiplicación de las células con el fin de aumentar su número total, el aumento en el tamaño de las células individuales o ambos y por lo tanto el incremento de la biomasa del organismo. La forma en que ocurre y el término del crecimiento, es diferente para los distintos grupos taxonómicos. El caso de los moluscos bivalvos se observa un pronunciado crecimiento de la concha durante el primer año de vida más que en siguientes años, donde el crecimiento es lento o inclusive se detiene (Mottet,

1979). Este evento, está influenciado por diferentes variables ambientales, principalmente la temperatura, disponibilidad de alimento y salinidad, (Bayne y Newell, 1983) y por procesos biológicos endógenos, tales como la edad, factores genéticos y particularmente la actividad reproductiva debido al alto gasto energético que implica (Bricelj y Shumway, 1991).

La evaluación del crecimiento se lleva a cabo comúnmente haciendo un seguimiento morfométrico o de la ganancia en masa de los organismos, lo que permite evaluar de manera directa las condiciones de un cultivo. Sin embargo, este método requiere de largos periodos de estudio, lo que representa una desventaja. Existen formas de estimar el crecimiento de manera más rápida. El potencial de crecimiento ("scope for growth") representa la energía libre que potencialmente podría estar destinada al crecimiento, reproducción y otros parámetros biológicos. Ivelov (1939) y Winberg (1956), realizaron los primeros estudios de crecimiento potencial en peces y desarrollaron un modelo en el que las tasas fisiológicas se expresan en unidades de energía/tiempo. Dicho modelo, conocido como la ecuación de balance energético, considera a los organismos como sistemas termodinámicamente abiertos, intercambiando energía con su entorno de tres formas: calor, trabajo y energía potencial almacenada en compuestos bioquímicos. Este modelo considera las Tasas de Ingestión (TI), Respiración (TR), Producción de heces (TH) y Excreción nitrogenada (TU), que son convertidas a unidades energéticas. Una vez estimados los diferentes

destinos de la energía se puede calcular el crecimiento potencial (PC) por diferencia:

$$\mathbf{PC = TI - (TR + TH + TU)}$$

Posteriormente se han hecho algunas variaciones a la fórmula original como:

$$\mathbf{PC = A - (TR + TU)}$$

Donde "A" representa la fracción de energía absorbida del material ingerido por el organismo (Winberg, 1956), esto es:

$$\mathbf{TA = TI - TH}$$

Siendo TI la materia ingerida y TH la materia fecal. La tasa de Absorción (TA) depende de la Eficiencia de Absorción (EA) del alimento ingerido y puede estimarse mediante la siguiente ecuación:

$$\mathbf{TA = EA * TI}$$

El crecimiento potencial resulta positivo cuando existe energía disponible para crecimiento y producción de gametos, o negativo cuando la energía utilizada en respiración y excreción es mayor que la energía absorbida por el organismo, utilizando en este caso sus reservas corporales para llevar a cabo los procesos vitales. La importancia de este índice se basa en que, al igual que el crecimiento, integra los procesos fisiológicos básicos de un organismo y los relaciona con la adquisición y utilización de la energía. De esta forma, el balance energético de un

organismo depende de los factores que modifican los componentes implicados en la ecuación descrita y por lo tanto la distribución de la energía.

Para estudiar el balance energético de un organismo es necesario estimar, bajo las condiciones deseadas, las tasas fisiológicas implicadas en la ecuación. En moluscos bivalvos, la tasa de ingestión se define como el número de partículas retenidas de cierto volumen de agua por unidad de tiempo. La estimación de ésta puede realizarse por métodos directos, separando el sifón inhalante y exhalante y midiendo el flujo a través de ellos, o bien de manera indirecta midiendo la tasa de remoción de partículas (Bayne, 1976). La tasa respiratoria es una medida indirecta de la tasa metabólica de los organismos, que indica el total de transformaciones energéticas que se llevan a cabo. Frecuentemente, es utilizada como un indicador del estado de actividad del organismo (Davis, 1966). La determinación de la tasa respiratoria se realiza cuantificando el consumo de oxígeno del organismo en relación al tiempo, ya sea por métodos químicos o por medio de electrodos. Por otra parte, la tasa de excreción es la energía perdida de desechos nitrogenados. El catabolismo de proteínas lleva a la formación de amonio, compuesto que representa entre el 60 al 90% del total del material excretado (Navarro, 2001). La determinación de este compuesto normalmente se realiza por métodos químicos (Solórzano, 1969). La energía desechada en las heces, representa la parte del alimento que no fue absorbida por el organismo. Los métodos para estudiar esta pérdida son, recolectando todas las heces y estimando por calorimetría el contenido energético, o bien, de forma indirecta

cuantificando el contenido de carbono por diferencia del peso seco menos las cenizas (Cónover, 1966). Numerosas investigaciones en bivalvos mencionan que los factores internos que afectan mayormente a las tasas fisiológicas descritas son la edad, talla, estado reproductivo, condición fisiológica e información genética, y los externos de mayor relevancia son la temperatura, concentración y calidad de alimento, tensión de oxígeno y salinidad (Bayne, 1976; Shumway, 1991).

Los primeros estudios de balance energético se desarrollaron en peces con la introducción de la ecuación propuesta por Ivellev (1939) y Winberg (1956), y fue acuñada posteriormente por Warren y Davis (1967) para expresar la energía disponible para crecimiento y reproducción.

Los conceptos y métodos del balance energético se aplicaron a partir de la época de los 70's en diferentes moluscos bivalvos. *Mytilus edulis* es la especie más estudiada, aunque ya existe una extensa lista de trabajos en otras especies como *Cerastoderma edule*, *Macoma balthica*, *Mya arenaria*, *Venus verrucosa* y diferentes especies del género *Ruditapes* (= *Tapes*) (Ver referencias en Apéndice A). En pectínidos se han estudiado *Placopecten magellanicus*, *Chlamys farreri*, *C. islandica*, *Argopecten purpuratus*, *Chlamys varia*, *Patinopecten yessoensis*, *Euvola ziczac*, *Nodipecten subnodosus* y *Pecten maximus* (Apéndice A).

El balance energético de un organismo es afectado cuando un factor externo o interno modifica alguno de los componentes de la ecuación y por lo tanto la

distribución de la energía. En pectínidos existen muchos trabajos que de manera individual han estudiado las respuestas de las diferentes tasas fisiológicas ante diferentes factores (Apéndice A). Sin embargo, son pocos los trabajos donde se estudian las tasas fisiológicas para integrar el balance energético y de esa forma entender el destino de la energía cuando los organismos son afectados por algún factor. Estos estudios se han enfocado en la evaluación del efecto de las diferentes dietas y/o regímenes de alimentación sobre el campo de crecimiento en especies de interés comercial (*Argopecten purpuratus*, *Chlamys farreri*, *Crassostrea gigas*, *Euvola ziczac*, *Mya arenaria*, *Mytilus edulis*, *Patinopecten yessoensis*, *Pinctada margaritifera*, *Placopecten magellanicus*), su fisiología reproductiva (*Argopecten irradians irradians*, *Argopecten purpuratus*, *Cerastoderma edule*, *Mytilus edulis*, *Tapes decussatus*), el efecto a cambios en salinidad (*Argopecten purpuratus*), los efectos de las variaciones de mareas y oleaje (*Cerastoderma edule*, *Mercenaria mercenaria*), diferentes parámetros poblacionales (*Chlamys islandica*, *Chlamys varia*, *Macoma balthica*, *Scrobicularia plana*), los efectos de estrés y la contaminación (*Mytilus edulis*, *Placopecten magellanicus*, *Ruditapes decussatus*, *Tapes philippinarum*, *Venus verrucosa*), el costo energético del nado y respuestas de escape (*C. islandica*, *Euvola ziczac* y *P. magellanicus*) (Apéndice A).

Por otro lado, la relación entre el oxígeno consumido y el nitrógeno excretado (O/N), representa el grado en que las proteínas son utilizadas en el metabolismo energético. Esta relación se representa en equivalentes atómicos y fue descrita

para invertebrados marinos por Shumway y Newell (1984). De acuerdo a Bayne (1973), los valores de O/N mayores a 50 representan a organismos saludables, mientras que valores de 30 o menores son indicadores de estrés, donde el organismo lleva a cabo un alto catabolismo de sus proteínas corporales.

La relación O/N puede funcionar como un indicador indirecto de crecimiento. En un organismo sometido a estrés los sustratos energéticos son utilizados para compensar el efecto provocado, teniendo valores bajos de O/N. Por el contrario en un organismo en buena condición fisiológica y en la etapa de crecimiento, la energía que adquiere del alimento y/o algunos sustratos energéticos almacenados, son transformados en la síntesis de proteínas para construcción de nuevas estructuras celulares en el crecimiento, por lo que relación O/N es alta.

En bivalvos la relación O/N ha sido utilizada por algunos autores. Farías *et al.* (1997), no encontraron diferencias significativas en la relación O/N medida en ejemplares reproductores de la almeja *Argopecten purpuratus*, cuando estos fueron expuestos a dietas con diferente concentración de proteínas. Sin embargo, se obtuvieron valores significativamente menores cuando estos bivalvos estuvieron sometidos a una condición de ayuno por un tiempo prolongado, indicando la utilización de reservas proteicas corporales. Por otro lado Navarro y González (1998) al estudiar el efecto de la salinidad sobre la relación O/N de ejemplares juveniles y adultos de la misma almeja encontraron que este índice decrece con la disminución de la salinidad. Según Mayzaud (1973), el valor

mínimo al que puede llegar la relación O/N es 7, que corresponde exclusivamente al catabolismo de las proteínas. Barber y Blake (1985) describieron valores entre 6 y 22 para el pectínido *Argopecten irradians concentricus*. Por su parte los valores obtenidos para *Argopecten purpuratus* en relación a las diferentes salinidades fluctuaron entre 9.5 y 32.6. Siguiendo los resultados de crecimiento potencial calculado para esta especie en relación con la salinidad, Navarro y González (1998) concluyeron que una relación O/N bajo 15 para *A. purpuratus*, representa una condición desfavorable, con valores negativos de crecimiento potencial. Estos resultados sugieren que junto al estudio de la relación O/N también es conveniente investigar otros indicadores que reflejen la condición de la especie, tales como el crecimiento potencial, con el fin de poder dar un mayor significado a los valores entregados en la relación O/N.

A pesar de la influencia de la salinidad sobre los diversos procesos fisiológicos, los estudios que relacionan este factor con la fisiología energética en pectínidos son escasos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos experimentales

Organismos juveniles de mano de león de 6 ± 0.3 cm de altura fueron cultivados en Laguna Manuela, B.C.S. México ($28^{\circ} 07'51.8''$ N; $114^{\circ} 04'1''$ W) (Figura 1) y transportados al laboratorio del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste siguiendo la metodología antes descrita por Maeda-Martínez *et al.*, (2000). Una vez en el laboratorio fueron previamente aclimatados a las salinidades de 25, 30, 37, 43 y 47 ups, a una temperatura de 22°C y alimentados con una mezcla de *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* y *Chaetoceros calcitrans* en una concentración de 100,000 cél/mL en proporción 1:1:1, dos veces al día. Diariamente se les hacían recambios de agua a la misma salinidad y temperatura.

Potencial de crecimiento

Para la determinación del potencial de crecimiento se realizaron las mediciones de las tasas fisiológicas que comprenden la ecuación propuesta por Ivellev (1945), Winberg (1956) y Warren y Davis (1967):

$$\text{PC} = \text{TA} - (\text{TR} + \text{TE})$$

Donde:

PC = Potencial de crecimiento

TA = Tasa de Absorción (energía absorbida)

TR = Tasa Respiratoria (energía perdida por respiración)

TE = Tasa de Excreción (energía perdida por desechos nitrogenados)

Las tasas fisiológicas fueron estandarizadas al peso seco de tejido y posteriormente fueron convertidas a unidades energéticas (Joules/g/h) como se indica más adelante.

Tasa de Absorción

La Tasa de Absorción de los organismos fue calculada mediante la fórmula:

$$TA = TI \cdot EA$$

Donde:

TI = Tasa de Ingestión (cél/g/h)

EA = Eficiencia de Absorción

Tasa de Ingestión

La tasa de ingestión se midió cuantificando el consumo de microalgas por unidad de tiempo en un sistema de cuatro cámaras de vidrio de 1.5 L, de las cuales tres cámaras son independientes y una control, con un afluente de agua marina

controlado y un efluente que permite tomar muestras después de pasar por los organismos (Figura 7). Para las determinaciones de TI de cada tratamiento de salinidad, el sistema de cuatro cámaras se colocó dentro de un baño termorregulado Marca Lauda Brinkmann RE120 de 110 V, el cual sirvió como baño María (Figura 7) y fue previamente calibrado a la temperatura de 22 °C y llenado con agua dulce. Doscientos litros de agua de mar filtrada (1µm) a 22 °C conteniendo 80,000 cél/mL de una mezcla de microalgas de *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* y *Chaetoceros calcitrans* fueron almacenados en un tanque elevado de plástico con aireación continua, lo que permitió la distribución homogénea de las microalgas dentro de la columna de agua y la oxigenación de la misma. Con agua de este tanque se alimentaron las cámaras por gravedad, a través de una manguera de silicón de 0.52 mm de diámetro. Las mangueras se insertaron a través de un orificio perforado en las tapas fabricadas con placa de polietileno rígido, procurando que la manguera penetrara hasta el fondo de las mismas (Figura 8). Las tapas se cerraban de forma hermética con un empaque de hule que sentaba sobre la boca de la cámara y a un sistema de cerrado rápido hecho con alambre acerado con recubrimiento plástico. Para excluir las burbujas automáticamente, la cara interior de las tapas se maquinó de forma cónica para insertar en su vértice la manguera de salida a través de una perforación. Cada manguera de salida se conectó a una "T" de plástico en donde uno de los brazos sirvió para medir el flujo y como drenaje, y el otro se conectó a un distribuidor de plástico con válvulas de cinco vías (cuatro entradas para las cámaras y una salida) para los muestreos de oxígeno.



FIGURA 7. Sistema de flujo continuo para el monitoreo de tasas fisiológicas utilizado con la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*)



FIGURA 8. Cámara independiente con manguera de silicón a través de la cual se le suministra agua de mar a la salinidad en experimentación y a una temperatura de 22 ° C.

Antes de iniciar el experimento, los organismos fueron alimentados y posteriormente fueron transferidos a agua de mar filtrada y aireada durante aproximadamente 24 h, tiempo en el cual cesó la producción de heces. Una almeja fue transferida a cada cámara experimental y posteriormente se hizo pasar el agua de mar con alimento, ajustando el flujo de cada cámara a 60 mL/min con las válvulas del distribuidor de 4 vías. La cuarta vía se usó para analizar el agua que entraba a las cámaras como control. El número de organismos por cámara se definió en un experimento previo, tomando como base que la concentración de oxígeno no fuese menor a la tensión crítica de oxígeno (80% de saturación de O₂) (Sicard, 1999), y de esa forma evitar que la tasa respiratoria fuese dependiente de la concentración de oxígeno (Fry, 1947). Después de una hora, se procedió a tomar muestras de 20 mL de agua de los drenes de cada cámara (Figura 9), para analizar la concentración de partículas en un contador de partículas Beckman Coulter Multisizer 3.



FIGURA 9. Toma de muestra del agua (20 mL) de la cámara para analizar la concentración de partículas.

La Tasa de Ingestión (TI) se midió mediante la fórmula:

$$TI = [(Cb - Cc) * Fj] / PS$$

Donde:

TI = Tasa de Ingestión

Cb = Concentración de células del blanco (cél/mL)

Cc = Concentración de células en las cámaras experimentales (cél/mL)

Fj = Flujo del agua a través de la cámara (mL/h)

PS = Peso seco del tejido de los organismos incubados (g)

Los resultados de la Tasa de Ingestión se expresaron en número de cél/g/h y fueron convertidos a unidades energéticas utilizando el equivalente energético de materia particulada (POM) 23500 J/g (Widdows *et al.*, 1979), tomando como referencia el peso de la mezcla del alimento de 37.913 pg/cél (Lora-Vilchis y Doktor, 2001).

Eficiencia de Absorción

La eficiencia de absorción fue estimada por el método de Cónover (1966) que consiste en relacionar el contenido de materia orgánica e inorgánica en muestras de alimento y de las heces mediante la ecuación:

$$EA = (F - E) / (1 - E) F$$

Donde:

F = Contenido de material orgánico del alimento / peso total del alimento

E = Contenido de material orgánico de las heces / peso total de las heces

El contenido de materia orgánica del alimento es equivalente al peso seco libre de cenizas del alimento, y el contenido de materia orgánica de las heces es equivalente al peso seco libre de cenizas de las heces. En este trabajo se

consideró el contenido de materia orgánica de las microalgas presentado en Lora-Vilchis y Doktor (2001).

El peso seco libre de cenizas de las heces y el peso seco de las heces, fueron determinados en el experimento después de 2 horas de incubación; se tomaron muestras de heces en filtros de fibra de vidrio de 0.75 μm bajo presión negativa. Los filtros se lavaron previamente con agua destilada, se incineraron en una mufla para eliminar la materia orgánica (450°C) por 12 horas y se llevaron a peso constante para obtener el peso del filtro. Los filtros con heces fueron lavados con una solución de formato de amonio al 3% para eliminar las sales de sodio y fueron secados a 65°C hasta obtener un peso constante. Luego, los filtros con las heces fueron incinerados con el mismo método y se llevaron nuevamente a peso constante para tener el peso seco libre de cenizas (Sorokin, 1973). Una vez obtenida la eficiencia de absorción (EA), se procedió a calcular la tasa de absorción como se indicó anteriormente.

Tasa Respiratoria

La tasa respiratoria se determinó simultáneamente a la tasa de ingestión en el mismo sistema de cámaras descrito, por diferencia entre la concentración de oxígeno de la cámara control, menos la de las cámaras con organismos. La concentración de oxígeno (PO_2) se determinó con Oxímetro Microx TX (Figura 10) equipado con un sensor tipo microoptode de fibra de vidrio de 50 μm de diámetro,

instalado en una celda de flujo continuo (Figura 11). El sensor fue conectado al puerto de salida del distribuidor de 5 vías para poder medir la concentración de oxígeno de cada cámara por separado sin alterar el flujo, abriendo la válvula correspondiente. Las concentraciones leídas por el Microx TX fueron registradas cada 5 seg en una computadora y fueron posteriormente graficadas para permitir el cálculo del PO_2 de cada cámara (Figura 12). El consumo de oxígeno se calculó por medio de la ecuación:

$$TR = [(O_{2b} - O_{2c}) * Fj] / PS$$

Donde:

TR = Tasa Respiratoria

O_{2b} = Concentración de Oxígeno disuelto de la cámara control (mL/L)

O_{2c} = Concentración de Oxígeno disuelto en la cámara con organismos (mL/L)

Fj = Flujo del agua a través de la cámara (mL/h)

PS = Peso seco del tejido de los organismos incubados (g)

Los resultados de la tasa respiratoria expresados en $mLO_2/g/h$ fueron transformados a unidades energéticas considerando que un mL de O_2 consumido es equivalente a 20.2 Joules (Elliot y Davison, 1975).



FIGURA 10. Oxímetro Microx TX utilizado para la determinación de oxígeno disuelto (PO_2) en la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*).

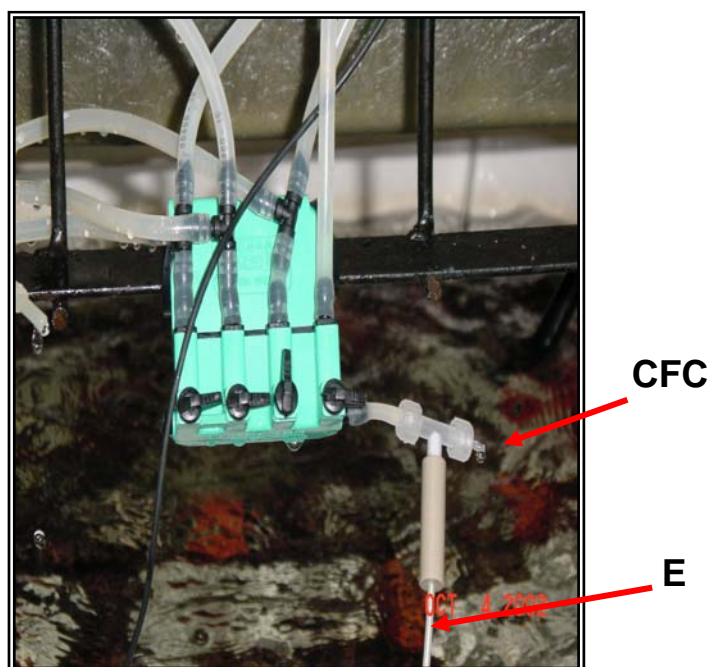


FIGURA 11. Sensor de oxígeno de fibra óptica (microoptode) del Oxímetro Microx TX (E) montado en una celda de flujo continuo (CFC), el cual aparece colocado a la salida del distribuidor de cuatro vías para las determinaciones de oxígeno disuelto.

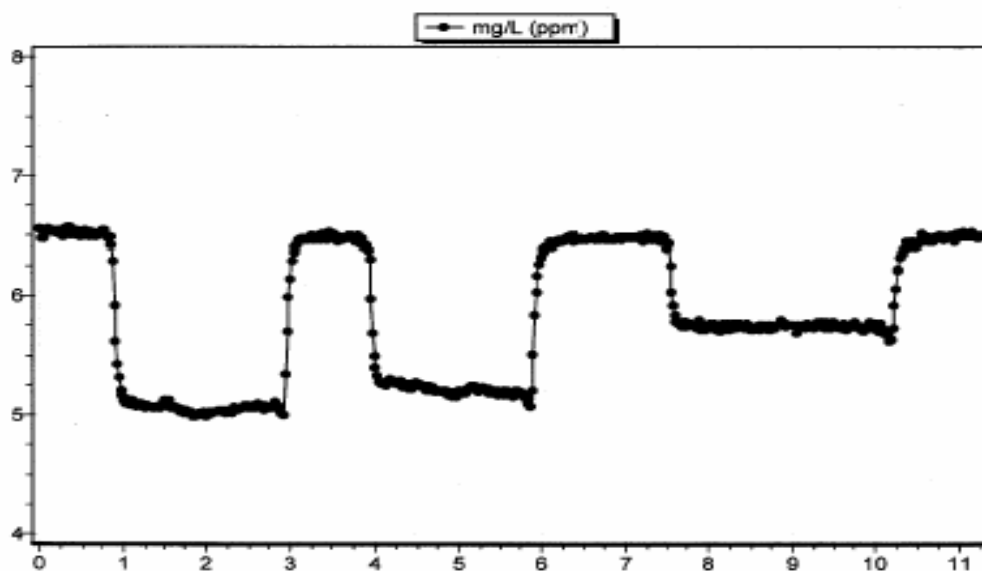


FIGURA 12. Ejemplo del registro de Oxígeno disuelto desplegado en la pantalla de la PC conectada al Oxímetro Microx TX durante un experimento. Las crestas y los valles corresponden a los valores del agua antes y después de pasar por una cámara con organismos.

Tasa de Excreción

Como resultado del metabolismo aeróbico, algunos productos son excretados a través de la orina, principalmente en forma de amonio (NH_4). Un método preciso para la determinación de amonio es el de Solórzano (1969), adaptada a microplaca Hernández-López y Vargas-Albores (2003).

La Tasa de Excreción de los organismos se midió por diferencia entre el contenido de amonio de la cámara control, menos la concentración de los drenes de las cámaras con organismos del mismo experimento descrito con anterioridad. Tres muestras de cada cámara fueron tomadas en tubos Eppendorf de 2 mL y fueron congelados a -80°C hasta su análisis.

La Tasa de Excreción se calculó mediante la ecuación:

$$\text{TE} = [(\text{Ec} - \text{Eb}) * \text{Fj}] / \text{PS}$$

Donde:

TE = Tasa de Excreción

Ec = Concentración de amonio en la cámara con organismos ($\mu\text{gNH}_4/\text{mL}$)

Eb = Concentración de Amonio en la cámara control ($\mu\text{gNH}_4/\text{mL}$)

Fj = Flujo del agua a través de la cámara (mL/h)

PS = Peso seco del tejido de los organismos incubados (g)

La tasa de producción de amonio expresada en $\mu\text{gNH}_4/\text{g/h}$, fue convertida a unidades energéticas utilizando el equivalente energético de 0.0249 Joules por μgNH_4 (Hutchinson y Hawkins, 1992).

Crecimiento

Con el fin de comprobar los resultados de Potencial de crecimiento a diferentes salinidades, se realizó un experimento de crecimiento en talla y peso seco de tejido de los juveniles de la almeja mano de león. La Tasa de Crecimiento (**TC**) se estimó midiendo el incremento en talla y peso seco de tejido por un periodo de 58 días a diferentes salinidades de aclimatación; las cuales fueron: 30 ups, 37 ups y 43 ups. Grupos de 10 organismos (por triplicado), se colocaron en contenedores de plástico de 40 litros conteniendo agua marina filtrada a $1 \mu\text{m}$ a las salinidades mencionadas, a una temperatura de $22 \text{ }^\circ\text{C}$ y alimentados con una mezcla de *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* y *Chaetoceros calcitrans* en una concentración de 100,000 Cél/mL en proporción 1:1:1, dos veces al día. El agua de los contenedores se renovaba diariamente con recambios del 100%. Las mediciones de la concha de las almejas se realizaban semanalmente con la ayuda de un calibrador Vernier con 0.1 mm de precisión.

Al finalizar el experimento de crecimiento en talla, las almejas se pesaron para obtener el peso húmedo total en una balanza analítica Precisa Modelo XT 320 M de 320 g de capacidad con 0.01 g de resolución. Posteriormente, se secaron por un periodo de 72 h a 70 °C en una estufa Blue-M Modelo OV-472^a-2 para obtener el peso seco constante total; se desconcharon obteniendo el peso seco de las conchas y por diferencia obtener el peso seco de tejido.

Eficiencia neta de crecimiento (K_2)

La Eficiencia Neta de Crecimiento mide la eficiencia en el cual el alimento es convertido en tejido. Fue calculado con la ecuación

$$K_2 = [TA - (TR + TE)] / TA$$

Donde:

K_2 = Eficiencia neta de crecimiento

TA = Tasa de Absorción

TR = Tasa Respiratoria

TE = Tasa de Excreción

Los resultados se expresaron en J/g/h.

Relación O/N

La Relación O/N se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\mathbf{O/N} = (\mathbf{TR/ 16}) / (\mathbf{TE/14})$$

Donde:

TR = Tasa Respiratoria en mg O₂/h

TE = Tasa de Excreción

RESULTADOS

Potencial de crecimiento

Se presentan los resultados de las tasas fisiológicas de Absorción, Respiración y Excreción, así como la Eficiencia de Absorción a partir de las cuales se calculó el Potencial de Crecimiento.

Tasa de Absorción

Como se indicó anteriormente, la Tasa de Absorción se calculó, multiplicando la Tasa de Ingestión por la Eficiencia de Absorción.

Tasa de Ingestión

En la Figura 13 se observa la Tasa de Ingestión (TI) de los organismos expuestos a diferentes salinidades. Los resultados indican que las almejas sometidas a las salinidades de 25 y 47 ups tienen una Tasa de Ingestión menor en comparación con las demás salinidades. La Tasa de Ingestión fue máxima a 37 ups con 9.57×10^7 Cél/g/h. Una prueba de comparación múltiple de Tuckey, señala una TI similar en los organismos a salinidades de 30, 37 y 43 ups.

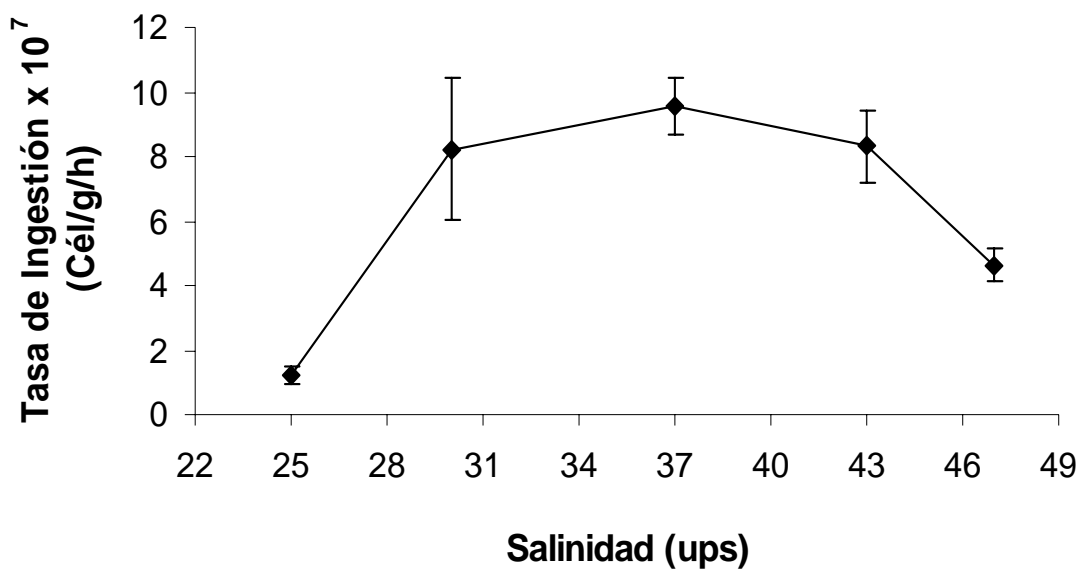


FIGURA 13. Tasa de Ingestión en juveniles de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* a diferentes salinidades.

La Eficiencia de Absorción

La Eficiencia de Absorción (Figura 14) fluctuó en un intervalo de 50.52% a 80.37% encontrando un mayor porcentaje a 37 ups. Se presentaron diferencias significativas (prueba de comparación múltiple de Tuckey, $P < 0.05$) entre las salinidades; sin embargo a las salinidades 30 y 43 ups el porcentaje de Eficiencia de Absorción fue similar.

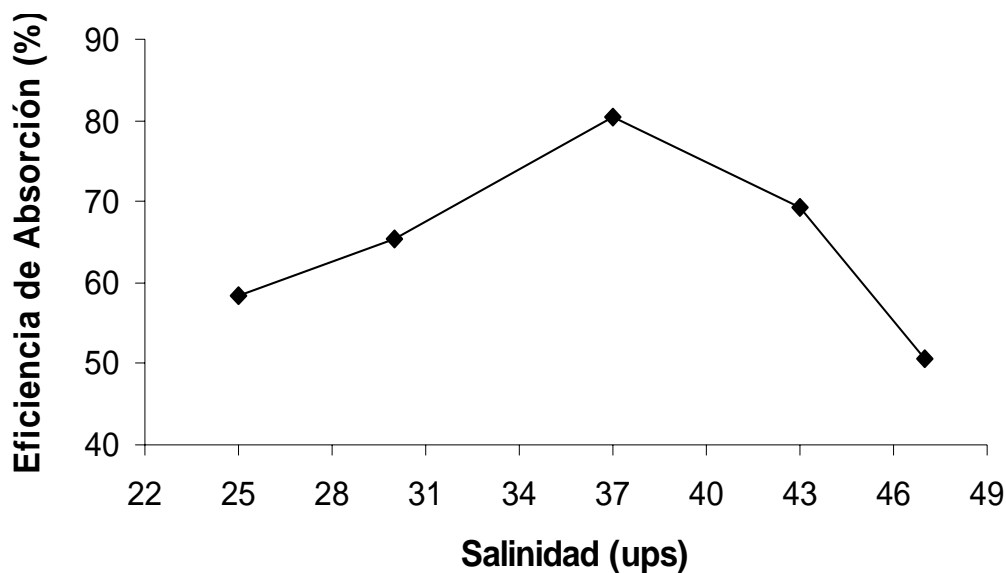


FIGURA 14. Eficiencia de Absorción (%) en juveniles de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* a diferentes salinidades.

La Tasa de Absorción (Figura 15) incrementó de 25 ups a 37 ups con valores de 6.05 J/g/h y 65.54 J/g/h respectivamente y declinó a 47 ups con 19.93 J/g/h. El ANDEVA realizado a los datos indicó diferencias significativas ($P < 0.05$) de los organismos a las diferentes salinidades. La prueba de rangos múltiples de Tuckey mostró diferencias significativas en los tratamientos de 25, 37 y 47 ups.

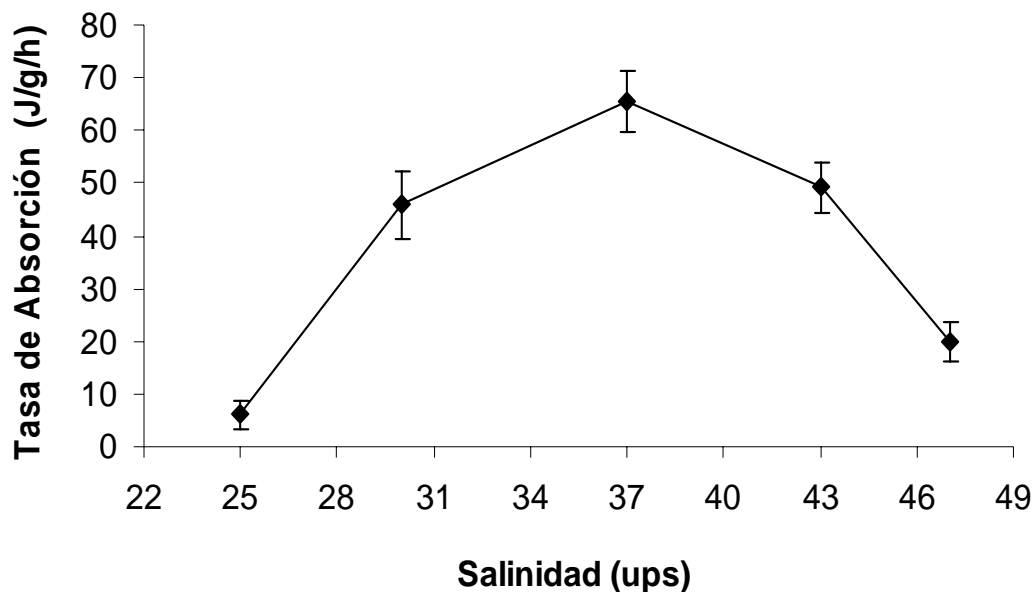


FIGURA 15. Tasa de Absorción en juveniles de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* a diferentes salinidades.

Tasa Respiratoria y Tasa de Excreción

La Figura 16 y Figura 17 de la Tasa Respiratoria y Tasa de Excreción respectivamente presentan el mismo patrón, observando un decremento a la salinidad de 37 ups. La prueba de rangos múltiples de Tuckey mostró que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$) en la TR y TE de los tratamientos 43 y 37 ups.

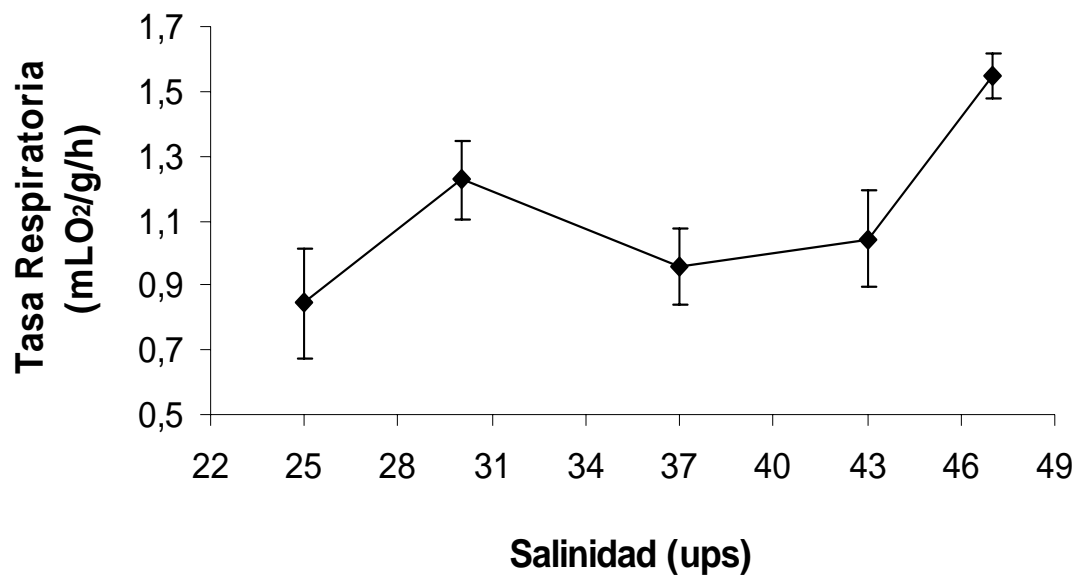


FIGURA 16. Tasa Respiratoria en juveniles de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* aclimatados a diferentes salinidades.

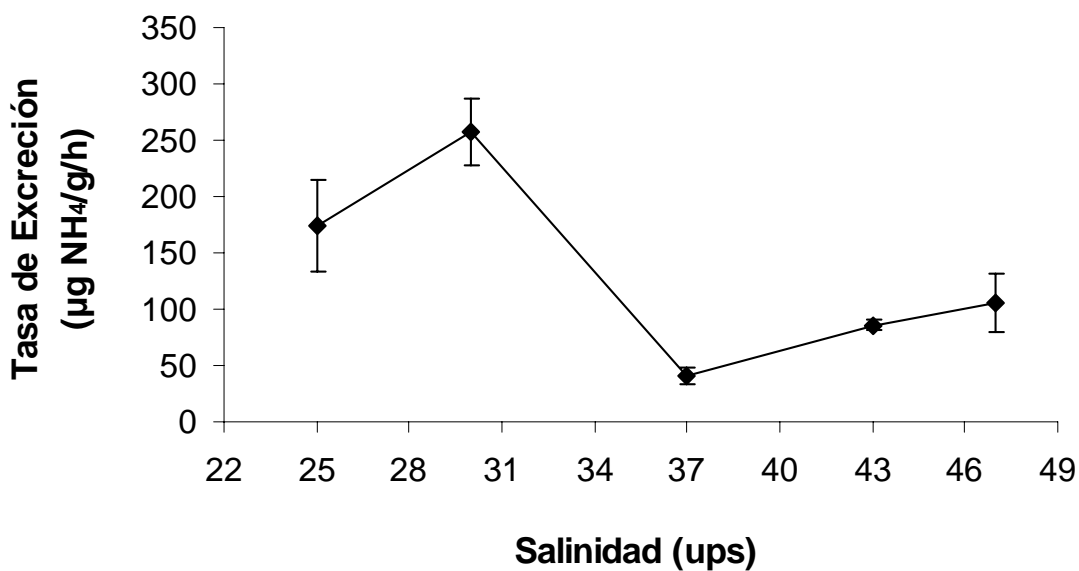


Figura 17. Tasa de Excreción en juveniles de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* aclimatados a diferentes salinidades.

La Tasa Respiratoria aumentó de 0.8452 a 1.2258 mL O₂/g/h a salinidades de 25 y 30 ups y disminuyó a 0.9565 mL O₂/g/h a la salinidad de 37 ups; a partir de esta salinidad aumentó a 1.549 mL O₂/g/h a la salinidad de 47 ups.

La Tasa de Excreción incrementó de 174 µg NH₄/g/h a 257 µg NH₄/g/h a las salinidades de 25 y 30 ups respectivamente y se observó una abrupta caída a 37 ups con 41 µg NH₄/g/h; posteriormente hubo un ligero incremento a 86 y 106 µg NH₄/g/h a la salinidad de 43 y 47 ups.

Los resultados de Tasa de Absorción, Tasa Respiratoria, Tasa de Excreción a diferentes salinidades se integraron en la ecuación de Potencial de crecimiento (PC), tomando en consideración los equivalentes energéticos (Figura 18).

Los valores positivos del Potencial de Crecimiento se registraron en las salinidades de 30, 37 y 43 ups, siendo éstos 14.50 J/g/h, 45.07J/g/h, 25.86 J/g/h respectivamente. El ANDEVA mostró diferencias significativas ($P<0.05$) sobre la influencia de la salinidad en el Potencial de crecimiento y la prueba Tuckey mostró un PC similar en los tratamientos de 25 y 47 ups.

Estos resultados señalan que una salinidad óptima para el crecimiento de juveniles de la almeja mano de león (*N. subnodosus*) es de 37 ups. A esta

salinidad se encontró la mayor disponibilidad de energía libre para crecimiento, la cual se atribuye a la elevada Tasa de Absorción, y a las bajas pérdidas de energía debidas a la Tasa Respiratoria y Tasa de Excreción de amonio.

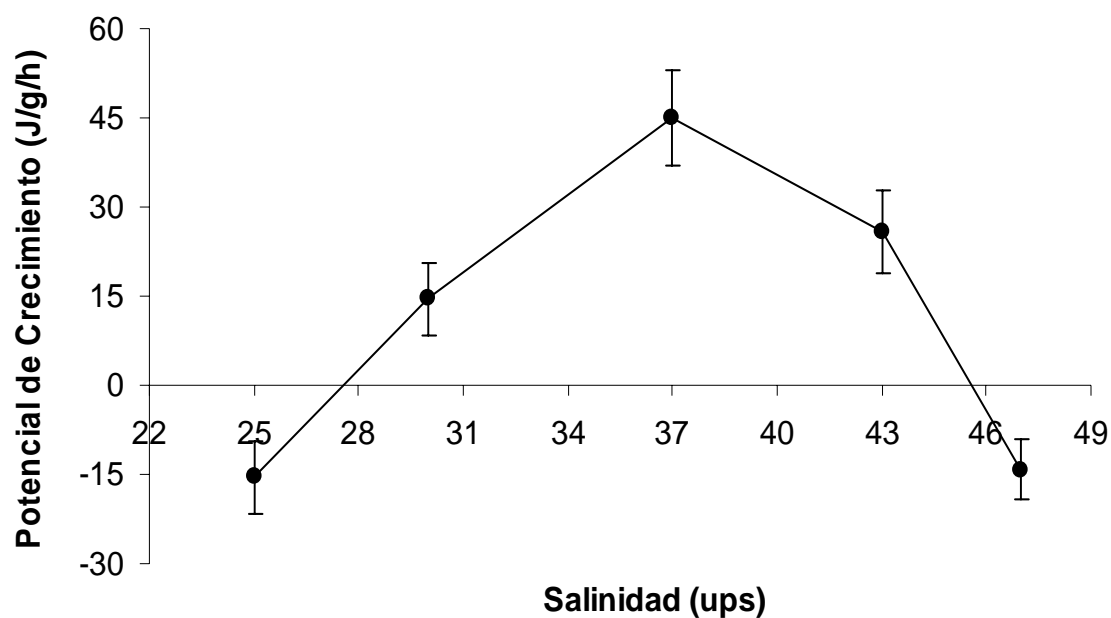


FIGURA 18. Potencial de crecimiento en juveniles de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* a diferentes salinidades. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

Crecimiento

Al finalizar el experimento de crecimiento, no se presentaron diferencias significativas en las tallas de los organismos expuestos a salinidades de 30 y 43 ups ($P>0.05$), siendo estos valores menores que los encontrados a la salinidad de 37ups, donde se encontró el mayor crecimiento en talla (Figura 19)

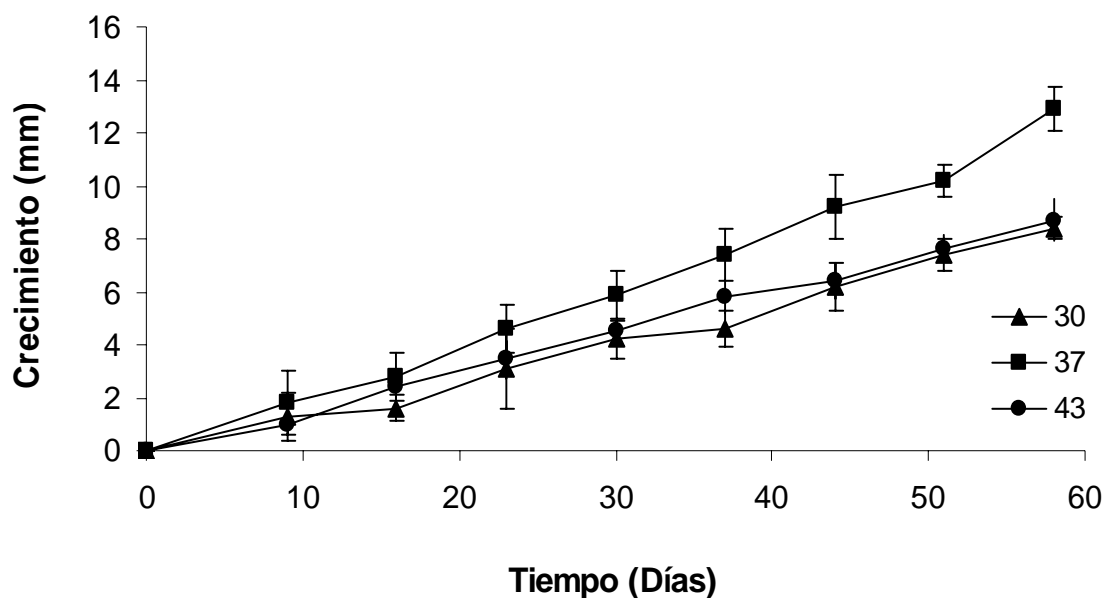


FIGURA 19. Crecimiento de juveniles de la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) a diferentes salinidades, durante 58 días de experimentación. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar.

Sin embargo, en el peso seco de tejidos de las almejas de los distintos tratamientos, se observa un incremento de 30 a 37 ups, y una disminución a la salinidad de 43 ups; se encontró que no existieron diferencias significativas en salinidades de 37 y 43 ups, ($P > 0.05$) (Figura 20).

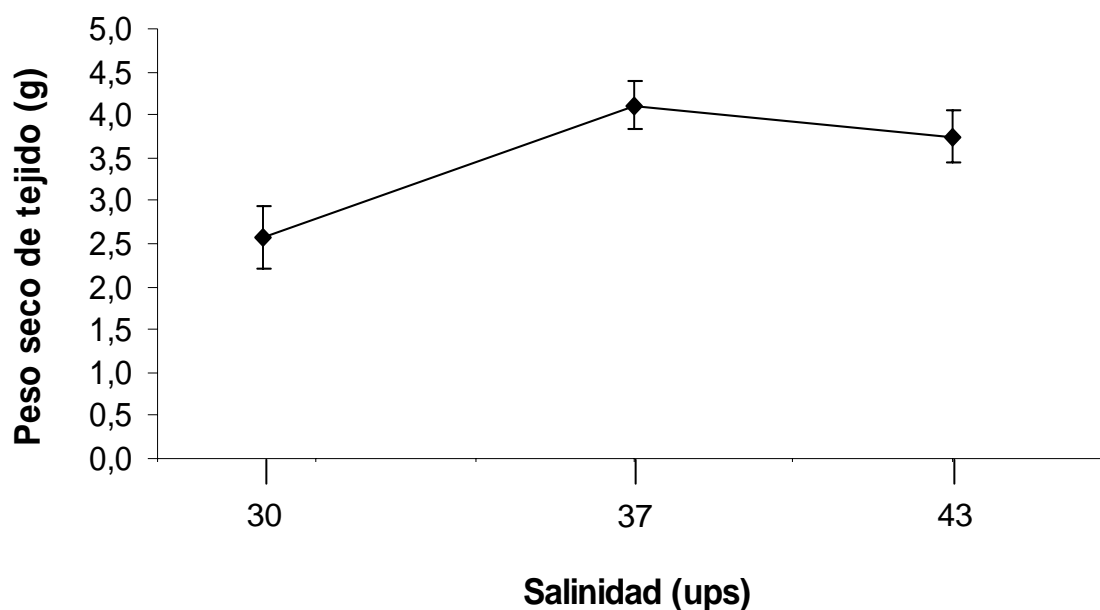


FIGURA 20. Incremento en peso seco de tejidos de la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) sometida a tres tratamientos de salinidad durante 58 días. Los valores representan la media \pm la desviación estándar.

Eficiencia neta de crecimiento (K_2)

Los resultados del cálculo de la Eficiencia neta de crecimiento (K_2) de los organismos (Figura 21), señalan que en las salinidades de 30, 37 y 43 ups los valores son positivos, lo cual indica que existe crecimiento de tejido en las almejas a estas salinidades, sin embargo la mayor eficiencia se encuentra a la salinidad de 37 ups con 0.69 J/g/h. Las salinidades 25 y 47 ups presentan valores negativos, -2.55 y -0.71 J/g/h, respectivamente. Los análisis estadísticos señalan no diferencias significativas a salinidades de 37 y 43 ups ($P > 0.05$).

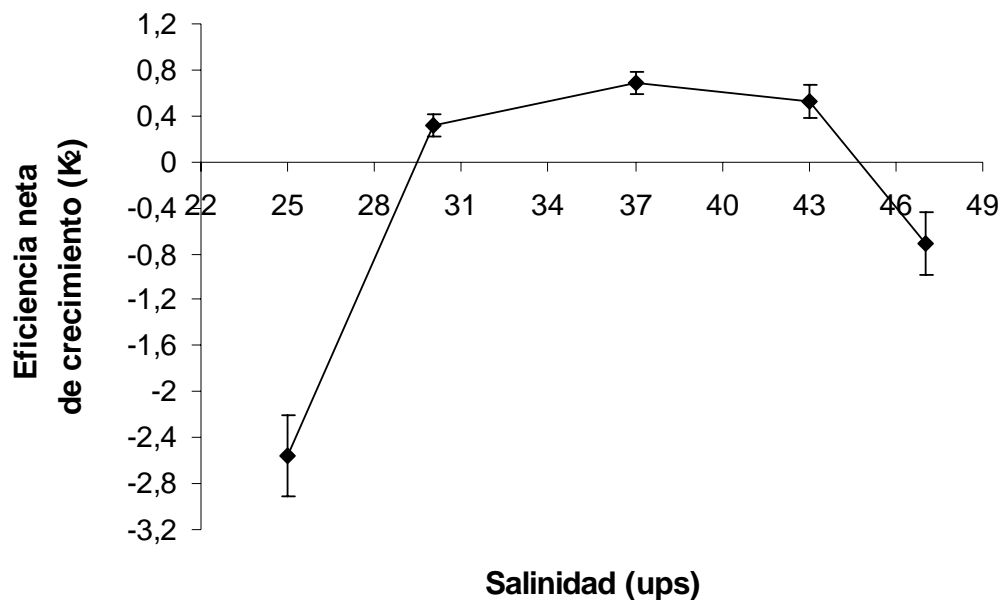


FIGURA 21. Eficiencia neta de crecimiento de la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) sometida a diferentes salinidades.

Relación O/N

La relación del oxígeno consumido a NH_3 excretado (O/N calculado en equivalentes atómicos) fue utilizada para identificar el nivel de proteínas metabólicas de las almejas, y el rango varió de 5.9 a 29.1 a la salinidad de 25 y 37 ups, respectivamente (Figura 22). Este índice señala que existe una mayor proporción de proteína catabolizada, relativa a carbohidratos y lípidos, a la salinidad de 37 ups. El resultado de un análisis estadístico señala diferencias significativas entre las salinidades ($P < 0.05$).

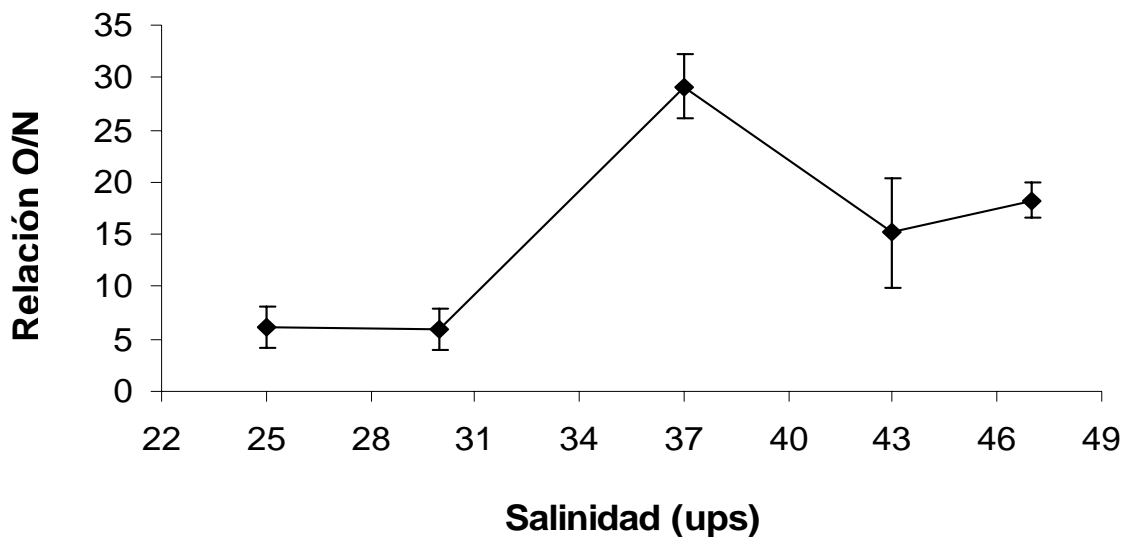


FIGURA 22. Relación O/N de las almejas mano de león *Nodipecten subnodosus* expuestas a diferentes salinidades.

SUPERVIVENCIA

La supervivencia registrada en cada tanque se presenta en la Figura 23. Al final del periodo de experimentación de 58 días, la supervivencia se mantuvo al 100% en los contenedores a las salinidades de 30, 37 y 43 ups.

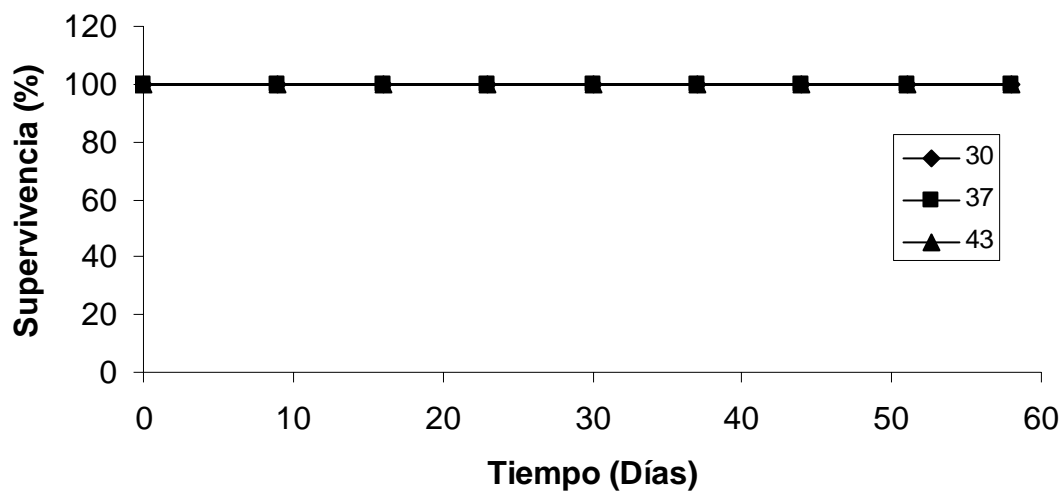


FIGURA 23. Supervivencia de la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) durante 58 días de experimentación sometidas a tres salinidades diferentes.

DISCUSIÓN

El presente trabajo fue diseñado para analizar las diferencias fisiológicas de las almejas mano de león *N. subnodosus* a diferentes salinidades. Los resultados obtenidos sugieren que estas diferencias pueden establecer la cantidad de energía utilizada para el crecimiento. Lo anterior se debe a que factores ambientales tales como la salinidad, temperatura, alimentación y disponibilidad de oxígeno modifican diferencialmente las tasas de ingestión, metabolismo, tasa de absorción y excreción influyendo en el presupuesto energético de invertebrados marinos (Newell, 1979; Navarro y Winter, 1982).

El uso de métodos y sistemas adecuados empleados para estimar las tasas fisiológicas implicadas en la ecuación de balance energético, son factores determinantes para la obtención de resultados precisos que reflejen las respuestas de los organismos hacia las variables a estudiar. El sistema de cámaras utilizadas en este trabajo demostró ser adecuado, de fácil manejo y representa varias ventajas tanto en estudios a corto como a largo plazo. Particularmente para los pectínidos, factores como la temperatura, el flujo de agua, la cantidad y calidad de alimento disponible, son determinantes para su alimentación. A diferencia de otros grupos, no tienen sifones para succionar las partículas a la región oral, por lo tanto, son organismos incapaces de obtener partículas que se encuentran más allá de su alrededor (Wildish y Kristmanson, 1997). En su lugar, generan una corriente inhalante y otra exhalante por medio de movimientos del manto y de la

actividad ciliar (Binniger y LePenneec, 1991). En ausencia de flujo, los organismos son incapaces de renovar el agua que los rodea y mueren de inanición y asfixia. Por lo tanto, el uso de sistemas abiertos en los que se regule la velocidad de flujo es determinante en estudios de pectínidos donde la adquisición de energía sea un punto de partida clave para la investigación, como es el caso del balance energético.

La integración de las tasas fisiológicas, en la ecuación de PC, dio como resultado una salinidad óptima de crecimiento a 37 ups. A esta salinidad se encontró la mayor disponibilidad de energía libre para crecimiento. La salinidad de 43 ups, fue el tratamiento que presentó la disponibilidad de energía más elevada después del de 37 ups, sin embargo, con respecto a esta última, existió diferencias significativas en PC y se obtuvo un menor crecimiento en concha, aunque en peso fue estadísticamente similar. En relación a esto, se sabe que el incremento en peso y altura de la concha no necesariamente se encuentran relacionados, como se ha presentado en *Mytilus edulis* (Thompson y Macdonald, 1991).

Dentro de las variables que integran el PC, la Tasa de Ingestión en juveniles de almeja mano de león, se vio influenciada por la salinidad, incrementando hasta llegar a un máximo a la salinidad de 37 ups y posteriormente declinando (Figura 13). Este patrón se presentó también en la Eficiencia de Absorción y Tasa de Absorción (Hutchinson y Hawkins, 1992; Navarro y González, 1998). En contraste con otros bivalvos (mejillones, ostras), las características anatómicas de

Nodipecten subnodosus, no permite un cierre hermético de sus valvas por periodos prolongados a cambios de salinidades. Estas observaciones se han encontrado en *Chlamys opercularis* (Shumway, 1977) y *Patinopecten caurinus* (Bernard, 1983), presentando efectos negativos por los periodos prolongados de exposición a bajas salinidades debido a que no pueden aislarse del medio. Estas características tienen un importante efecto en los mecanismos de osmoregulación de estas especies, reduciendo significativamente la tasa de ingestión y el potencial de crecimiento.

La salinidad también tiene un claro efecto sobre la actividad metabólica de *N. subnodosus*. En *Argopecten purpuratus* se observa algo similar. El consumo de oxígeno en un ejemplar de 1 g de peso seco de tejido aumentó al bajar la salinidad de 30 a 24 ups (Navarro y González, 1998). En este estudio, la Tasa Respiratoria de las almejas aumentó significativamente de 37 ups a 30 ups (Figura 16); Estos resultados fueron explicados por el incremento en la actividad metabólica relacionada con el catabolismo de las proteínas, donde los aminoácidos fueron utilizados como osmolitos para resolver problemas de osmoregulación a causa de la reducción de salinidad. En el presente trabajo se observó un efecto similar, ya que se observó un incremento de las Tasas de Excreción entre 37 y 30 ups. (Figura 17). Navarro y González (1998) también demostraron que el consumo de oxígeno disminuyó a las menores salinidades experimentales (18 y 21 ups) y esto se relacionó con la disminución o cese de la actividad de alimentación, indicando el alto grado de aislamiento al que puede llegar una especie como una forma de

evadir es estrés osmótico. Patrones similares de consumo de oxígeno en relación a fluctuaciones de salinidad han sido descritos en otras especies de bivalvos (Strickle y Sabourin, 1979; Windows, 1985).

El catabolismo de las proteínas lleva a la formación de amonio, compuesto que representa el 60–90 % del total de nitrógeno excretado en numerosas especies de bivalvos. Las pérdidas de energía asociadas con la excreción de amonio puede representar un bajo porcentaje del total de la energía absorbida (1 – 10 % en bivalvos mitílidos), lo que ha llevado a que estas pérdidas sean ignoradas o en algunos casos estimadas por diferencia dentro de los estudios de balance energético (Navarro, 2001). Al estudiarse el efecto de salinidad sobre la excreción de amonio en *Argopecten purpuratus* (Navarro y González, 1998), se encontró que esta especie aumenta su Tasa de Excreción frente a una disminución de la salinidad desde 30 a 24, demostrando su capacidad para regular el volumen celular mediante el rompimiento y utilización de los aminoácidos como reguladores isosmóticos intracelulares a medida que disminuye la salinidad. Este resultado es similar al obtenido en este estudio con la almeja mano de león, en donde la Tasa de Excreción aumenta de la salinidad de 37 a 30 ups. (Figura 17). Livingstone *et al.* (1979) describe un incremento en la excreción de amonio en *Mytilus edulis*, asociado al aumento de aminoácidos en la hemolinfa a medida que disminuía la salinidad.

Como se mencionó, la relación O/N representa en grado en que las proteínas son utilizadas en el metabolismo energético de invertebrados marinos (Shumway y Newell, 1984); este índice fisiológico apoya lo mencionado anteriormente, presenta una disminución de la salinidad de 37 a 30 ups con un rango de 29.1 a 5.9; Según Mayzaud (1973) señala que el valor mínimo de la relación O/N es 7, que corresponde al catabolismo de las proteínas. Barber y Blake (1985) describieron valores entre 6 y 22 para el pectínido *Argopecten irradians concentricus*. Por su parte los valores obtenidos para *Argopecten purpuratus* en relación a las diferentes salinidades fluctuaron entre 9.5 y 32.6.

Otro índice utilizado en este trabajo es la Eficiencia Neta de Crecimiento (K_2), indicando que las salinidades 30, 37 y 43 ups son salinidades en donde existe un crecimiento de tejido, siendo mayor a la salinidad de 37 ups y los resultados observados en el crecimiento de la concha y peso seco de tejido (Figura 19 y 20), fueron concordantes con esta observación.

CAPÍTULO 3

BALANCE HÍDRICO DE SOLUTOS Y OSMOREGULACIÓN EN LA ALMEJA MANO DE LEÓN (*Nodipecten subnodous*) A DIFERENTES SALINIDADES

INTRODUCCIÓN

Los bivalvos son considerados osmoconformadores, desde que tienen una concentración osmótica en sus fluidos corporales igual a la del agua de mar. Por lo tanto, no tienen la necesidad de ajustar el movimiento osmótico del agua (Schmidt-Nielsen, 1997). En agua de mar diluida, el peso húmedo de tejido de un bivalvo se incrementa por la entrada osmótica del agua que ocurre en su cuerpo (Robertson, 1964). En contraste, este bivalvo pierde peso (agua) por la solución hiperosmótica en agua concentrada.

Considerando la regulación y las respuestas a los cambios de salinidad, Burton (1983) menciona que esta depende grandemente en los cambios de peso de todo el cuerpo. Por lo tanto, no se conoce si el volumen de la hemolinfa fluctúa cuando un molusco es expuesto a diferentes salinidades. En moluscos, el volumen de hemolinfa ha sido medido por la cantidad de dilución concentrada de la inulina C¹⁴ radiactivo introducido en el sistema circulatorio (Taylor y Ragg, 2005). El promedio de los valores del espacio de la inulina en *Mytilus californianus* fue de 50.8% en

relación al tejido del organismo (Martin *et. al.*, 1958). Este método necesita ser modificado en un laboratorio con facilidades para el manejo de materiales radioactivos. Como un método exploratorio, la extracción directa de la hemolinfa del músculo abductor probablemente da una estimación de las variaciones del volumen, entonces este órgano es irrigado por la aorta posterior, la cual es una de las arterias más grandes en bivalvos (Beninger y Le Penec, 1991).

En la literatura de osmoregulación en bivalvos marinos, los resultados son contrastantes. Shumway (1977), Widdows (1985), Singnoret-Brailovsky *et al.* (1996), Navarro y González (1998), señalan que la presión osmótica de la hemolinfa es isosmótica con el medio externo. Sin embargo, Pierce (1971) encontró que los fluidos extracelulares de *Modiolus* sp. son hiperosmóticos en relación al medio en aproximadamente una proporción igual a la concentración de potasio, aminoácidos libres y proteínas.

Por otra parte, Somero y Bowlus (1983) mencionan que la composición y concentración en hemolinfa es igual a la del medio externo, mientras que Schmidt-Nielsen (1997) concluyó que esa igualdad no indica misma composición de solutos que medio externo; al contrario, mantienen concentraciones de sal que están fuera de equilibrio con el medio externo requiriendo una regulación extensiva. Concentraciones mayores de K^+ se han encontrado en hemolinfa de *Mytilus* sp. y *Pecten maximus* (Potts y Parry, 1964; Burton, 1983). La regulación del equilibrio osmótico en *Tridacna maxima* consiste en aumento de K^+ y Ca^{2+} y disminución de

sulfatos en comparación con el agua de mar (Robertson 1964; Pierce 1971; Deane y O'Brien 1980).

Otros autores señalan el papel de los solutos orgánicos en la hemolinfa como reguladores osmóticos. Bayne (1976) menciona que la concentración osmótica en hemolinfa está determinada principalmente por iones inorgánicos; Somero y Bowlus (1983), George y Damodaran (1999) encontraron que los osmolitos orgánicos juegan un rol importante en el balance osmótico. Sin embargo, el plasma de los moluscos contiene numerosas moléculas orgánicas disueltas (Thompson, 1977) que pueden mejorar la osmolaridad del plasma (Burton, 1983). En *Mytilus edulis*, el plasma contiene (en mg/L) 1,150-2,820 proteínas, 98-357 carbohidratos y 204-843 lípidos.

Los aminoácidos libres y sus derivados son los principales reguladores osmóticos en las células (George y Damodaran, 1999). Para los mecanismos que ajustan los solutos nitrogenados en el ventrículo de *M. demissus* (Pierce y Greenberg, 1972) y las células rojas de la sangre de *Noetia ponderosa* (Amende y Pierce, 1980), las sustancias nitrogenadas son liberadas en una solución cuando es diluida *in vitro*. Los principales solutos involucrados son taurina, glicina y alanina en *M. demissus* y taurina en *B. ponderosa*.

En este estudio, se presenta las variaciones del contenido de agua en los tejidos y el volumen de hemolinfa, así como algunas propiedades del plasma de la almeja

mano de león *N. subnodosus*, incluyendo presión osmótica, solutos inorgánicos (cationes) y orgánicos (proteínas, carbohidratos, lípidos y aminoácidos libres) aclimatada a diferentes salinidades en un intervalo de 19-55 ups.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos experimentales

Los organismos experimentales de este estudio fueron los mismos empleados en el experimento anterior. Una vez en el laboratorio, se colocaron en recipientes de plástico de 500 L con agua marina filtrada a 22 °C de temperatura, 37 ups de salinidad y aireación constante. Las almejas se alimentaron con dos raciones diarias de 1.0×10^9 cél/almeja/día de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* en proporción 1:1 Se mantuvieron en el laboratorio durante 15 días.

Contenido de agua en tejidos y volumen de hemolinfa en músculo abductor

Siete grupos de 20 organismos se colocaron en contenedores de plástico de 70L conteniendo 40 L de agua marina a 22 °C y 37 ups, y fueron alimentados con la misma dieta. La salinidad de tres contenedores se incrementó 3 ups cada tercer día y a los otros tres se les bajó la salinidad al mismo tiempo. Un contenedor fue

mantenido a 37 ups y funcionó como un control. El medio hiperosmótico se preparó diluyendo la sal natural del mar obtenida de Guerrero Negro en agua marina filtrada, y el medio hipoosmótico agregando agua destilada al agua de mar filtrada a 1.4 μm .

Tres almejas fueron muestreadas al azar de cada uno de los contenedores cada tercer día antes del cambio de salinidad correspondiente. A cada una se le midió el alto y ancho de la concha con un calibrador Vernier y se eliminó el exceso de agua superficial secándola con papel absorbente. Se pesaron en una balanza digital Precisa modelo XT 320 M con 0.001 g de resolución para obtener el peso húmedo total.

La hemolinfa de cada almeja fue extraída cuidadosamente con una jeringa hipodérmica, perforando directamente el músculo abductor y fue colectada en un recipiente volumétrico de 5 mL para medir el volumen. Esta operación se repitió cuantas veces fue necesario en el mismo individuo, para extraerle toda la hemolinfa posible y estimar el volumen total (Figura 24).

Después de ésto, se pesaron de nuevo para obtener el peso húmedo sin hemolinfa. Se separó el tejido de la concha de cada almeja y se colocó en charolas de papel aluminio previamente etiquetadas; durante 72 h se secó el tejido en una estufa Blue-M Modelo OV-47a-2 a 65°C. y se pesó en una balanza

analítica. El proceso de secado, enfriado y pesado, se repitió varias veces hasta obtener un peso constante de las muestras. El peso húmedo de tejido fue calculado por diferencia del peso húmedo total menos el peso húmedo de la concha de cada almeja.



FIGURA 24. Extracción de hemolinfa en el músculo abductor de la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*).

Presión Osmótica (hemolinfa vs medio externo) y Solutos Inorgánicos en plasma y medio externo

Tres muestras de 200 μL de hemolinfa de cada almeja y del medio externo (agua marina a la salinidad correspondiente) se utilizaron para medir la presión osmótica en un micro-osmómetro (Advanced Instruments Model 3W2).

Un mL de hemolinfa que fue extraída se centrifugó a 3600 RPM durante 10 min a 4 °C en una centrífuga marca Beckman Coulter modelo Allegra 21R. separando los hemocitos del plasma. El plasma obtenido se congeló en tubos Eppendorf a -80°C para su uso posterior.

La concentración de los principales solutos inorgánicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}) en plasma y medio externo se determinó mediante un Espectrofotómetro GBC Atomic Absorption Spectrophotometer Avanta PM. La absorbancia se midió a 589 nm (Na^+), 766.5 nm (K^+), 422.7 nm (Ca^{2+}) y 285.2 nm (Mg^{2+}).

Solutos Orgánicos en plasma

Un experimento similar fue realizado con el mismo lote de almejas para las determinaciones de los solutos orgánicos incluyendo proteínas totales, carbohidratos, lípidos y aminoácidos.

Tres contenedores se mantuvieron a 25 ups y otros tres a la salinidad de 49 ups; estas salinidades extremas se alcanzaron incrementando o disminuyendo la salinidad cada tres días. Un grupo se mantuvo a 37 ups como control. Una vez alcanzadas las salinidades de 25 ups y 49 ups, se estudió el balance de los solutos orgánicos en la hemolinfa de las almejas a salinidades extremas.

Las muestras de hemolinfa fueron centrifugadas para separar el plasma de los hemocitos.

Proteínas

Las proteínas del plasma se analizaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). El fundamento de esta técnica se basa en la reacción de los grupos amino libres con el reactivo de Bradford (colorante azul de Cromassie, ácido fosfórico y metanol, Bio-Rad, No. Cat. 500-0006). El complejo azul formado es directamente proporcional a la concentración de la proteína en la muestra. Las muestras (10 μ L) se colocaron en una microplaca conteniendo 200 μ L de solución reactiva de Bradford y posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de microplaca marca Thermo Labsystems modelo MRX Revelation. Las concentraciones fueron determinadas comparando la absorbancia en una curva

estándar previamente construida a partir de una solución de 2 mg/mL de albúmina bovina.

Carbohidratos

Las determinaciones de carbohidratos se realizaron utilizando el método de Van-Handel (1965). Muestras de 100 μ L de plasma se centrifugaron con 100 μ L TCA al 20% a 3600 RPM durante 10 min a una temperatura de 4°C; cien μ L del sobrenadante se mezcló con 1 mL de solución de antrona (C₁₄ H₁₀ O) al 0.1% en baño maría a 85 °C durante 15 min. El compuesto colorido resultante, equivalente al total de carbohidratos en las muestras, fue leído en el lector de microplaca a 620 nm. Los resultados se compararon contra una curva patrón que se construyó con estándares de Dextrosa (sigma).

Lípidos totales

La determinación de lípidos totales se realizó utilizando el paquete comercial de Merck (método 3321) que emplea el método de Barnes y Blackstock (Barnes y Blackstock, 1973) adaptado para las determinaciones en microplaca.

El método se basa en la reacción de los lípidos con el reactivo fosfovainilla y el ácido sulfúrico para dar un complejo de color rosa. La intensidad de este color es proporcional a la concentración de lípidos en la muestra.

Veinticinco μL de la muestra de plasma se mezcló con 250 μL de H_2SO_4 y posteriormente se agitó y calentó en baño maría a 85 °C por 10 min. La mezcla se enfrió y de ésta se tomaron 20 μL , haciéndola reaccionar con 200 μL de solución reactiva del “kit” de Merck por un periodo de 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente se midió la absorbancia a 540 nm en el mismo lector de microplaca. Para conocer la concentración de lípidos totales se elaboró una curva patrón con el estándar Lipid Lin-trol (sigma).

Aminoácidos

Los aminoácidos en el plasma fueron determinados por HPLC siguiendo el método de Vázquez-Ortiz *et al.* (1992). Muestras de 500 μL de plasma se centrifugaron con ácido perclórico al 6% y el sobrenadante se congeló a -80° C en tubos Eppendorf antes de la determinación de aminoácidos mediante HPLC.

RESULTADOS

Contenido de agua, volumen de la hemolinfa y peso seco de tejido

El peso húmedo y seco de tejido, el contenido de agua y el volumen de la hemolinfa de las almejas mano de león a diferentes salinidades se presentan en la Tabla III. Puede observarse que el contenido de agua en los tejidos fluctuó de acuerdo a la salinidad, aumentando al disminuir la salinidad y disminuyendo en un medio concentrado. La pérdida de peso seco de tejido fue obtenida como resultado de la exposición de los organismos a un medio diluido y a un medio concentrado (Figura 25a). El peso seco de tejido declinó de 1.6 g/ind a 37 ups a valores de 1.44 g/ind y 1.37 g/ind a las salinidades de 19 ups y 55 ups respectivamente, indicando una pérdida de solutos inorgánicos y orgánicos durante la regulación osmótica. Sin embargo, la línea de regresión que se muestra en la Figura 25a indica una tendencia a perder mayor peso seco de tejido a un medio hipersalino que a uno hiposalino. Esto se confirma en la Figura 25b, donde el peso seco de tejido como % de peso húmedo de tejido, se incrementa del 9 % a 19 ups, a 22 % a 55 ups. El volumen de la hemolinfa de los órganos estudiados permaneció constante a las salinidades de 22 ups a 52 ups, sin embargo en salinidades extremas (19 ups y 55 ups) disminuyó, esto debido al estrés que presentaron las almejas a estas salinidades, por lo que solamente se les logró extraer 2 mL /ind y 0.05 mL/ind respectivamente.

TABLA III. Efecto de la salinidad en peso húmedo y peso seco de tejido, contenido de agua en tejido, volumen de hemolinfa, y presión osmótica de la hemolinfa y medio externo de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (6.0 ± 0.3 cm de altura de la concha) a 22 °C.

Salinidad	Peso húmedo de tejido	Peso seco de tejido	Contenido de agua en tejido	Volumen de hemolinfa	Presión Osmótica	
					Medio externo	Plasma
(ups)	(g/ind)	(g/ind)	(g/ind)	(ml/ind)	(mOsm/kg)	(mOsm/kg)
19	14.97 ± 0.07	1.44 ± 0.04	13.53 ± 1.0	2.0 ± 0.2	528 ± 4	537 ± 8
22	14.36 ± 0.06	1.50 ± 0.05	12.86 ± 0.6	3.0 ± 0.3	624 ± 6	637 ± 8
25	13.92 ± 0.05	1.35 ± 0.06	12.57 ± 0.6	3.0 ± 0.1	659 ± 10	682 ± 12
28	13.40 ± 0.06	1.48 ± 0.04	11.92 ± 0.3	2.9 ± 0.1	794 ± 14	814 ± 23
31	12.31 ± 0.05	1.44 ± 0.07	10.88 ± 0.5	2.9 ± 0.2	879 ± 13	858 ± 16
34	11.90 ± 0.03	1.40 ± 0.05	10.5 ± 0.2	3.0 ± 0.2	965 ± 10	946 ± 13
37	11.49 ± 0.05	1.61 ± 0.07	9.88 ± 0.2	3.0 ± 0.0	1050 ± 18	1105 ± 21
40	9.90 ± 0.05	1.50 ± 0.05	8.4 ± 1.0	3.0 ± 0.0	1135 ± 15	1155 ± 9
43	8.56 ± 0.05	1.26 ± 0.05	7.3 ± 0.5	3.0 ± 0.0	1196 ± 6	1236 ± 15
46	8.26 ± 0.08	1.36 ± 0.08	6.9 ± 0.6	3.0 ± 0.0	1305 ± 5	1317 ± 14
49	7.77 ± 0.06	1.37 ± 0.07	6.4 ± 1.1	2.9 ± 0.1	1390 ± 16	1396 ± 9
52	7.09 ± 0.07	1.49 ± 0.03	5.6 ± 0.4	2.9 ± 0.1	1425 ± 8	1400 ± 13
55	6.25 ± 0.08	1.37 ± 0.08	4.88 ± 0.6	0.5 ± 0.1	1520 ± 20	1560 ± 15

Los valores son el promedio ± desviación estándar, $n = 9$

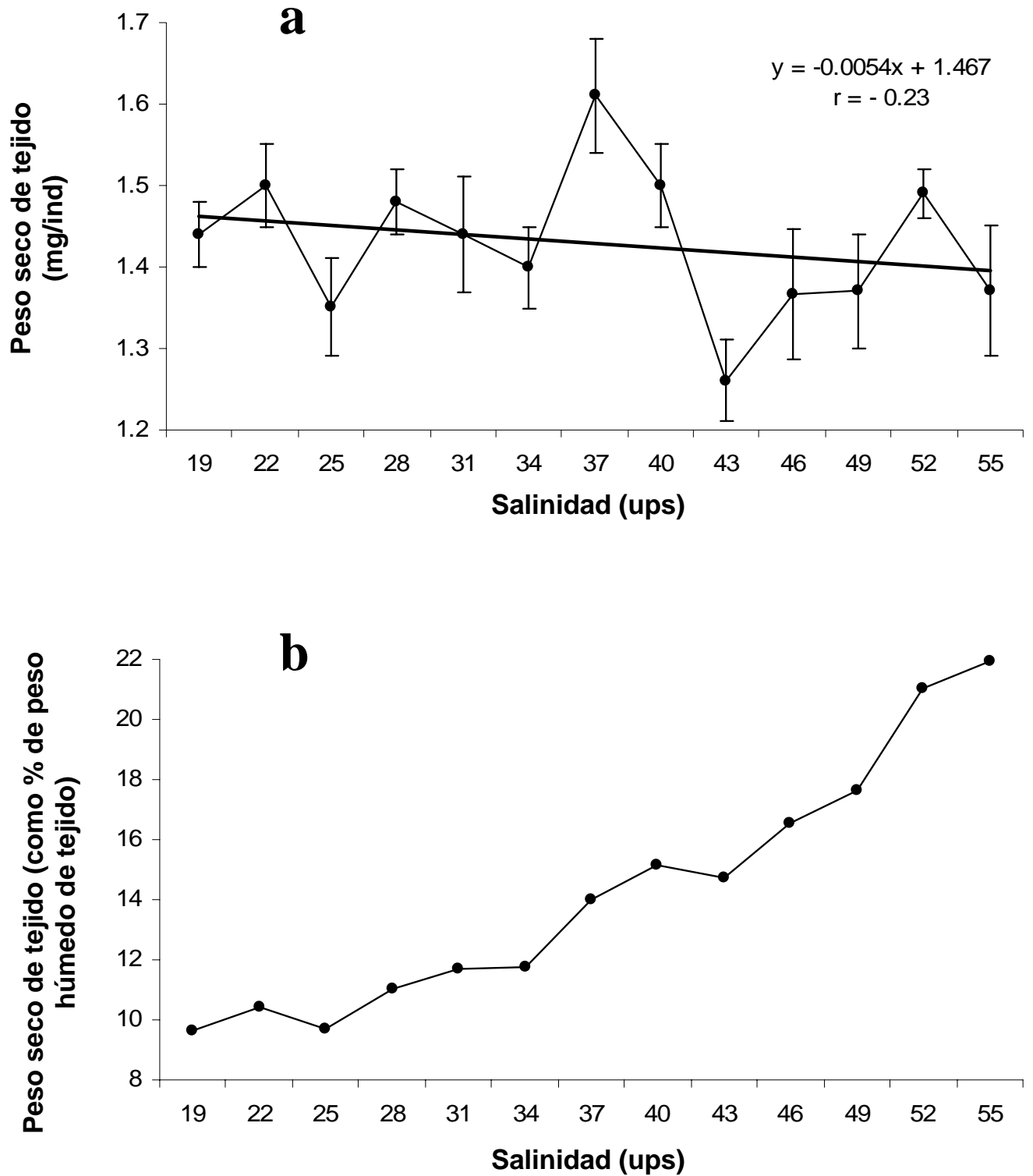


FIGURA 25. Efecto de la salinidad en el peso seco de tejido de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (a) y el peso seco de tejido expresado como porcentaje del peso húmedo de tejido (b). Los valores son la media \pm desviación estándar, $n = 9$.

Presión Osmótica

Las mediciones de la presión osmótica indicaron que el plasma fue aproximadamente 20 mOsm/kg hiperosmótico en relación al medio externo (Tabla III y Figura 26), excepto a 37, 43 y 55, donde la hiperosmolaridad fue mayor que 40 mOsm/kg, y a las salinidades de 31, 34 y 52 ups donde el plasma fue ligeramente hiposmótico que el medio externo. No existe alguna explicación que pueda darse para estas variaciones.

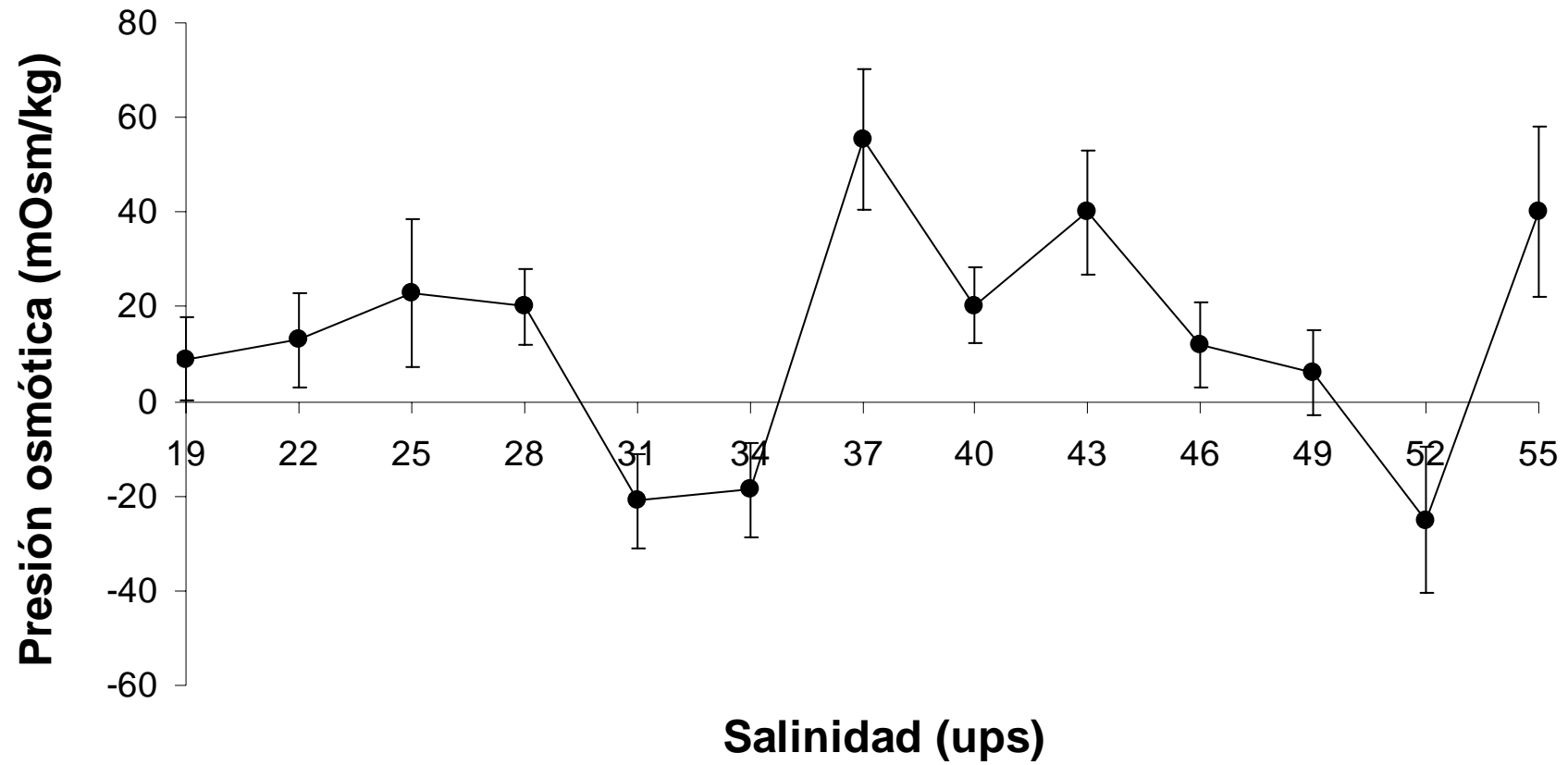


FIGURA 26. Presión Osmótica de la hemolinfa de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* expuesta a un amplio rango de salinidades. Los valores son la media \pm desviación estándar, n= 27.

Solutos Inorgánicos en plasma y medio externo

La concentración de los solutos inorgánicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}) en plasma y medio externo a diferentes salinidades se presentan en la Tabla IV. Se observa un incremento gradual en la concentración de los solutos al incrementar la salinidad. Las concentraciones de Na^+ en plasma y medio externo fueron similares, el K^+ y Mg^{2+} fueron ligeramente más altos en plasma y el Ca^{2+} fue más bajo en plasma y medio externo.

TABLA IV. Concentraciones de los solutos inorgánicos en medio externo y plasma de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (6.0 ± 0.3 cm de altura de la concha) a diferentes salinidades y a 22 °C.

Salinidad (ups)	Na ⁺		K ⁺		Mg ²⁺		Ca ²⁺	
	Medio Externo (mg/l)	Plasma (mg/l)	Medio Externo (mg/l)	Plasma (mg/l)	Medio Externo (mg/l)	Plasma (mg/l)	Medio Externo (mg/l)	Plasma (mg/l)
19	5,819 ± 6	5,815 ± 10	197 ± 5	210 ± 15	652 ± 4	670 ± 7	225 ± 2	220 ± 7
22	6,783 ± 8	6,796 ± 20	233 ± 7	243 ± 8	783 ± 9	791 ± 8	267 ± 4	265 ± 9
25	7,402 ± 13	7,389 ± 15	285 ± 5	293 ± 10	892 ± 5	906 ± 9	300 ± 6	294 ± 16
28	8,626 ± 5	8,700 ± 18	312 ± 8	316 ± 16	968 ± 8	980 ± 7	338 ± 5	335 ± 10
31	9,055 ± 12	9,038 ± 15	331 ± 10	340 ± 12	1,004 ± 3	1,015 ± 6	364 ± 8	358 ± 9
34	10,127 ± 5	10,009 ± 10	387 ± 6	402 ± 11	1,226 ± 2	1,248 ± 9	398 ± 1	393 ± 9
37	11,106 ± 7	11,065 ± 15	410 ± 4	419 ± 9	1,332 ± 15	1,369 ± 8	438 ± 7	425 ± 6
40	11,998 ± 3	12,003 ± 21	445 ± 5	453 ± 8	1,442 ± 11	1,459 ± 7	472 ± 3	465 ± 8
43	12,982 ± 15	12,968 ± 22	482 ± 8	496 ± 18	1,561 ± 4	1,590 ± 7	501 ± 2	498 ± 6
46	13,851 ± 9	13,732 ± 25	511 ± 3	529 ± 9	1,657 ± 3	1,679 ± 5	534 ± 4	527 ± 7
49	14,899 ± 11	14,931 ± 16	539 ± 6	560 ± 15	1,772 ± 9	1,802 ± 9	577 ± 4	564 ± 8
52	15,535 ± 5	15,525 ± 19	572 ± 3	582 ± 7	1,903 ± 6	1,953 ± 10	606 ± 5	600 ± 8
55	16,602 ± 3	16,557 ± 17	631 ± 9	650 ± 8	2,010 ± 6	2,128 ± 15	635 ± 10	629 ± 9

Valores son el promedio ± desviación estándar de 6 determinaciones.

Solutos Orgánicos en plasma

Las concentraciones de proteínas, carbohidratos, lípidos y aminoácidos en plasma se observan en la Tabla V. En todos los tratamientos, las proteínas tuvieron la concentración más alta, seguida de los carbohidratos y lípidos, excepto en condiciones hipersalinas, donde los lípidos tuvieron una mayor concentración que los carbohidratos.

De los 16 aminoácidos medidos, solamente 11 fueron detectados. La Taurina, glicina y arginina fueron los aminoácidos de mayor concentración en plasma. En la Figura 27, las concentraciones de los aminoácidos libres son presentadas como porcentaje respecto a los valores del tratamiento a 37 ups, indicando que esos solutos tienen una función durante la regulación osmótica. Algunos aminoácidos del plasma variaron directamente con la salinidad, incluyendo la glicina, alanina, lisina e histidina, mientras que la serina y la leucina variaron inversamente a la salinidad. La taurina, arginina, isoleucina, tirosina y metionina tuvieron concentraciones más altas que la salinidad mayor o menor que 37 ups. El ácido glutámico, ácido aspártico, fenilalanina, prolina e hidroxiprolina fueron aminoácidos que no se lograron detectar.

TABLA V. Concentración de los solutos orgánicos en el plasma de las almejas mano de león *Nodipecten subnodosus* expuestas a tres salinidades y a una temperatura de 22 °C.

Solutos	Salinidad (ups)					
	25		37		49	
Proteínas	739.7	± 29.9	981.2	± 6.7	1,115.2	± 42.9
Carbohidratos	121.8	± 16.4	153.0	± 5.7	182.6	± 5.9
Lípidos	18.2	± 1.6	52.3	± 4.9	381.1	± 12.3
Taurina	84.7	± 63.9	79.9	± 69.5	92.7	± 59.9
Glicina	83.9	± 69.3	149.2	± 95.9	199.8	± 131.9
Arginina	26.4	± 24.7	15.5	± 13.8	24.7	± 10.9
Isoleucina	12.2	± 18.3	0.0	± 0.0	13.7	± 13.0
Alanina	7.9	± 2.2	9.0	± 3.4	16.8	± 4.5
Lisina	6.8	± 3.4	6.8	± 2.7	8.2	± 2.7
Serina	6.7	± 1.9	4.8	± 1.0	1.9	± 1.9
Tirosina	2.2	± 4.4	0.0	± 0.0	0.0	± 0.0
Leucina	2.3	± 3.0	1.5	± 3.0	1.5	± 3.0
Histidina	1.3	± 0.6	1.9	± 0.6	4.5	± 1.3
Metionina	0.7	± 1.3	0.0	± 0.0	1.3	± 2.0

Proteínas, carbohidratos y lípidos en mg/L; aminoácidos en nM/L;

Los valores son la media ± desviación estándar, $n = 9$

DISCUSIÓN

Como se ha demostrado en otros moluscos, el contenido de agua en los tejidos de las almejas mano de león *N. subnodosus* incrementó al disminuir la salinidad y declinó a salinidades más concentradas. El intercambio de agua puede ocurrir a través de microtúbulos de excreción, directamente por difusión a través del integumento o vía tracto digestivo (Robertson, 1964). Sin embargo, alguna regulación del agua pudo ocurrir porque los valores de los límites teóricos no se alcanzaron. La ganancia de agua en *N. subnodosus* a 19 ups (18 ups más bajo que 37 ups) fue 3.48 mg/ind. La pérdida de agua a 55 ups (18 ups más alto que 37 ups) fue 5.24 mg/ind. Estos valores fueron comparados con los resultados de 37 ups (11.49 a 14.97 mg/ind). Una explicación para la imperfecta semi-permeabilidad es que los tejidos (branquias e integumento) no son semipermeables al agua. En realidad, el peso original de un organismo sometido a un estrés salino no se recupera después de transferirse al agua de mar normal (Burton, 1983). Se puede confirmar que una significativa pérdida ($P < 0.05$) en el peso seco de tejido ocurrió de una exposición a un medio diluido a un medio concentrado (Figura 25). Las pérdidas de peso parecen ser mayores a las salinidades más altas debido al movimiento de las sales hacia el exterior (Burton, 1983) y a los aminoácidos (Bayne, 1976).

El volumen de la hemolinfa en bivalvos, es alrededor de la mitad del peso corporal (v/W), excluyendo la concha (Martin *et al.*, 1958; Taylor y Ragg, 2005).

En este trabajo se determinó que el volumen de la hemolinfa del músculo abductor fue del 26% del peso húmedo de tejido a 37 ups, lo cual significa que casi la mitad del volumen de hemolinfa de la almeja fue extraída con la jeringa. En los moluscos, no se conoce si el volumen de la hemolinfa cambia cuando es expuesta a diferentes salinidades. En *N. subnodosus*, el volumen de la hemolinfa permaneció constante excepto en las salinidades extremas. El valor fluctuó alrededor de 3 mL por almeja representando el 20.9% y 40% del peso húmedo de tejido a 22 y 52 ups, respectivamente. Las pequeñas variaciones en el volumen de la hemolinfa contradice la escasa información disponible en este tema. En la literatura, se deduce que el volumen de la hemolinfa y el agua del cuerpo varía proporcionalmente al contenido de sus respectivos solutos (Burton, 1983).

Nuestras observaciones están basadas en la suposición de que el volumen de la hemolinfa muscular es proporcional al volumen total de la hemolinfa, el cual aún necesita ser corroborado con la técnica de inulina C¹⁴. Los resultados a salinidades extremas (19 ups y 55 ups), mostraron una importante caída en el volumen de la hemolinfa (2 y 0.5 mL), respectivamente como consecuencia de las hemorragias causadas por el rompimiento de los vasos sanguíneos durante el estrés osmótico.

Bayne (1976) menciona que, en consideración a las adaptaciones fisiológicas de las variaciones de salinidad, necesitan ser reconocidos, tres diferentes grados de control de la composición de los fluidos corporales: el control

extracelular anisomótico (regulación de la presión osmótica de los fluidos extracelulares), control de las concentraciones de varios iones y otros solutos, y regulación isomótica intracelular (el control de la presión osmótica intracelular). Estos tres están interrelacionados y son componentes de un cuarto proceso: el volumen celular.

Consideremos los dos primeros aspectos; la hemolinfa de *N. subnodosus* fue 20 mOsm/kg más alto que el medio externo. El mismo valor fue encontrado por Pierce (1970) en *Mytilus demissus* entre el agua marina y la hemolinfa. Beninger y Le Pennec (1991) encontraron que una ligera hiperosmolaridad puede ser necesaria para mantener el flujo urinario y la secreción de mucosidad. Estas diferencias no pueden ser muy grandes ya que el coste metabólico para mantener un significativo gradiente osmótico en plasma- agua marina debería ser prohibitiva en bivalvos, los cuales tienen grandes áreas de superficies expuestas al medio externo (Burton, 1983). Cerca del 1.2% de la energía equivalente a la tasa metabólica total en *Anodonta* fue necesaria para mantener una diferencia de 36 mOsm/L entre la hemolinfa y el agua (Potts, 1954). Esto puede tener también alguna contribución a la pérdida de peso seco de tejido mencionado anteriormente.

En relación al control de varios iones, Robertson (1964) señaló que en una salinidad normal, la mayoría de los moluscos tienen una hemolinfa que difiere del agua de mar en proporción de K^+ y Ca^{2+} . En gasterópodos y bivalvos (*Mytilus edulis*) la regulación consiste principalmente en elevar los valores de

K^+ y Ca^{2+} , mientras que Na^+ y Mg^{2+} permanecen en equilibrio con el medio externo (Robertson, 1964; Bayne, 1976). En este trabajo se encontró que *N. subnodosus* aumentó sus valores de K^+ , pero disminuyó sus concentraciones de Ca^{2+} , Na^+ y Mg^{2+} permanecieron en equilibrio. Una proporción similar fue reportada en el pulpo *Sepia officinalis* (Robertson, 1964). Ninguna explicación fue presentada para esta diferencia.

Considerando el efecto de la salinidad en la regulación de los solutos inorgánicos, se observó que la tendencia de la concentración de los cationes en *N. subnodosus* continuó muy estrecho que el medio externo, como se encuentra en Shumway (1977) en experimentos de *Chlamys opercularis* expuesta a un régimen de periodos cortos a salinidades fluctuantes.

Generalmente es aceptado que los solutos orgánicos juegan un papel importante en el balance de la hemolinfa (Bayne, 1976; Somero y Bowlus, 1983; George y Damodaran, 1999). Sin embargo, el plasma contiene numerosas moléculas orgánicas disueltas que podrían aumentar la osmolaridad (Burton, 1983). En plasma, se encontró una concentración de 981 mg/L, 153 mg/L y 52 mg/L de proteínas, carbohidratos y lípidos respectivamente. Los valores del presente estudio, son ligeramente más bajos que los obtenidos por Bayne (1973) en *Mytilus edulis* (en mg/L): 1,150-2,820, 98-357, y 204-843 para proteínas, carbohidratos y lípidos a una salinidad normal. Las concentraciones de estas moléculas variaron con la salinidad, excepto en lípidos, los cuales en condiciones hipersalinas (49 ups),

incrementaron siete veces la concentración a 37 ups. Esto indica que existe una función de los lípidos durante el estrés hiperosmótico.

Para el ajuste de los solutos nitrogenados (aminoácidos libres) en el ventrículo de *M. demissus* (Pierce y Greenberg, 1972) y las células rojas sanguíneas de *Noetia ponderosa* (Amende y Pierce, 1980), las sustancias nitrogenadas son liberadas en la solución circundante cuando este es diluido *in vitro*. Los principales solutos involucrados en *M. demissus* son glicina, taurina y alanina; y taurina en *B. ponderosa*. Más del 50% de los aminoácidos libres presentes en la hemolinfa de *Tridacna maxima* fueron taurina y glicina.

En el plasma de *N. subnodosus*, se encontró que la glicina, taurina, arginina y alanina representan el 94% de los aminoácidos. La alta concentración de estos aminoácidos se relaciona con la capacidad para resistir grandes variaciones de salinidad. En el bivalvo eurihalino *Sunetta scripta*, seis aminoácidos (taurina, glicina, prolina, alanina, glutamato y aspartato) fueron encontrados asociados a un gran rango de variaciones en sus concentraciones y, por lo tanto, la eurihalinidad de este bivalvo dependió de estos osmo-protectantes (George y Damodran, 1999). En este estudio, se observó que la mayoría de los aminoácidos incrementaron sus concentraciones en proporción a la salida de la salinidad normal (Figura 27). Solamente la glicina, alanina, lisina e histidina disminuyeron en respuesta a un medio hipersalino. No hay alguna explicación que pueda darse para estas variaciones, pero se considera que tienen un rol importante en el ajuste de la osmolaridad sobre los cambios de salinidad.

Se concluye que *N. subnodosus* es un molusco eurihalino osmoconformador con una excelente capacidad a resistir cambios de salinidad en el rango de 22-52. Esta capacidad es debido a la regulación de solutos inorgánicos y orgánicos, el cual se comporta como ocurre en otros bivalvos.

DISCUSIÓN GENERAL

La halotolerancia de la almeja mano de león se encuentra entre 22 y 52 ups, siendo diferente a la de otro pectínido nativo de México: la almeja catarina *Argopecten ventricosus*, cuya halotolerancia está entre 27 y 47 ups (Singnoret-Brailovsky *et al.*, 1993).

La hemolinfa de los moluscos marinos constituyen cerca del 30-80% de los tejidos (Burton, 1983). El volumen de hemolinfa en la almeja mano de león permaneció estable a salinidades bajas y altas mientras que a las salinidades extremas (19 y 55 ups) se observó una disminución, debido a que son las salinidades en donde se presenta una mortalidad.

En este estudio, el incremento de humedad en los tejidos en las almejas sometidas a salinidades bajas, donde el agua de mar está diluida, se debió a la entrada osmótica del agua que ocurre en su cuerpo. Esto fue diferente a los organismos en salinidades altas, donde el contenido de humedad fue menor, esto es, los tejidos se deshidrataron debido a que el agua de mar se encontraba más concentrada. El flujo de agua en los tejidos de los moluscos durante la osmoconformación, produce fluctuaciones en el volumen corporal como un mecanismo para sobrevivir; estas fluctuaciones reflejan la interrupción de un balance estable de entrada y salida del cuerpo (Kinne, 1967). Por otra parte, la regulación del volumen en las células depende de la permeabilidad de

la membrana celular, la cual está influenciada por la concentración osmótica del plasma.

La mayoría de los invertebrados marinos mantienen sus fluidos corporales con la misma presión osmótica que el agua de mar, son osmoconformadores isosmóticos con el medio en el cual ellos viven y esto se reflejó en este trabajo; en donde la osmolaridad de la hemolinfa de la almeja mano de león fluctúa simultáneamente en relación a los cambios externos de salinidad. Estos organismos evitan tener mecanismos y gastar energía para compensar la pérdida de agua, aunque puede haber regulación iónica individual dependiendo de la especie. Ser osmoconformadores, no significa que sus fluidos corporales tengan la misma composición de solutos que el agua de mar, al contrario, mantienen la concentración de sal que está en desequilibrio, con el ambiente, requiriendo para esto una regulación extensiva.

Los principales solutos inorgánicos del agua de mar son el sodio, el cloro, el magnesio, sulfatos y calcio presentes en diferentes concentraciones. Existe un incremento de estos solutos conforme la salinidad y de la misma forma se presentan en los solutos orgánicos. El contenido total de proteínas y carbohidratos en el plasma al parecer, no reflejó una participación importante en la osmoconformación en esta especie y esto coincide con otras investigaciones (Hernández, 1992); el papel del incremento en los lípidos totales no está bien definido en estudios de osmoregulación, sin embargo se ha encontrado que en levaduras osmotolerantes los fosfolípidos aumentan al

incrementarse la salinidad, disminuyendo de esta manera la fluidez de la membrana al ser expuesta al cloruro de sodio (Hernández, 1992).

La mayoría de los aminoácidos en este estudio, incrementaron sus concentraciones. Solamente la glicina, alanina, lisina e histidina disminuyeron en respuesta a un medio hipersalino. No hay alguna explicación que pueda darse para estas variaciones, pero se considera que tienen un rol importante en el ajuste de la osmolaridad sobre los cambios de salinidad.

El uso de métodos y sistemas adecuados empleados en este trabajo para estimar las tasas fisiológicas implicadas en la ecuación de Balance energético, son factores determinantes para la obtención de resultados precisos que reflejen las respuestas de los organismos hacia las variables a estudiar. El sistema de cámaras utilizadas en este trabajo fue adecuado y de fácil manejo.

En el cálculo de la energía potencial de crecimiento de la almeja mano de león se observó que la tasa respiratoria representa la pérdida de energía para los organismos y por lo tanto contribuye en gran medida en el balance energético final.

Los resultados obtenidos concuerdan con el crecimiento observado en los organismos a las salinidades de 30, 37 y 43 ups; los organismos presentan un mayor potencial de crecimiento a la salinidad de 37 ups. Sin embargo, a las salinidades 30 y 43 ups también existe un incremento de energía potencial, lo

cual significa que los organismos expuestos a sitios hiposalinos (30 ups) e hipersalinos (43 ups) también tendrán energía disponible para el crecimiento, reproducción, etc. y serán sitios adecuados para cultivar a esta especie de pectínido.

CONCLUSIONES

- ❖ *Nodipecten subnodosus* es una especie que tolera un amplio intervalo de salinidades con gran potencial para ser cultivada en zonas hipersalinas como las lagunas someras de Baja California, Guerrero Negro y Laguna Ojo de Liebre y también en zonas normosalinas.
- ❖ *N. subnodosus* es un molusco osmoconformador con elevada capacidad a resistir cambios de salinidad en un intervalo de 22-52 ups. Esta capacidad es debido a la regulación de solutos inorgánicos y orgánicos.
- ❖ El rango de salinidades donde podría cultivarse esta especie está entre 30 y 43 ups donde el potencial de crecimiento, y la eficiencia neta de crecimiento fueron positivos.
- ❖ El contenido de agua en los tejidos de las almejas mano de león (*N. subnodosus*) fluctuó de acuerdo a la salinidad, incrementándose al disminuir la salinidad (agua de mar diluida) por la entrada osmótica del agua que ocurre en el cuerpo y disminuyéndose en un medio concentrado.
- ❖ En condiciones hipersalinas ocurre una elevación de los lípidos en el plasma lo que les confiere una función en el proceso de osmoconformación.

LITERATURA CITADA

- Ahn, I. Y., Surh, J., Park, Y. G., Kwon, H., Choi, K. S., Kang, S. H., Choi, H. J., Kim, K. W., Chung, H. 2003. Growth and seasonal energetics of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* from King George Island, Antarctica. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 257:99-110.
- Amende, L.M., Pierce, S.K. 1980. Cellular volume regulation in salinity stressed molluscs: the response of *Noetia ponderosa* (Arcidae) red blood cells to osmotic variation. *J. Comp. Physiol.* 138: 283-289.
- Armsworthy, S. L., Cranford, P. J., Lee, K. 1999. Effects of a new bitumen fuel source on the growth and energetics of sea scallops. *J. Shellfish Res.* 18(1): 312
- Avens, A. C. , Sleight, M. A. 1965. Osmotic balance in gastropod molluscs – I Some marine and littoral gastropods. *Comp. Biochem. Physiol.* 16: 121-141.
- Axiak, V., George, J. J. 1987a. Bioenergetic responses of the marine bivalve *Venus verrucosa* on long-term exposure to petroleum hydrocarbons. *Marine Environmental Research.* London. 23(1):33-47.
- Axiak, V., George, J. J. 1987b. Effects of exposure to petroleum hydrocarbons on the gill functions and ciliary activities of a marine bivalve. *Marine Biology.* Berlin, Heidelberg. 94(2):241-249.
- Bacher, C., Grant, J., Hawkins, A. J. S., Jianguang Fang, Mingyuan Zhu, Besnard M. 2003. Modeling the effect of food depletion on scallop growth

- in Sungo Bay (China). *Aquat. Living Resour./Ressour. Vivantes Aquat.* 16(1):10-24.
- Bacon, G. S., MacDonald, B. A. 1991. Food quality, feeding activity and energy balance in the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *J. Shellfish Res.* 10(1):271.
- Barber, B. J., Blake, N. J. 1985. Substrate catabolism related to reproduction in the bay scallops *Argopecten irradians concentricus* as determined by O/N and RQ physiological indexes. *Mar. Biol.* 87:13-18.
- Barber, B. J., Blake, N. J. 1986. Growth and reproduction of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck) at its southern distributional limit. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 66:247-256.
- Barille, L., Haure, J., Pales-Espinosa, E., Morançais, M. 2003. Finding new diatoms for intensive rearing of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Energy budget as a selective tool. *Aquaculture.* 217(1-4):501-514.
- Barnes, H.J., Blackstock, J., 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphanillin method for 'total' lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12, 103-118.
- Bayne, B.L. 1973. Physiological changes in *Mytilus edulis* L. induced by temperature and nutrition stress. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 53: 39–58.
- Bayne, B. L. 1975. Aspects of physiological condition in *Mytilus edulis* L., with special reference to the effects of oxygen tension and salinity. *En: Proceedings, 9th european marine biology symposium, H. Barnes, (ed), Aberdeen University Press, pp 213-238.*

- Bayne, B.L. 1976. Marine mussels: their ecology and physiology. Cambridge University Press, London.
- Bayne, B. L., Moore, M. N., Widdows, J., Livingstone, D. R., Salkeld, P. 1979. Measurement of the responses of individuals to environmental stress and pollution: studies with bivalve molluscs. Presented at: The assessment of sublethal effects of pollutants in the sea; London, UK.
- Bayne, B. L., Newell, R. C. 1983. Physiological energetics of marine molluscs. *En: Wilbur K.M., Saleuddin A.S. (eds) The Mollusca. Vol. 4 Academic Press, New York.*
- Bedford, J. J. 1971. Osmoregulation in *Melanopsis trifasciata*-IV. The possible control of intracellular isosmotic regulation. *Comp. Biochem. Physiol.* 40A: 1015-1027.
- Beninger, P.G., Le Pennec, M. 1991. Functional anatomy of scallops. *En: Shumway S.E. (ed.), Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, 21. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 133–223.*
- Bernard, F. R. 1983. Physiology and the mariculture of some northeastern pacific bivalve molluscs. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 63 : 1-24.
- Blanchard, M. 1991. Etude bioenergetique de six mollusques bivalves en baie de Saint-Brieuc. IFREMER, Cent. de Brest, Environ.-Littoral, B.P. 70, 29280 Plouzane, France.
- Blanchard, M., Gros, P. 1993. Estimation of matter fluxes generated by filter-feeding bivalves in the intertidal area of the Bay of Saint-Brieuc (Western Channel). *Oceanol. acta.* Paris, 16 (5-6): 695-704.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-drye binding. *Analytical Biochem.* 72, 248-254.
- Bricelj, V. M., Shumway, S. 1991. Physiology: Energy Acquisition and Utilization. *En: Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*, Shumway S (ed). Elsevier: New York, pp. 305-337.
- Bricelj, V. M., Kraeuter, J. N., Powell, E. N., Klinck, J. M., Hofmann, E. E., Grizzle, R., Buckner, S. 2003. A simulation model of the population growth of hard clams (*Mercenaria mercenaria*). III. Effects of brown tide. *J. Shellfish Res.* 22(1):320-321.
- Burton, R.F. 1983. Ionic regulation and water balance. *En: Saleudin A.S.M., Wilbur K.M. (eds.), The Mollusca. Physiology, Part 2.* Academic Press, New York, USA, pp. 291–247.
- Carrillo, O, Vega-Villasante, F., Nolasco, H., Gallardo, N. 2000. Aditivos alimentarios como estimuladores del crecimiento de camarón. *En: Cruz-Suárez L. E, Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Olvera-Novoa M. A, Civera-Cerecedo R., (eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19 – 22 Noviembre, 2000. Mérida, Yuc, México.*
- Christophersen, G., Strand, O. 2003. Effect of reduced salinity on the great scallop (*Pecten maximus*) spat at two rearing temperatures. *Aquaculture.* 215 (1-4):79-92.
- Conover, R. J. 1966. Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnology and Oceanography.* 11:338-345.

- Cranford, P. J, Gordon, D. C Jr, Lee, K., Armsworthy, S. L., Tremblay, G. H. 1999. Chronic toxicity and physical disturbance effects of water- and oil-based drilling fluids and some major constituents on adult sea scallops (*Placopecten magellanicus*). *Mar. Environ. Res.* 48(3):225-256.
- Da Ros, L., Marin, M. G, Nesto, N., Ford, S. E. 1998. Preliminary Results of a Field Study on Some Stress-related Parameters in *Tapes philippinarum* Naturally Infected by the Protozoan *Perkinsus* sp. *Mar. Environ. Res.* 46(1-5):249-252.
- Davenport, J. 1979. Is *Mytilus edulis* a short term osmoregulator?. *Comp. Biochem. Physiol.* 64A: 91-95.
- Davies, P. S.1966. Physiological ecology of Patella I. The effect of body size and temperature on metabolic rate. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 46:647-658.
- Deane, E.M., O'Brien, R.W. 1980. Composition of the haemolymph of *Tridacna maxima* (Mollusca:Bivalvia). *Comp. Biochem. Physiol.* 66A(2): 339-341.
- Elliott, J.M., Davison, W. 1975. Energy equivalents of oxygen consumption in animal energetics. *Oecología* 19: 195-201.
- Epp, J., Bricelj, V. M., Malouf, R. E.1988. Seasonal partitioning and utilization of energy reserves in two age classes of the bay scallop *Argopecten irradians irradians* (Lamarck) *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*121(2):113-136.
- Farías, A., Uriarte, I., Varas, P. 1997. Estudio de los requerimientos nutricionales del ostión del norte *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) durante el acondicionamiento reproductivo. *Rev. Biol. Mar. Ocean.* 32(2):127-136.

- Farías, A., Uriarte, I. 2001. Effect of microalgae protein on the gonad development and physiological parameters for the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *J. Shellfish Res.* 20(1): 97-105.
- Finney, D. 1971. Probit analysis. 3a. ed., Cambridge U.K.: Cambridge University Press. pp 333.
- Frenette, B. 2004. Environmental factors influencing the growth and survival of juvenile sea scallops *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791). MSc thesis, Memorial University of Newfoundland, St. John's, NF, Canada, pp. 142.
- Frenette, B., Parsons, G. J. 2000. Salinity-temperature tolerance of juvenile giant scallops, *Placopecten magellanicus*. Proceedings of the 17th Annual Meeting of the Aquaculture Association of Canada , Moncton, New Brunswick, Canada, 28-31 May, 2000. Special Publication of the Aquaculture Association of Canada. 4: 76-78.
- Frenette, B., Parsons, G. J., Davidson, L. A. 2001. Influence of salinity and temperature on clearance rate and oxygen consumption of juvenile sea scallops *Placopecten magellanicus* (Gmelin). Proceedings of the contributed papers of the 18th Annual Meeting of the Aquaculture Association of Canada , Halifax, Nova Scotia, Canada, 6-9 May, 2001. Special Publication of the Aquaculture Association of Canada. 5: 17-19.
- Fry, F. 1947. Effects of the environment on animal activity. University of Toronto Studies Biological Series, No. 55. Ontario Fisheries Research Laboratory. 68: 1-62.
- García-Pámanes, L. 1994. Desarrollo de tecnología para el cultivo integral de la almeja mano de león (*Lyropecten subnodosus*). Instituto de Investigaciones Oceanológicas de Ensenada, B. C. México.

- George, P.J., Damodaran, R. 1999. The intracellular fluid isosmotic regulation in yellow clam *Sunetta scripta* L. (Mollusca: Bivalvia) acclimated to different salinities. *Indian J. Mar. Sci.* 28: 83–86.
- Gilles, R. 1972. Osmoregulation in three molluscs: *Acanthochitona discrepans* (Brown), *Glycymeris glycymeris* (L.) and *Mytilus edulis* (L.). *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole.* 142: 25-35.
- Gilles, R. 1974. Métabolisme de acides aminés et contrôle du volume cellulaire. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 82:423-489.
- Gilles, R. 1975. Mechanisms of ionic and osmoregulation. *En: Kinne, O. (ed.). Marine Ecology. Vol II, Part 1. Wiley Interscience, New York, USA. pp. 259-347.*
- González-Estrada, F. 2001. Temperaturas letales y temperatura óptima para crecimiento en una población de almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835). Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México, pp. 90.
- Grant, J., Cranford, P. J. 1991. Carbon and nitrogen scope for growth as a function of diet in the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom.* Plymouth. 71(2):437-450.
- Guerreiro, J. A. 1995. Energy budget of *Scrobicularia plana* (Da Costa, 1778) in the Mira Estuary (Portugal). *Portugaliae zoologica.* Lisbon. 3(3):15-27.
- Harvey, M., Vincent, B. 1990. Density, size distribution, energy allocation and seasonal variations in shell and soft tissue growth at two tidal levels of a

Macoma balthica (L.) population. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 142(3):151-168.

Hawkins, A. J. S., Bayne, B. L. 1985. Seasonal variation in the relative utilization of carbon and nitrogen by the mussel *Mytilus edulis*: Budgets, conversion efficiencies and maintenance requirements. *Marine ecology progress series*. 25(2):181-188.

He, Y., Zhang, F., Wang, P., Li, B. 1999. Salinity tolerance of southern bay scallop *Argopecten irradians concentricus*. *Haiyang Xuebao* (Zhongwenban). 21(4): 87-91.

Hernández, N. Y. 1992. Efecto de la salinidad en la composición y concentración de osmoreguladores en levaduras tolerantes. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, B.C.S. pp. 106.

Hernández-López L, Vargas-Albores F. 2003. A microplate technique to quantify nutrients (NO_2^- , NO_3^- , NH_4^- and PO_4^{3-}) in seawater. *Aquaculture Research* 34: 1201-1204.

Hibbert, C. J. 1977. Energy relations of the bivalve *Mercenaria mercenaria* on an intertidal mudflat. *Mar. Biol.* 44(1):77-84.

Hoyaux, J., Gilles, R., Jeuniaux, C. 1976. Osmoregulation in molluscs of the intertidal zone. *Comp. Biochem. Physiol.* 53A: 361-365.

Hummel, H. 1999. Limits to adaptations in marine organisms: the model *Macoma balthica*. Recent progress in marine chemistry and ecotoxicology. Symposium of the Oceanographic Institute. Recents progres en chimie et ecotoxicologie marines. Seminaire de l'Institut oceanographique. 25(4):563-579

- Hutchinson, S., Hawkins, L.E. 1992. Quantification of the physiological responses of the European flat Oyster *Ostrea edulis* L. to temperature and Salinity. *J. Moll. Stud.*58:215-226.
- Ivelev, V. S. 1939. Transformation of energy by aquatic animals. *Int. Rev. ges. Hydrobiol. Hydrogr.* 38: 449-458.
- Ivelev, V. S. 1945. The biological productivity of waters. *Ups sovrem Biol.*19:98-120.
- Keen, A. M. 1971. Sea shells of tropical West America. Stanford University Press. Stanford, California. 1064 pp.
- Keen, A. M., Conan. 1974. Marine mollusca genera of western north America, an illustrated key. Stanford University Press. pp. 208.
- Kinne, O. 1967. Physiology of estuarine organisms with special reference to salinity and temperature: general aspects. *En: G. H. Lauff (ed.). Estuaries. American Association for the Advances of Science, Washington, DC. pp. 525-540.*
- Kinne, O. 1971. Salinity animal invertebrates. En Kinne (Ed.), Marine Biology, Vol. 1. Wiley-Interscience, London, 821-995.
- Kleiman, S., Hatcher, B. G, Scheibling, R. E. 1996. Growth and content of energy reserves in juvenile sea scallops, *Placopecten magellanicus*, as a function of swimming frequency and water temperature in the laboratory. *Marine biology. Berlin, Heidelberg.* 124(4):629-635.

- Ledwell, W. 1995. Salinity tolerance in the giant scallop *Placopecten magellanicus* at two temperatures. Independent Research Project for Advanced Diploma in Aquaculture, Marine Institute of Memorial University of Newfoundland, St. John's, NF, Canada, pp 50.
- Livingstone, D. R., Widdows, J., Fieth, P. 1979. Aspects of Nitrogen metabolism of the common mussel *Mytilus edulis*: adaptation to abrupt and fluctuating changes in salinity. *Mar. Biol.* 53:41-55.
- Lora-Vilchis C., Doktor N. 2001. Evaluation of Seven Algal Diets for Spat of the Pacific Scallop *Argopecten ventricosus*. *J. of World Aquaculture Society.* 32(2): 228-235.
- Mac Donald, B. A., Thompson, R. J. 1986. Influence of temperature and food availability on the ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus* . 3. Physiological ecology, the gametogenic cycle and scope for growth. *Marine biology.* Berlin, Heidelberg. 93(1):37-48.
- Mac Donald, B. A., Bacon, G. S, Ward, J. E. 1998. Physiological responses of infaunal (*Mya arenaria*) and epifaunal (*Placopecten magellanicus*) bivalves to variations in the concentration and quality of suspended particles. 2. Absorption efficiency and scope for growth. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 219(1-2):127-141.
- Maeda-Martínez, A. N., Sicard, M. T., Reynoso-Granados, T. 2000. A shipment method for scallop seed. *Journal of Shellfish Research.* 19: 765-770.
- Maeda-Martínez, A. N., Lombeida, P., Freitas, L., Lodeiros, C., Sicard, M. T. 2001. Cultivo de Pectínidos en fondo y en estaque. *En: Maeda-Martínez, A. N. (ed.). Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura.* México. 11: 213-231.

- Mao, Y., Zhou, Y., Yang, H., Wang, R. 2006. Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. *Aquaculture* 253(1-4):322-333.
- Martin, A.W., Harrison, F.M., Huston, M.J., Stewart, D.M. 1958. The blood volumes of some representative mollusks. *J. Exp. Biol.* 35: 260-279.
- Martínez, G., Cáceres, L. A., Uribe, E., Díaz, M. A. 1995. Effects of different feeding regimens on larval growth and the energy budget of juvenile Chilean scallops, *Argopecten purpuratus* Lamarck. *Aquaculture*. 132(3-4):313-323.
- Mason, K. M., Shumway, S. E., Allen, S. K, Hidu, H. Jr. 1988a. Induced triploidy in the soft-shelled clam *Mya arenaria* : Energetic implications. *Marine biology*. Berlin, Heidelberg. 98(4):519-528.
- Mason, K. M., Shumway, S. E., Hidu, H., Standish, A. 1988b. Energetic implications of induced triploidy in *Mya arenaria* : The consequences of age and sexual maturity. *Journal of Shellfish Research*. 7(1):169.
- Massó-Rojas, J. A., Morales-Bojórquez, E., Talavera-Mayer, J., Fajardo-León, M., Hernández-Valenzuela, R. 2000. La Pesquería de Almeja Mano de León, Baja California. *En: Instituto Nacional de Pesca, SAGARPA, México (ed.), pp. 349-366.*
- Matozzo, V., Depieri, M., Moschino, V., Marin, M. G. 2003. Evaluation of 4-nonylphenol toxicity in the clam *Tapes philippinarum*. *Environ. Res.* 91(3):179-185.
- Mayzaud, P. 1973. Respiration and nitrogen excretion of zooplankton: II. Studies of the metabolic characteristics of starved animals. *Mar. Biol.* 21: 19-28.

- McAlister, R.O., Fisher, F.M. 1968. Response of the limpet, *Siphonaria pectinata* Linnaeus (Gastropoda, Pulmonata) to osmotic stress. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*. 134: 96-117.
- Mercaldo, R. S., Rhodes, E. W. 1982. Influence of reduced salinity on the Atlantic bay scallop *Argopecten irradians* at various temperatures. *Journal of Shellfish Research*. 2 (2): 177-181.
- Momo, F., Kowalke, J., Schloss, I., Mercuri, G., Ferreyra, G. 2002. The role of *Laternula elliptica* in the energy budget of Potter Cove (King George Island, Antarctica). *Ecological Modelling [Ecol. Model.]*.155(1):43-51.
- Mottet, M. G. 1979. A review of the fishery biology and culture of scallops. State of Washington Department of Fisheries. Technical Report. N 39, pp. 99.
- Navarro, E., Iglesias, J. I. P. 1995. Energetics of reproduction related to environmental variability in bivalve molluscs. *Haliotis*. Paris. 24:43-55.
- Navarro, E., Urrutia, M. B., Iglesias, J. I. P., Ibarrola, I. 1998. Tidal variations in feeding, absorption and scope for growth of cockles (*Cerastoderma edule*) in the Bay of Marennes-Oleron (France). *Vie Milieu*. 48(4):331-340.
- Navarro, J. M., González, C. M., 1998. Physiological responses of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* to decreasing salinities. *Aquaculture*. 167: 315-327.
- Navarro, J. M., Leiva, G. E., Martínez, G., Aguilera, C. 2000. Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 147(1):67-83.

- Navarro, J. M., Winter, J. 1982. Ingestion rate, assimilation efficiency and energy balance in *Mytilus chilensis*, in relation to body size and different algal concentrations. *Marine Biology*. 67: 255-266.
- Navarro, J. M. 2001. Fisiología energética de pectínidos iberoamericanos. *En: Maeda-Martínez A. N. (eds). Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y acuicultura. Limusa. México. Cap. 3: 61-76.*
- Newell, R. C. 1979. Biology of intertidal animals. Marine Survey Ltd. Fawerham, Kent: 1-757.
- O'Connor, W. A., Heasman, M. P. 1998. Ontogenetic changes in salinity and temperature tolerance in the doughboy scallop, *Mimachlamys asperrima*. *Journal of Shellfish Research*. 17 (1): 89-95.
- Paul, J. D. 1980. Salinity-temperature relationships in the queen scallop *Chlamys opercularis*. *Marine Biology*. 56 (4): 295-300.
- Pierce, S. K. 1970. The water balance of *Modiolus* (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae: osmotic concentrations in changing salinities. *Comp. Biochem. Physiol.* 36: 521-533.
- Pierce, S.K. 1971. A source of solute for volume regulation in marine mussels. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 38, 619-635.
- Pierce, S. K., Greenberg, M. J. 1972. The nature of cellular volume regulation in marine bivalves. *J. Exp. Biol.* 57: 681-692.
- Pierce, S.K., Greenberg, M.J., 1973. The initiation and control of free amino acid regulation of cell volume in salinity stressed marine bivalves. *J. Exp. Biol.* 59: 435-446.

- Potts, W.T.W., 1954. The inorganic composition of the blood of *Mytilus edulis* and *Anodonta cygnea*. *J. Exp. Biol.* 21:376-385.
- Potts, W.T.W., Parry, G. 1964. Osmotic and ionic regulation in animals. Pergamon Press. Oxford. pp. 423 .
- Powell, E. N., Hofmann, E. E., Klinck, J. M., Ray, S. M. 1992. Modeling oyster populations. 1. A commentary on filtration rate. Is faster always better?. *J. of Shellfish Res.* 11(2):387-398.
- Robertson, J. D. 1964. Osmotic and ionic regulation. *En:* K. M. Wilbur y C. M. Yonge (eds.). *Physiology of Mollusca.* Academic Press, New York/London. Vol. 1. pp. 283-311.
- Rodhouse, P. G, McDonald, J. H., Newell, R. I. E., Koehn, R. K. 1986. Gamete production, somatic growth and multiple-locus enzyme heterozygosity in *Mytilus edulis*. *Marine biology.* Berlín, Heidelberg. 90(2):209-214.
- Roldán-Carrillo, L. M., Maeda-Martínez, A N., Massó-Rojas, A., Sicard-González, M. T. 2005. Salinity tolerance and resistance of the relationships with species distribution and density in a coastal lagoon. *Journal of Shellfish Research.* 24 (2): 353-361.
- Rupp, G., Parsons, J. 2004. Effects of salinity and temperature on the survival and byssal attachment of the lion's paw scallop *Nodipecten nodosus* at its southern distribution limit. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 309:173-198.
- Sakurai, I., Seto, M., Makiguchi, N., Ogata, T. 2000. Tolerance of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*, to low concentrations of dissolved

- oxygen and salinity. *Japan Suisan Zoshoku (Aquaculture)*. 48(1): 137-138.
- Schmidt-Nielsen, K. 1997. *Animal Physiology*. Cambridge Univ. Press. New York, USA.
- Schoffeniels, E., Gilles, R. 1972. Ionoregulation and osmoregulation in Mollusca. *En: Forkin, M., Scheer, B.T. (eds.), Chemical Zoology*. Academic Press, New York, USA, pp. 393-420.
- Shafee, M. S., Conan, G. 1984. Energetic parameters of a population of *Chlamys varia* (Bivalvia: Pectinidae). *Marine ecology progress series*. Oldendorf. 18(3):253-262.
- Shafee, M. S, Lucas, A. 1982. Seasonal Variations of the Energy Budget in Individual Animals from a Population of *Chlamys varia* (L.) Bivalvia, Pectinidae. *Oceanologica Acta* 5(3):331-338.
- Shumway, S. E. 1977. Effect of salinity fluctuation on the osmotic pressure and Na^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} ion concentrations in the hemolymph of bivalve molluscs. *Mar. Biol.* 41: 153-177.
- Shumway, S. E. 1991. *Scallops: biology, ecology and aquaculture*. Elsevier Science Publishers B.V. New York, USA. pp. 1095.
- Shumway, S.E., Newell, R.C. 1984. Energy resource allocation in *Mulinia lateralis* (Say), an opportunistic bivalve from shallow water sediments. *Ophelia*, 23: 101-118.
- Sicard, M. T. 1999. Temperatura letal superior y temperatura óptima en una población de almeja catarina (*Argopecten ventricosus*, Sowerby II, 1842).

Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, IPN, La Paz, B.C.S., México.

Singnoret-Brailovsky, G., Maeda-Martínez, A. N., Reynoso-Granados, T., Soto-Galera, E., Monsalvo-Spencer, P., Valle-Meza, G., 1996. Salinity tolerance of the catarina scallop *Argopecten ventricosus-circularis* (Sowerby, 1842). *J. Shellfish Res.* 15(3): 623-625.

Sobral, P., Widdows, J. 1997. Influence of hypoxia and anoxia on the physiological responses of the clam *Ruditapes decussatus* from southern Portugal. *Mar. Biol.* 127(3):455-461.

Sobral, P., Fernández, S. 2004. Respuestas fisiológicas y crecimiento potencial de *Ruditapes decussatus* en Ría Formosa, Sur de Portugal. *Scientia Marina Sci. Mar. Barc.* 68(2):219-225.

Solórzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.* 14:799-800.

Somero, G.N., Bowler, R.D. 1983. Osmolytes and metabolic end products of molluscs: The design of compatible solute systems. *En: Hochachka, P. W. (ed.), The Mollusca, Volume 2: Environmental Biochemistry and Physiology, Academic Press, New York, USA, pp. 77-100.*

Sorokin C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density: In: Stein J (ed). *Handbook of physiological methods. Culture methods and growth measurement.* Cambridge University Press, Cambridge and New York. pp. 321-343.

Sprague, J.B. 1973. The ABC's of pollutant bioassay using fish. *En: Cairns, J., Dickson, K.L. (eds). Biological Methods for the Assessment of Water*

- Quality. ASTM STP 528, American Society for Testing and Materials, pp. 6-30.
- Strand, O., Solberg, P. T., Andersen, K. K., Magnesen, T. 1993. Salinity tolerance of juvenile scallops (*Pecten maximus* L.) at low temperature. *Aquaculture*. 115 (1-2): 169-179.
- Stickle, W. B., Sabourin, T. D. 1979. Effects of salinity on the respiration and heart rate of the common mussel, *Mytilus edulis* L., and the black chiton, *Katherina tunicata* (Wood). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 41: 257-268.
- Taylor, H.H., Ragg, N.L.C. 2005. Extracellular fluid volume, urine filtration rate and haemolymph mixing time in the abalone, *Haliotis iris* Martyn: A comparison of ⁵¹Cr-EDTA and ¹⁴C-inulin as extracellular markers. *Marine and Freshwater Res.* 56: 1117–1126.
- Thompson, R.J. 1977. Blood chemistry, biochemical composition, and the annual reproductive cycle in the giant scallop, *Placopecten magellanicus*, from southeast Newfoundland. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 34:2104-2116.
- Thompson, R., Macdonald, B. 1991. Physiological integrations and energy partitioning. *En: Shumway, S. E. (ed.), Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Elsevier. New York.* 21:349-377.
- Vahl, O., Clausen, B. 1980. Frequency of swimming and energy cost of byssus production in *Chlamys islandica* (O.F. Muller). *J. Cons. CIEM*, 39(1):101-103.
- Vahl, O. 1981. Energy Transformations by the Iceland Scallop, *Chlamys islandica* (O.F. Muller), From 70 degree N. II. The Population Energy Budget. *J. of Exp. Mar. Biol. and Ecol.* 53(2-3): 297-303.

- Van-Handel, E., 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal. Biochem.* 11, 256–265.
- Vázquez-Ortiz, F. A., Caire, G., Higuera-Ciapara, I., Hernández, G. 1995. High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in shrimp. *J. Liq. Chrom.* 18: 2059-2068.
- Wang, J., Jin, C., Jiang, J. 2001. Influence of salinity-decreasing regime on survival of juvenile *Argopecten irradians*. *Zhongguo Shuichan Kexue.* 8 (3): 35-39.
- Wang, J., Jiang, Z., Tang, Q. 2004. Study on physiological energetics of Farrer's scallop (*Chlamys farreri*). *Mar. Fish. Res./Haiyang Shuichan Yanjiu* 25(3):46-53.
- Warren, G.E., Davis, G. E. 1967. Laboratory studies on the feeding, bioenergetics and growth in fish. *En: S.D. Gerking (ed). The biological basis of freshwater fish production.* Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 175-214.
- Widdows, J. 1978. Physiological Indices of Stress in *Mytilus Edulis*. *J. of the Mar. Biol. Assoc. of the United Kingdom.* 58:125-142
- Widdows, J., Fieth, P., Worrall, C.M. 1979. Relationships between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 50: 195-207.
- Widdows, J. 1985. Effects of fluctuating and abrupt changes in salinity on the performance of *Mytilus edulis*. *En: Gray, J. S., Christiansen, M. E. (ed.), Marine Biology of polar regions and effects of stress on marine organism, Wiley-Interscience,* pp 555-566.

- Wildish, D. J., Kristmanson, D. D. 1997. Benthic suspension feeders and flow. Cambridge University Press. USA. pp. 409.
- Winberg, G. G. 1956. Rate of metabolism and food requirements of fishes. *Fish. Res. Board Can. Transl. Ser. No. 194*: 1-253.
- Worrall, C. M., Widdows, J., Lowe, D. M. 1983. Physiological ecology of three populations of the bivalve *Scrobicularia plana*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 12:267-279.
- Zhang, J., Fang, J., Liang F. 2002. Effects of low water temperature on the energy budget of scallop *Chlamys farreri*. *J. Fish. Sci. China/Zhongguo Shuichan Kexue* 9(1):48-51.
- Zhou, Y., Yang, H., Zhang F. 2002a. Physio-ecological characteristics of scallop *Chlamys farreri* measured by biodeposition method in situ: scope for growth and C, N and P budgets. *J. Fish. Sci. China/Zhongguo Shuichan Kexue* 9(2):161-166.
- Zhou, Y., Mao, Y., Yang H., He, Y., Zhang, F. 2002b. Clearance rate, ingestion rate and absorption efficiency of the scallop *Chlamys farreri* measured by in situ biodeposition method. *Acta Ecol. Sin./Shengtai Xuebao* 22(9):1455-1462.

APÉNDICE A

Trabajos de fisiología energética por especie de moluscos bivalvos (ASFA: Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts de CSA: Cambridge Scientific Abstracts).

Especie	Factores	Autores	Total de trabajos por especie
<i>Argopecten irradians irradians</i>	Costo del esfuerzo reproductivo	Barber y Blake, 1986	1
	Fisiología reproductiva y talla	Epp <i>et al.</i> , 1988	1
<i>Argopecten purpuratus</i>	Efecto de diferentes dietas	Díaz y Martínez, 1992	6
	Efecto de diferentes regimenes alimenticios	Martinez <i>et al.</i> , 1995	
	Efecto de calidad de dietas	Farías <i>et al.</i> , 1997	
	Respuestas fisiológicas a cambios de salinidad	Navarro y Gonzalez, 1998	
	Efecto de la temperatura y dieta en el esfuerzo reproductivo	Navarro <i>et al.</i> , 2000	
	Efecto de la dieta sobre la fisiología reproductiva	Farias y Uriarte, 2001	
<i>Cerastoderma edule</i>	Balance energético, marco de crecimiento	Blanchard, 1991	4
	Flujos de materia generados por bivalvos filtradores intermareales	Blanchard y Gros, 1993	
	Efectos de variabilidad ambiental en energética reproductiva	Navarro e Iglesias, 1995	
	Variaciones mareales sobre el campo de crecimiento	Navarro <i>et al.</i> , 1998	

APÉNDICE A

Continuación...

Especie	Factores	Autores	Total de trabajos por especie
<i>Chlamys farreri</i>	Flujos de materia generados por bivalvos filtradores intermareales Efectos de variabilidad ambiental en energética reproductiva Variaciones mareales sobre el campo de crecimiento Balance energético, marco de crecimiento	Zhang <i>et al.</i> , 2002 Zhou <i>et al.</i> , 2002a Zhou <i>et al.</i> , 2002b Bacher <i>et al.</i> , 2003 Wang, 2004	5
<i>Chlamys islandica</i>	Costo energético del nado y de la producción de biso Parámetros energéticos poblacionales Respuestas energéticas del nado	Vahl y Clausen, 1980 Vahl, 1981 Katherina <i>et al.</i> , 1999	3
<i>Chlamys varia</i>	Variaciones estacionales del balance energético en individuos Parámetros energéticos poblacionales	Shafee y Lucas, 1982 Shafee y Conan, 1984	2
<i>Crassostrea gigas</i>	Balance energético como herramienta para la selección de alimento Variación estacional del metabolismo	Barille <i>et al.</i> , 2003 Mao <i>et al.</i> , 2006	2
<i>Crassostrea virginica</i>	Tasas de filtración y talla	Powell <i>et al.</i> , 1992	1
<i>Euvola ziczac</i>	Variación de alimento y reservas energéticas	Katherina <i>et al.</i> , 1999	1

APÉNDICE A

Continuación ...

Espece	Factores	Autores	Total de trabajos por especie
<i>Laternula elliptica</i>	Rol en el balance energético del sistema	Momo <i>et al.</i> , 2002	2
	Crecimiento y variación energética estacional	Ahn <i>et al.</i> , 2003	
<i>Macoma balthica</i>	Cambios estacionales de crecimiento y flujos energéticos	Harvey y Vincent 1990	3
	Parámetros energéticos poblacionales	Blanchard y Gros, 1993	
	Límites de adaptación	Hummel, 1999	
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Tasas energéticas	Hibbert, 1977	2
	Efecto de oleaje	Bricelj, <i>et al.</i> , 2003	
<i>Mya arenaria</i>	Triploidía	Mason, <i>et al.</i> , 1988a Mason, <i>et al.</i> , 1988b	3
	Variaciones en la cantidad y calidad de alimento suspendido	MacDonald <i>et al.</i> , 1998	
<i>Mytilus edulis</i>	Tensión de oxígeno y salinidad	Bayne, 1975	13
	Índices fisiológicos de estrés	Widdows, 1978	
	Estrés ambiental y contaminación	Bayne <i>et al.</i> , 1979	
	Variaciones estacionales en la utilización de C y N	Hawkins y Bayne, 1985	
	Efectos de múltiples locus enzimáticos (heterocigocidad)	Rodhouse <i>et al.</i> , 1986	
	Producción de gametos, crecimiento somático y heterocigocidad en enzimas	Rodhouse <i>et al.</i> , 1986	

APÉNDICE A

Continuación...

Especie	Factores	Autores	Total de trabajos por especie		
<i>Placopecten magellanicus</i>	Influencia de la disponibilidad de alimento y temperatura	MacDonald y Thompson, 1986	8		
	Influencia de la calidad de alimento y la actividad de alimentación	Bacon y MacDonald, 1991			
	Marco de crecimiento en función de la dieta	Grant y Cranford, 1991			
	Efectos de la frecuencia de nado y la temperatura	Kleiman <i>et al.</i> , 1996			
	Respuesta a la concentración y calidad de partículas suspendidas	MacDonald <i>et al.</i> , 1998			
	Impactos de un nuevo combustible en termoeléctricas	Armsworthy <i>et al.</i> , 1999			
	Impactos de fluidos causados por perforación petrolera	Cranford <i>et al.</i> , 1999			
	Reservas y actividad en función de las variaciones de alimento	Katherina <i>et al.</i> , 1999			
	<i>Scrobicularia plana</i>	Parámetros energéticos poblacionales		Worrall <i>et al.</i> , 1983	2
		Estudio estacional en relación a la temperatura		Guerreiro, 1995	
<i>Ruditapes decussatus</i>	Exposición a monio	Sobral y Fernández, 2004	5		

APÉNDICE A

Continuación...

Especie	Factores	Autores	Total de trabajos por especie
<i>Tapes philippinarum</i>	Toxicidad de 4-nonilfenol	Matozzo <i>et al.</i> , 2003	
<i>Tapes philippinarum</i>	Infecciones y parámetros para evaluar estrés	Da Ros <i>et al.</i> , 1998	
<i>Ruditapes decussatus</i>	Influencia de hipoxia y anoxia	Sobral y Widdows, 1997	
<i>Tapes decussatus</i>	Energética reproductiva en función de variabilidad ambiental	Navarro e Iglesias, 1995	
<i>Venus verrucosa</i>	Contaminantes (exposición a petróleo)	Axiak, 1987a Axiak, 1987b	2