



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE SUPLEMENTO
ALIMENTICIO A BASE DE MACROALGAS Y MICROESFERAS
LIPÍDICAS PARA ACONDICIONAMIENTO GONÁDICO DE
OSTIÓN *Crassostrea gigas*.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Susej Guadalupe López Marcos

La Paz, Baja California Sur, junio de 2026.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las **17:00** horas del día **16** del mes de **junio** del año **2026**, se procedió por las personas abajo firmantes, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE SUPLEMENTO ALIMENTICIO A BASE DE MACROALGAS Y MICROESFERAS LIPÍDICAS PARA ACONDICIONAMIENTO GONÁDICO DE OSTIÓN *Crassostrea gigas*"

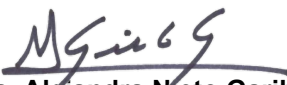
Presentada por la alumna:

Susej Guadalupe López Marcos

Aspirante al Grado de DOCTORA EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones las personas integrantes de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Grado y nombre	Estatus	Firma
Dra. Regina Elizondo González	Co-Directora de Tesis	
Dr. Pedro Cruz Hernández	Co-Director de Tesis	
Dr. Alberto Peña Rodríguez	Co-Tutor	
Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo	Co-Tutora	
Dra. Laura Liliana López Galindo	Co-Tutora	
 Dra. Alejandra Nieto Garibay, Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos		



La Paz, Baja California Sur, a 19 de junio de 2026.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Susej Guadalupe López Marcos del Programa de Doctorado en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Bibliografía
Texto citado



Página 2 de 157 - Descripción general de integridad

18% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto citado

Fuentes principales

- 17% Fuentes de Internet
- 8% Publicaciones
- 0% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Director-Co/Directores

Dra. Regina Elizondo González

Dr. Pedro Cruz Hernández

Estudiante

Susej Guadalupe López Marcos

Personal técnico de asesoría en el análisis

Susana Luna García

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Regina Elizondo González
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Directora de Tesis

Dr. Pedro Cruz Hernández
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutor de Tesis

Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de Tesis

Dra. Laura Liliana López Galindo
Universidad Autónoma de Baja California
Co-Tutora Externa de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Regina Elizondo González
Dr. Pedro Cruz Hernández
Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo
Dra. Laura Liliana López Galindo

Jurado de Examen

Dra. Regina Elizondo González
Dr. Pedro Cruz Hernández
Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo
Dra. Laura Liliana López Galindo

Suplentes

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra
Dr. Eduardo Quiroz Guzmán

Resumen

El acondicionamiento gonádico en moluscos bivalvos depende en gran medida de la disponibilidad y calidad del alimento, siendo las microalgas, como *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana*, la principal fuente nutricional en sistemas de cultivo. Sin embargo, su producción implica altos costos operativos, lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas alimenticias sostenibles. En este estudio se evaluó el uso de detritos unicelulares (SCD) de *Ulva lactuca* y microesferas lipídicas ricas en ácidos grasos ω -3 como suplementos para sustituir parcialmente microalgas en la dieta de *Crassostrea gigas*, así como sus efectos sobre el desempeño reproductivo, la composición bioquímica, la actividad enzimática digestiva y la microbiota asociada. Se desarrollaron y optimizaron metodologías para la obtención de detritos y microesferas lipídicas (1–45 μ m), las cuales fueron evaluadas en dos bioensayos. En el primero, realizado durante un acondicionamiento gonadal de ocho semanas, se probaron cinco tratamientos a partir de una dieta base compuesta por *C. calcitrans* e *I. galbana* (1:1). Tres tratamientos consistieron en la sustitución del 25% de la dieta base: 25% SCD (D25), 25% microesferas lipídicas (M25) y 12.5% SCD + 12.5% microesferas lipídicas (DM25). Adicionalmente, se evaluó un tratamiento con 100% microalgas suplementadas con 5% SCD + 5% microesferas lipídicas (CDM10), así como un control (CTRL). El segundo bioensayo se realizó fuera de la época reproductiva, comparando el tratamiento DM25 frente a un control.

En el primer bioensayo, los suplementos no afectaron la supervivencia, la maduración gonadal ni el desempeño reproductivo. A partir de la semana 4 se observaron avances en el desarrollo gonadal y en el área de cobertura gonadal (ACG), con machos alcanzando la madurez en D25, M25 y DM25, y hembras con mayor desarrollo en DM25. El tratamiento DM25 presentó la mayor fecundidad, mientras que M25, DM25 y CDM10 mostraron una mayor producción de larvas D-veliger a las 24 h respecto al control. A nivel bioquímico, los tratamientos suplementados favorecieron la redistribución de reservas energéticas, destacando el incremento de lípidos en M25 y de glucógeno en D25. En el segundo bioensayo, la suplementación promovió una mayor acumulación de carbohidratos, fosfolípidos y triglicéridos en la glándula digestiva y en el tejido conectivo vesicular. La actividad enzimática digestiva se mantuvo estable, indicando una adecuada asimilación del alimento. La microbiota digestiva presentó una alta diversidad bacteriana (1669 ASVs), sin cambios significativos en diversidad alfa ni beta; sin embargo, el análisis de abundancia diferencial evidenció modificaciones específicas en ciertos grupos bacterianos, incluyendo una disminución relativa de *Vibrio* y un incremento de bacterias asociadas al clado Roseobacter en el tratamiento con suplementos.

En conjunto, los resultados demuestran que la suplementación con detritos de *U. lactuca* y microesferas lipídicas permite sustituir parcialmente (25%) las microalgas sin comprometer el desempeño fisiológico, reproductivo ni microbiológico de *C. gigas*, representando una alternativa nutricional viable y sostenible para la acuicultura de ostión.

Palabras clave: *Crassostrea gigas*, acondicionamiento gonadal, *Ulva lactuca*, detritos, microesferas lipídicas.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3462-6808>

Vo. Bo. Co-Directores(a) de Tesis


Dra. Regina Elizondo González
Co-Directora


Dr. Pedro Cruz Hernández
Co-Director

Summary

Gonadal conditioning in bivalve mollusks largely depends on food availability and quality, with microalgae such as *Chaetoceros calcitrans* and *Isochrysis galbana* representing the main nutritional source in hatchery systems. However, microalgae production involves high operational costs, promoting the search for sustainable alternative feeds. This study evaluated the use of *Ulva lactuca*-derived single-cell detritus (SCD) and ω -3-rich lipid microspheres as dietary supplements to partially replace microalgae in the diet of *Crassostrea gigas*, as well as their effects on reproductive performance, biochemical composition, digestive enzymatic activity, and associated microbiota. Methodologies to produce SCD and lipid microspheres (1–45 μ m) were developed, optimized, and subsequently evaluated in two bioassays.

The first bioassay was conducted during an eight-week gonadal conditioning period using a basal diet composed of *C. calcitrans* and *I. galbana* (1:1). Five dietary treatments were evaluated: three treatments consisting of a 25% replacement of the basal diet with 25% SCD (D25), 25% lipid microspheres (M25), and 12.5% SCD + 12.5% lipid microspheres (DM25); one treatment consisting of 100% microalgae supplemented with 5% SCD + 5% lipid microspheres (CDM10); and a control treatment (CTRL). A second bioassay was conducted outside the reproductive season, comparing the DM25 treatment with the control.

In the first bioassay, dietary supplementation did not negatively affect survival, gonadal maturation, or reproductive performance. From week 4 onward, gonadal development and gonadal coverage area (GCA) increased, with males reaching maturity in D25, M25, and DM25, while females showed greater gonadal development in DM25. The DM25 treatment showed the highest fecundity, whereas M25, DM25, and CDM10 produced higher numbers of D-veliger larvae at 24 h compared with the control. At the biochemical level, supplemented treatments promoted the redistribution of energy reserves, particularly through increased lipid content in M25 and glycogen accumulation in D25.

In the second bioassay, supplementation promoted higher accumulation of carbohydrates, phospholipids, and triglycerides in the digestive gland and vesicular connective tissue. Digestive enzymatic activity remained stable, indicating adequate food assimilation. The digestive microbiota exhibited high bacterial diversity (1669 ASVs), with no significant changes in alpha or beta diversity; however, differential abundance analysis revealed specific shifts in certain bacterial groups, including a relative decrease in *Vibrio* and an increase in bacteria associated with the Roseobacter clade in the supplemented treatment.

Overall, the results demonstrate that supplementation with *U. lactuca* detritus and lipid microspheres allows the partial replacement (25%) of microalgae without compromising the physiological, reproductive, or microbiological performance of *C. gigas*, representing a viable and sustainable nutritional alternative for oyster aquaculture.

Keywords: *Crassostrea gigas*, gonadal conditioning, *Ulva lactuca*, detritus, lipid microspheres.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3462-6808>



Dra. Regina Elizondo González
Co-Directora



Dr. Pedro Cruz Hernández
Co-Director

Dedicatoria

A mis Padres, Eloina y Jesús,

por ser siempre mi mayor apoyo.

Gracias por estar presentes en cada etapa de mi vida y por recordarme, incluso en los momentos difíciles, que siempre podré contar con ustedes.

A mis Hermanas,

por su cariño, por su compañía y por demostrarme una y otra vez que, pase lo que pase, siempre estaremos ahí unas para otras.

A mi Esposo, Argel,

por su amor, paciencia y apoyo incondicional durante todo este proceso.

Gracias por caminar a mi lado en cada etapa y por creer en mí incluso cuando el camino parecía difícil.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), como institución receptora de mis estudios de posgrado y a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca no. 814810 otorgada.

A las instalaciones y laboratorios de CIBNOR que permitieron el desarrollo del presente trabajo y a su personal responsable:

- Laboratorio de Alimento Vivo, Ing. Julián Alfonso Garzón Favela, Ing. Octavio Atilano, Biol. Gabriel Robles.
- Laboratorio de Análisis Químico Proximal, Geol. Sindi Juan Antúnez.
- Laboratorio de Bioquímica Fisiológica, M.C. Roberto Hernández.
- Laboratorio de Biotecnología de Microalgas, Dra. Bertha O. Arredondo.
- Laboratorio de Genómica y Bioinformática, M.C. Gabriela Mendoza y Dr. Alberto Peña.
- Laboratorio de Histología, Dra. Carmen Rodríguez Jaramillo y Ma. Eulalia Meza.
- Laboratorio de Mejoramiento Genético en Acuicultura, M.C. Jose Luis Ramírez.
- Laboratorio de Metabolismo de Lípidos, M.C. Olivia Arjona.
- Laboratorio de Nutrición Acuícola, Dr. Ernesto Goytortúa.
- Laboratorio Experimental de Homeopatía Acuícola y Semillas Marinas, M.C. José Delfino Barajas Frías y Tec. Pablo Ormart Castro.
- Planta de Alimentos, Dr. Roberto Civera.

Al personal administrativo de la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos por sus atenciones: Dra. Alejandra Nieto Garibay, C. Adriana Teresa Franzoni García, Mtra. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Fabiola Arellano Romero, C.P. Raquel Emilia Herrera Vega, C. Tania Verónica Núñez Valdez, Lic. Horacio Sandoval Gómez y a C. Susana Luna García.

A la Dra. Kitty por todo su apoyo y por haber formado parte inicial de mi comité tutorial.

A mis tutores: Dra. Laura Liliana López Galindo, Dr. Alberto Peña y Dra. Carmen Rodríguez Jaramillo, por su orientación, apoyo constante y valiosas aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.

A mis co-directores: Dr. Pedro Cruz Hernández y Dra. Regina Elizondo González, por su apoyo invaluable, su guía y su constante disposición para acompañarme durante este proceso. Agradezco profundamente no solo sus contribuciones académicas, sino también su comprensión y respaldo en momentos personales, lo cual fue fundamental para la culminación de este trabajo.

A mis compañeros de posgrado: Dr. Eduardo Miranda y Dr. Raúl Cruz por su valioso apoyo durante los muestreos.

A mis amigos, tanto en La Paz como en Ciudad Constitución y otras ciudades, por su compañía, apoyo y por mantenerse siempre presentes a pesar de la distancia. Especialmente a Itzel, Luis Enrique y Miguel, gracias por siempre estar. Los momentos compartidos y su constante ánimo hicieron este proceso mucho más llevadero.

A Medelyne, por su valiosa amistad desde el inicio de esta etapa. Gracias por abrirme las puertas de su hogar y por hacerme sentir parte de su familia. Agradezco los momentos compartidos, el apoyo mutuo y el cariño que también he recibido de Lexa Dian.

A mi familia, especialmente a mi suegra Mercedes, a mis padres y a mis hermanas Dulce, Brissa y Abylenne, por su amor, apoyo y confianza a lo largo de toda mi formación. Gracias por impulsarme siempre a seguir adelante y por estar presentes en cada etapa de este camino.

A mi esposo, por su amor, paciencia y apoyo incondicional durante todo este proceso. Gracias por acompañarme en cada etapa, por escucharme, motivarme y sostenerme incluso en los momentos más difíciles. Este logro también es tuyo.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que, de distintas maneras, brindaron su apoyo, tiempo o conocimiento para que esta investigación pudiera realizarse y concluirse.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Cultivo de ostión <i>Crassostrea gigas</i>	3
2.1.1 Acondicionamiento de reproductores y maduración	4
2.1.2 Nutrición en bivalvos y uso de microalgas en criaderos	7
2.1.3 Desove y desarrollo embrionario	9
2.2 Dietas alternativas	10
2.2.1 Uso de macroalgas marinas como fuente nutricional en bivalvos	11
2.2.2 Detritos unicelulares	13
2.2.3 Micropartículas y dietas microintegradas	14
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivos particulares	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS	21
6.1 Material biológico	21
6.1.1 Obtención de las macroalgas <i>Ulva lactuca</i> y <i>Sargassum sp.</i>	21
6.2 Elaboración de suplementos alimenticios	21
6.2.1 Elaboración de detritos	21
6.2.1.1 Pruebas utilizando enzima Celluzyme	21
6.2.1.2 Pruebas utilizando enzima Cellulase 50 XL 6.	22
6.2.1.3 Pruebas utilizando enzima Celluzyme Extra	23
6.2.1.4 Pruebas utilizando enzima Zymefeed BG MX	23
6.2.1.5 Método optimizado para elaboración de detritos de <i>U. lactuca</i>	23
6.2.2 Elaboración de microparticulados de lípidos	24
6.2.2.1 Microcápsulas de gelatina/goma arábica enriquecidas con lípidos	24
6.2.2.2 Microesferas de emulsiones lipídicas	25
6.2.2.3 Microesferas con agentes emulsificantes	25
6.2.3 Caracterización bioquímica	26
6.2.3.1 Determinación de proteínas totales	26
6.2.3.2 Determinación de carbohidratos totales	27
6.2.3.3 Extracción y determinación de lípidos totales	28
6.2.3.4 Extracción y cuantificación de ácidos grasos	30
6.2.3.5 Análisis de lípidos totales de microesferas lipídicas	31

6.3 Bioensayos de alimentación para determinar el efecto de la inclusión de los suplementos alimenticios en el acondicionamiento de reproductores de <i>Crassostrea gigas</i>	31
6.3.1 Bioensayo preliminar de ingesta y aceptabilidad de detritos unicelulares y microesferas lipídicas.....	32
6.3.2 Bioensayo 1 de alimentación con detritos unicelulares y microesferas lipídicas.....	33
6.3.3 Parámetros biométricos.....	35
6.3.3.1 Análisis estadísticos.....	35
6.3.4 Desarrollo gonadal	36
6.3.5 Análisis histológico	36
6.3.6 Identificación de estadios reproductivos.....	37
6.3.7 Área de cobertura gonadal	37
6.3.8 Composición bioquímica de gónada y músculo.....	38
6.3.8.1 Análisis de lípidos totales	39
6.3.8.2 Análisis de proteínas	39
6.3.8.3 Análisis de carbohidratos	39
6.3.8.4 Análisis de glucógeno	40
6.3.8.5 Análisis estadísticos.....	40
6.3.9 Efecto de la inclusión de los suplementos alimenticios en la fecundidad y desempeño temprano de larvas D-veliger de <i>Crassostrea gigas</i>	41
6.3.9.1 Desarrollo embrionario hasta larva D-veliger	41
6.3.9.2 Análisis estadísticos.....	42
6.4 Bioensayo 2 de alimentación para evaluar el efecto de la combinación de detritos unicelulares y microesferas lipídicas en adultos de <i>Crassostrea gigas</i> después de la época reproductiva	42
6.4.1 Parámetros biométricos.....	44
6.4.1.1 Análisis estadísticos.....	45
6.4.2 Análisis histoquímico del tejido gonadal, tejido conectivo vesicular y glándula digestiva	45
6.4.3 Área de cobertura de gónada o tejido conectivo vesicular y glándula digestiva	46
6.4.3.1 Análisis estadísticos.....	46
6.4.4 Actividad enzimática digestiva	47
6.4.4.1 Análisis estadísticos.....	48
6.4.5 Caracterización de comunidades bacterianas digestivas	49
6.4.5.1 Extracción de ADN.....	49
6.4.5.2 Procesamiento bioinformático y análisis de comunidades bacterianas.....	49
6.4.5.3 Análisis de comunidades bacterianas	50
6.4.5.4 Análisis estadísticos.....	50
7. RESULTADOS.....	53
7.1 Pruebas utilizando diferentes enzimas	53
7.1.1 Pruebas utilizando enzima Celluzyme y enzima Cellulase 50 XL	53
7.1.2 Pruebas de optimización de enzima Celluzyme.....	53
7.1.3 Pruebas utilizando enzima Celluzyme Extra	54
7.1.4 Pruebas utilizando enzima Zymefeed BG MX	55
7.2 Elaboración de microcápsulas y microesferas lipídicas.....	56

7.2.1 Lípidos totales de microcápsulas y microesferas.....	57
7.3 Contenido bioquímico de harina de <i>Ulva lactuca</i> , detritos unicelulares y microalgas utilizadas en los bioensayos.	57
7.3.1 Perfil de ácidos grasos de harina de <i>Ulva lactuca</i> , detritos unicelulares, microencapsulados lipídicos y la combinación de microalgas utilizadas en los bioensayos ..	58
7.4 Bioensayos de alimentación para determinar el efecto de la inclusión de los suplementos alimenticios en el acondicionamiento de reproductores de <i>Crassostrea gigas</i>	61
7.4.1 Ensayo preliminar de alimentación con detritos unicelulares y microesferas lipídicas	61
7.4.2 Bioensayo 1 de alimentación con detritos unicelulares y microesferas lipídicas.....	61
7.4.3 Estadios reproductivos.....	62
7.4.4 Cobertura gonadal	67
7.4.5 Composición bioquímica en músculo y gónada.....	67
7.4.6 Fecundidad y cultivo de embriones de Bioensayo.....	72
7.4.7 Bioensayo 2 para evaluar el efecto de la combinación de detritos unicelulares y microesferas lipídicas fuera de la época reproductiva	74
7.4.8 Estadios reproductivos y cobertura gonadal	74
7.4.9 Contenido histoquímico	76
7.4.9.1 Contenido histoquímico en tejido conectivo vesicular	79
7.4.9.2 Contenido histoquímico en glándula digestiva	81
7.4.10 Actividad enzimática digestiva	82
7.4.11 Caracterización de las comunidades bacterianas	83
7.4.11.1 Diversidad Alfa	83
7.4.11.2 Diversidad Beta	84
7.4.11.3 Composición a nivel de Filo.....	85
7.4.11.4 Composición a nivel de Familia	86
7.4.11.5 Composición a nivel de Género	88
8. DISCUSIÓN.....	91
8.1 Desarrollo de suplementos para acondicionamiento de ostión <i>Crassostrea gigas</i>	91
8.2 Efectos de los suplementos en el acondicionamiento de ostión <i>Crassostrea gigas</i>	93
8.2.1 Maduración gonádica.....	93
8.2.2 Composición bioquímica en gónada y músculo (Bioensayo 1)	96
8.2.3 Fecundidad y desempeño temprano de larvas D-veliger	98
8.3 Efectos de la combinación de detritos unicelulares y microesferas lipídicas en adultos de <i>C. gigas</i> fuera de la época reproductiva	99
8.3.1 Reservas energéticas (carbohidratos y lípidos) (Bioensayo 2).....	99
8.3.2 Actividad enzimática digestiva	101
8.3.3 Comunidades bacterianas de la glándula digestiva	103
9. CONCLUSIONES.....	108
10. LITERATURA CITADA	110
11. ANEXOS	119
Anexo A. Verificación de supuestos estadísticos	119
Anexo B. Pruebas estadísticas aplicadas	120
Anexo C. Análisis de diversidad beta.....	122
Anexo D. Análisis de abundancia diferencial.....	123

Anexo E. Artículo publicado.- Dietary supplement effects of <i>Ulva lactuca</i> single-cell detritus and lipid microspheres on <i>Crassostrea gigas</i> broodstock conditioning.	127
Anexo F. Artículo sometido.- Effects of <i>Ulva lactuca</i> single-cell detritus and lipid microspheres on energy reserves and microbiota of <i>Crassostrea gigas</i> during the post-reproductive period.....	142

Lista de figuras

Figura 1. Bioensayo preliminar de alimentación de <i>C. gigas</i> con detritos unicelulares y microencapsulados lipídicos.	33
Figura 2. Sistemas de alimentación utilizados en el bioensayo 1, con duración de 59 días.	34
Figura 3. Diagrama del diseño experimental de los diferentes tratamientos que se evaluaron en el bioensayo de alimentación durante el proceso de acondicionamiento de <i>C. gigas</i>	35
Figura 4. Tanques de fibra de vidrio utilizados para la prueba de desarrollo larvario.	42
Figura 5. Sistema de alimentación para tratamiento control (A), unidades de maduración (B) y sistema de alimentación de suplementos (C) utilizados en el bioensayo 2 con duración de 52 días.	43
Figura 6. Diagrama del diseño experimental de dos tratamientos que se evaluaron en el bioensayo 2 de alimentación durante el proceso de acondicionamiento de octubre-diciembre de <i>C. gigas</i>	44
Figura 7. Fotomicrografías a 20× de microcápsulas de gelatina/goma arábica (A), microesferas de emulsiones lipídicas (B) y microesferas con agentes emulgentes (C).	57
Figura 8. Estadios de desarrollo gonadal en machos de <i>C. gigas</i> identificados durante el bioensayo de alimentación. E0= indiferenciado, E1= gametogénesis temprana, EII= gametogénesis tardía, EIII= maduración, EIV= desove parcial. Fotomicrografías a 20×. EZ, espermatozoides; TCV, tejido conectivo vesicular.	63
Figura 9. Estadios de desarrollo gonadal en hembras de <i>C. gigas</i> identificados durante el bioensayo de alimentación. E0= indiferenciado, E1= previtelógenesis, EII= vitelogénesis, EIII= postvitelogénesis, EIV= desove parcial. Fotomicrografías a 20×, barra de escala = 50 µm. OA, ovocito atrésico/degenerado; Og, oogonia; OPV, ovocito previtelogénico; OPVt, ovocito postvitelogénico; OV, ovocito vitelogénico.	63
Figura 10. Proporción de sexos (%) determinada mediante histología en ostiones <i>C. gigas</i> acondicionados con diferentes regímenes alimenticios durante 8 semanas. Los tratamientos incluyeron: D25 (25 % de detritos + 75 % de mezcla de microalgas); M25 (25 % de microesferas lipídicas + 75 % de mezcla de microalgas); DM25 (12.5 % de detritos + 12.5 % de microesferas lipídicas + 75 % de mezcla de microalgas); CDM10 (100 % de mezcla de microalgas + 5 % de detritos + 5 % de microesferas lipídicas); CTRL (100 % de mezcla de microalgas). Las barras representan la proporción de machos (negro), hembras (blanco) y hermafroditas (rayado).	64
Figura 11. Frecuencia relativa (%) en machos (A) y hembras (B) de <i>C. gigas</i> sometidos a diferentes regímenes alimentarios durante la semana 8. D25: 25 % detritos + 75 % microalgas; M25: 25 % microesferas lipídicas + 75 % microalgas; DM25: 12.5 % detritos + 12.5 % microesferas lipídicas + 75 % microalgas; CDM10: 100 % microalgas + 5 % detritos + 5 % microesferas lipídicas; CTRL: 100 % microalgas. Estadios gonadales: E0 = indiferenciado; E1 = espermatogénesis inicial / previtelogénesis, EII = espermatogénesis tardía / vitelogénesis, EIII = maduración / postvitelogénesis; EIV = desove; Hermafrodita.	65
Figura 12. Fotomicrografía a 20x de sección histológica de gónada de organismo hermafrodita del tratamiento CDM10, después de 8 semanas de alimentación experimental. EZ, espermatozoide; OPV, ovocito previtelogénico; OV, ovocito vitelogénico; TCV, tejido conectivo vesicular.	66
Figura 13. Fotomicrografía a 10× de larvas D-veliger obtenidas después de 24 h de la fecundación.	73

- Figura 14.** Fotomicrografía (20×) de secciones histológicas de la gónada de *C. gigas*, donde se observan gametos residuales en organismos correspondientes al muestreo inicial del bioensayo de alimentación realizado posterior a la época reproductiva. A y B = hembras postdesove; C = macho maduro; D = macho post desove. EZ, espermatozoides; OA, ovocito atrésico/degenerado; OPVt, ovocito postvitelotogénico; OV, ovocito vitelotogénico; TCV, tejido conectivo vesicular.....75
- Figura 15.** Fotomicrografías (40×) de secciones histológicas de *C. gigas*, correspondientes al muestreo inicial del bioensayo posterior a la época reproductiva. Se observan estructuras de gónada, tejido conectivo vesicular (TCV) y glándula digestiva (GD). Las secciones fueron teñidas con Ácido Periódico de Schiff-Azul Alciano (PAS-AB) para la detección de carbohidratos neutros (color magenta).76
- Figura 16.** Fotomicrografías (40×) de secciones histológicas de *C. gigas*, correspondientes al muestreo final del tratamiento Control y del tratamiento Suplementos del bioensayo posterior a la época reproductiva. Se observan estructuras de tejido conectivo vesicular (A) y glándula digestiva (B). Las secciones fueron teñidas con Ácido Periódico de Schiff-Azul Alciano (PAS-AB) para la detección de carbohidratos neutros (CN) en color magenta.77
- Figura 17.** Fotomicrografías (40×) de secciones histológicas de *Crassostrea gigas*, correspondientes al muestreo inicial del bioensayo posterior a la época reproductiva. Se observan estructuras de gónada, tejido conectivo vesicular y glándula digestiva. Las secciones fueron teñidas con Sudán Negro para la detección de lípidos (triglicéridos en tonalidades negro-azulado y fosfolípidos en gris).78
- Figura 18.** Fotomicrografías (40×) de secciones histológicas de *C. gigas*, correspondientes al muestreo final del tratamiento Control y del tratamiento Suplementos del bioensayo posterior a la época reproductiva. Se observan estructuras de tejido conectivo vesicular (A) y glándula digestiva (B). Las secciones fueron teñidas con Sudán Negro para la detección de lípidos, triglicéridos (TR) en tonalidades negro-azulado y fosfolípidos (FL) en gris.79
- Figura 19.** Índices de diversidad Alfa (Chao1, Shannon, Simpson) entre tratamientos Control y Suplementos.....84
- Figura 20.** Ordenación mediante Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) entre tratamientos tratamiento Control y Suplementos.85
- Figura 21.** Abundancia relativa a nivel Filo entre tratamientos Control (alimentado exclusivamente con microalgas) y Suplementos (detritos unicelulares de *U. lactuca* y microesferas lipídicas). Se muestran únicamente los filos con mayor abundancia relativa; el resto se agrupó en la categoría “Otros”86
- Figura 22.** Abundancia relativa promedio (%) de la comunidad bacteriana a nivel Familia en los tratamientos Control (alimentado exclusivamente con microalgas) y Suplementos (detritos unicelulares de *U. lactuca* y microesferas lipídicas). Se muestran únicamente las familias con mayor abundancia relativa; el resto se agrupó en la categoría “Otros”.88
- Figura 23.** Abundancia relativa promedio a nivel Género de los tratamientos Control (alimentado exclusivamente con microalgas) y el tratamiento suplementado con detritos unicelulares de *U. lactuca* y microesferas lipídicas. Se muestran únicamente los géneros con mayor abundancia relativa; el resto se agrupó en la categoría “Otros”89

Lista de tablas

Tabla 1. Descripción de las fases de desarrollo de <i>Crassostrea corteziensis</i> hembra (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008).	6
Tabla 2. Descripción de las fases de desarrollo de <i>C. corteziensis</i> macho (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008).	7
Tabla 3. Análisis químico proximal de <i>U. lactuca</i> (g/100g materia seca) recolectada en la ensenada de La Paz, B.C.S.	12
Tabla 4. Estudios sobre el uso de detritos unicelulares de macroalgas (SCD) como reemplazo de microalgas moluscos bivalvos.	14
Tabla 5. Estudios sobre el desarrollo de microcápsulas y microesferas utilizadas como alimento en especies de ostión.	15
Tabla 6. Resultados de las pruebas de optimización realizadas para la elaboración de detritos unicelulares de <i>Ulva lactuca</i> utilizando la enzima Celluzyme.	54
Tabla 7. Resultados de las pruebas realizadas para elaboración de detritos unicelulares de <i>Ulva lactuca</i> utilizando la enzima Celluzyme Extra.	55
Tabla 8. Resultados de las pruebas realizadas para elaboración de detritos unicelulares utilizando la enzima Zymefeed BG MX.	56
Tabla 9. Recuento de microcápsulas y microesferas obtenidas mediante los diferentes métodos de elaboración.	57
Tabla 10. Contenido bioquímico de harina de <i>U. lactuca</i> , detritos unicelulares y la combinación de microalgas (<i>C. calcitrans</i> e <i>I. galbana</i> , 1:1) empleadas en los bioensayos 1 y 2.	58
Tabla 11. Composición de ácidos grasos (>1% del total) de harina de <i>U. lactuca</i> , detritos unicelulares, microesferas lipídicas y la combinación de microalgas (<i>C. calcitrans</i> e <i>I. galbana</i>) utilizadas en el bioensayo 1.	60
Tabla 12. Supervivencia (S), longitud inicial (Li), longitud final (LF), peso vivo inicial (PVi), peso vivo final (PVf), ganancia de peso (GP) y biomasa (B) de <i>Crassostrea gigas</i> alimentado durante 59 días con los diferentes tratamientos.	62
Tabla 13. Composición bioquímica (media $\pm$ DE) en músculo de <i>C. gigas</i> alimentado con los diferentes tratamientos durante los muestreos.	70
Tabla 14. Composición bioquímica (media $\pm$ DE) en gónada de <i>C. gigas</i> alimentado con los diferentes tratamientos durante los muestreos.	71
Tabla 15. Número de huevos fecundados de <i>C. gigas</i> alimentados con los diferentes tratamientos, previo al cultivo embrionario.	72
Tabla 16. Número de embriones en estadios blástula, trocófora y larva D obtenidos de la fecundación de <i>C. gigas</i> alimentado con los diferentes tratamientos, expresado en número de embriones o larvas por mililitro.	73
Tabla 17. Supervivencia (S), longitud inicial (Li), longitud final (LF), peso vivo inicial (PVi), peso vivo final (PVf), ganancia de peso (GP), biomasa inicial (Bi) y biomasa final (BF) de <i>C. gigas</i> alimentado durante 52 días con los diferentes tratamientos.	74
Tabla 18. Contenido histoquímico (%) de carbohidratos neutros, triglicéridos y fosfolípidos en tejido conectivo vesicular de <i>Crassostrea gigas</i> durante el periodo experimental. Los valores corresponden a media $\pm$ desviación estándar. Diferencias significativas entre tratamientos se	

evaluaron mediante la prueba de Mann–Whitney U para carbohidratos y triglicéridos y ANOVA de dos vías para fosfolípidos ($p < 0.05$).....	80
Tabla 19. Contenido histoquímico (%) de carbohidratos neutros, triglicéridos y fosfolípidos en glándula digestiva de <i>C. gigas</i> durante el periodo experimental. Los valores corresponden a media $\pm$ desviación estándar. Diferencias significativas entre tratamientos se evaluaron mediante la prueba de Mann–Whitney U ($p < 0.05$).	82
Tabla 20. Actividad de enzimas digestivas en la glándula digestiva de <i>C. gigas</i> bajo los tratamientos Control y Suplementos. Los valores corresponden a media $\pm$ desviación estándar.	83

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una de las industrias alimentarias de más rápido crecimiento en las últimas décadas. En 2022 la producción acuícola mundial alcanzó un récord de 130.9 millones de toneladas de productos acuáticos, superando por primera vez a la pesca de captura y representando el 51% del total de animales acuáticos producidos (FAO, 2024). Entre las especies cultivadas, los peces dominan la producción, seguidos de crustáceos y moluscos. Los moluscos bivalvos marinos (ostiones, almejas, mejillones, vieiras, etc.) son organismos que se alimentan por filtración de partículas orgánicas en suspensión, principalmente fitoplancton y microalgas, por lo que actúan como consumidores primarios dentro de la cadena trófica. Por ello, constituyen una fuente relativamente económica y saludable de proteína animal, lo que ha impulsado su demanda a nivel global (FAO, 2020).

Dentro de los bivalvos, el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* es una de las especies más importantes en la acuicultura mundial. Su cultivo es altamente exitoso – por ejemplo, la producción global de ostras japonesas tuvo un valor estimado de 23.9 mil millones de USD en 2017 – y su rendimiento depende fundamentalmente de la calidad de los reproductores y la semilla que generan (Lovegrove *et al.*, 2025).

En particular, el acondicionamiento gonadal de los adultos antes del desove es clave para lograr alta fecundidad y descendencia vigorosa (Utting y Millican, 1997). Se ha observado que la composición nutricional de la dieta suministrada a los reproductores afecta directamente el éxito reproductivo: por ejemplo, variaciones en el contenido proteico de las microalgas suministradas a *C. gigas* se han traducido en cambios en la supervivencia larval de la progenie (Morais *et al.*, 2020). Así, optimizar la alimentación de los reproductores resulta esencial para mejorar la viabilidad de huevos y larvas.

En términos nutricionales, la estrategia más efectiva durante el acondicionamiento gonadal de los ostiones consiste en suministrar raciones de combinaciones de microalgas vivas, dada su riqueza en proteínas, ácidos grasos esenciales (ω -3, ω -6), esteroides y vitaminas. Sin embargo,

producir grandes cantidades de microalgas en criaderos aumenta considerablemente los costos operativos (hasta 30–60% del costo total) (Oostlander *et al.*, 2020).

Por ello, se han explorado alternativas o suplementos alimenticios parciales. Estudios previos en bivalvos han mostrado que es posible sustituir hasta la mitad de la ración de microalgas por ingredientes de bajo costo – por ejemplo, harinas de cereales– sin afectar negativamente la supervivencia y crecimiento larval (López-Carvallo *et al.* 2017; Mazón-Suástegui *et al.* 2017). Asimismo, se consideran otros suplementos nutritivos (como detritos unicelulares de macroalgas o microesferas lipídicas) que podrían aportar nutrientes esenciales (proteínas, lípidos, vitaminas) reduciendo la dependencia exclusiva de microalgas y mejorando el acondicionamiento gonádico.

En este contexto, el presente estudio evaluó el efecto de dos tipos de suplementos alimenticios en el ostión *C. gigas*. En el primer bioensayo de alimentación se probaron cinco tratamientos nutricionales durante la fase de acondicionamiento gonadal, combinando distintas proporciones de detritos unicelulares de la macroalga *Ulva lactuca* y microesferas lipídicas. Se analizó el efecto de estos tratamientos sobre indicadores reproductivos y fisiológicos: estadios de maduración gonadal, fecundidad, y parámetros bioquímicos en gónadas y músculo. El segundo bioensayo de alimentación se realizó después de la época reproductiva (octubre-diciembre) para evaluar el efecto de la combinación de los mismos suplementos sobre la histoquímica en gónada y glándula digestiva, la actividad enzimática y la composición de las comunidades bacterianas digestivas en la glándula digestiva del ostión. De este modo, la presente tesis aporta conocimiento sobre estrategias de alimentación suplementaria al uso exclusivo de microalgas vivas, con el propósito de optimizar el acondicionamiento de reproductores de *C. gigas*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*

El ostión *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) o también conocido como ostión japonés u ostión del Pacífico, es una especie de bivalvo que se destaca por su demanda y producción a nivel mundial. A pesar de ser originario de las zonas estuarinas de las costas asiáticas del Pacífico, actualmente es cultivado a nivel mundial debido a su potencial de rápido crecimiento y su gran tolerancia a condiciones ambientales como temperatura (de -2 a 35°C) y salinidad (de 0 a 50 ups) (Helm, 2005), por lo que se considera una especie de alto valor acuícola.

Entre las principales características morfológicas de *C. gigas* encontramos que su concha es grande, ovalada, irregular y extremadamente rugosa, con dos valvas desiguales. El color exterior de la concha es blanquecino con estrías moradas, mientras que el interior es blanco con un músculo de color oscuro (Chávez-Villalba, 2014). Además, se caracteriza por ser un organismo hermafrodita protándrico, es decir, su sexo masculino madura antes que el sexo femenino (CONAPESCA, 2018).

En México es una especie que fue introducida a partir del año 1973, con la finalidad de promover actividades de acuicultura en la región Noroeste del país, logrando dominar su biotecnología desde la producción de larvas y semilla hasta la engorda (Chávez-Villalba, 2014). Actualmente, los principales estados productores de ostión en el litoral del Golfo de México son Tabasco y Veracruz, con el ostión del Atlántico *Crassostrea virginica*; mientras que en el litoral Pacífico destacan Sinaloa, Baja California y Baja California Sur con *C. gigas* (CONAPESCA, 2024). En el año 2024, el cultivo de ostión registró una producción acuícola nacional de 30,616 toneladas, con un valor de 593.9 millones de pesos mexicanos. Asimismo, la producción proveniente de acuicultura superó en 53% a la obtenida mediante pesca de captura, reflejando la importancia económica de esta actividad dentro del sector acuícola nacional.

La producción de semillas se realiza en laboratorios ostrícolas o criaderos (hatcheries), donde el proceso generalmente comprende varias etapas: acondicionamiento de reproductores, inducción a desove para obtención de gametos, fecundación y desarrollo larvario, producción

de postlarvas o semilla, y finalmente las fases de pre-engorda y engorda hasta alcanzar la talla comercial deseada (Chávez-Villalba, 2014; Rato *et al.*, 2018). Durante todas estas etapas es necesario mantener cultivos de microalgas que se utilizan como alimento para larvas, juveniles y reproductores, lo que representa uno de los principales costos operativos en los sistemas de producción (Helm *et al.*, 2006).

2.1.1 Acondicionamiento de reproductores y maduración

El ciclo reproductivo es uno de los procesos fisiológicos más importantes del ciclo de vida de los bivalvos (Enríquez-Díaz *et al.*, 2009). En *C. gigas*, el inicio y desarrollo de la gametogénesis están influenciados principalmente por factores como la temperatura, la disponibilidad de alimento y factores genéticos (Muranaka y Lannan, 1984; Chávez-Villalba *et al.*, 2002, 2003; Enríquez-Díaz *et al.*, 2009; Anjos *et al.*, 2017; Rato *et al.*, 2018; Willer *et al.*, 2020).

El desarrollo gonadal en especies del género *Crassostrea* es de gran importancia desde el punto de vista biológico y económico, ya que influye directamente en la producción de gametos y en el éxito reproductivo de los organismos, lo que a su vez impacta en la producción de semilla y en la sostenibilidad de los sistemas de cultivo (Helm, 2009).

En los criaderos, el acondicionamiento de reproductores consiste en mantener a los organismos adultos en sistemas controlados donde se manipulan factores como la temperatura y la alimentación con el fin de estimular el desarrollo gonadal y acelerar la maduración de los gametos (Helm *et al.*, 2006). Los reproductores se seleccionan generalmente con base en características como el crecimiento, la condición fisiológica y las características de la concha. Posteriormente, son trasladados a tanques de acondicionamiento dentro del criadero, donde permanecen bajo condiciones controladas hasta alcanzar la madurez reproductiva.

Durante esta fase, el sexo de los ostiones no es distinguible externamente, debido a que muchas especies presentan hermafroditismo secuencial. Bajo condiciones adecuadas de temperatura y alimentación, los organismos pueden iniciar la gametogénesis y alcanzar la maduración de los gametos en un periodo aproximado de cuatro a seis semanas.

El estado de desarrollo gonadal puede evaluarse por inspección visual, implicando un entrenamiento técnico del especialista o mediante análisis histológicos, los cuales permiten clasificar las diferentes fases del ciclo reproductivo con base en características citológicas y en el grado de desarrollo de los folículos gonadales y los gametos (Tablas 1 y 2). Estas escalas reproductivas han sido ampliamente utilizadas para describir las etapas del desarrollo gonadal en ostreidos.

Una vez que los reproductores alcanzan la madurez gonadal, el desove puede inducirse mediante diferentes métodos, siendo el choque térmico uno de los más utilizados en criaderos. Alternativamente, los gametos pueden obtenerse mediante la extracción directa a través del rasgado de las gónadas. En condiciones óptimas, una hembra madura puede producir entre 50 y 80 millones de ovocitos (Helm et al., 2006).

Tabla 1. Descripción de las fases de desarrollo de *Crassostrea corteziensis* hembra (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008).

Estadio	Descripción histológica (40X)
0 - Indiferenciado	Pueden encontrarse agrupaciones de células gonadales, especialmente cerca de los gonoductos y rodeadas de tejido conectivo. Algunos folículos son reabsorbidos o destruidos, por lo que podría considerarse un estadio de recuperación. También pueden observarse ovocitos que no han sido reabsorbidos y que permanecen hasta la siguiente remaduración.
I - Previtelogénesis	Los folículos o túbulos gonadales, que son alargados e interconectados, están rodeados de abundante tejido conectivo. Las oogonias son redondas ($6.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$). Los ovocitos previtelogénicos ($14.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$) tienen escaso citoplasma basófilo. Se pueden encontrar algunos ovocitos vitelogénicos.
II - Vitelogénesis	Los folículos son grandes y están llenos de ovocitos vitelogénicos poligonales o pediculados ($25.7 \pm 0.2 \mu\text{m}$) adheridos a las paredes de los folículos. También pueden encontrarse ovocitos previtelogénicos.
III - Postvitelogénesis	Los folículos están llenos de ovocitos postvitelogénicos de tamaño homogéneo ($38.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$) que son poligonales o redondos, y ya no están adheridos a la pared de los folículos y tienen un citoplasma acidófilo. Se observan algunos ovocitos vitelogénicos y previtelogénicos adheridos a las paredes de los folículos. Hay una reducción considerable del tejido conectivo.
IV - Desove	El desove puede ser parcial, con espacios en los folículos dejados por los ovocitos maduros desovados. Los ovocitos vitelogénicos pueden encontrarse adheridos a las paredes de los folículos y se observan abundantes hemocitos. En los conductos de desove se observa un epitelio ciliado de desove con ovocitos postvitelogénicos y degenerados (sobre madurados y atrésicos) La superficie ocupada por la gónada suele ser menor en comparación con la fase inicial de desove. Algunos ovocitos grandes y redondos se desprenden de la pared del folículo ($40 \pm 0.5 \mu\text{m}$).

Tabla 2. Descripción de las fases de desarrollo de *C. corteziensis* macho (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008).

Estadio	Descripción histológica (40X)
0 - Indiferenciado	Pueden encontrarse agrupaciones de células gonadales, especialmente cerca de los gonoductos y rodeadas de tejido conectivo. En este estadio, no es posible distinguir entre gónada masculina y femenina.
I – Gametogénesis temprana	Las espermatogonias están adheridas a las paredes de los folículos en los túbulos gonadales masculinos. El tejido conectivo vesicular es abundante. Los espermatocitos se distribuyen en patrón centrípeto desde las paredes del acino hasta el lumen.
II – Gametogénesis tardía	Los folículos están llenos de todas las categorías de células sexuales, incluidos los espermatozoides. El tejido conectivo vesicular se reduce.
III - Maduración	Los folículos son más grandes y están llenos de espermatozoides con los talos orientados hacia el lumen. Pueden observarse algunos espermatocitos. Los folículos están rodeados de tejido conectivo vesicular que se reduce considerablemente y los folículos están unidos.
IV - Desove	Pueden observarse los folículos interconectados llenos de espermatozoides liberando espermatozoides al gonoducto. También se observan espermatozoides residuales en el lumen de los folículos vacíos que además presentan abundantes hemocitos.

2.1.2 Nutrición en bivalvos y uso de microalgas en criaderos

El acondicionamiento reproductivo y la producción de larvas y postlarvas representan algunas de las etapas más costosas dentro de los criaderos de moluscos bivalvos. Durante estas fases, la disponibilidad y calidad del alimento desempeñan un papel fundamental, ya que influyen directamente en el desarrollo gonadal, la producción de gametos y el éxito del desarrollo larvario.

En la acuicultura de moluscos, la principal fuente de alimento utilizada en laboratorio corresponde a cultivos de microalgas, las cuales poseen propiedades nutricionales adecuadas para satisfacer los requerimientos fisiológicos de los bivalvos. Entre las especies de microalgas más utilizadas a nivel mundial se encuentran *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros muelleri*,

Chaetoceros calcitrans, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Pavlova lutheri*, así como especies de los géneros *Nitzschia* y *Navicula* (Borowitzka, 1997).

Los requerimientos nutricionales de los bivalvos varían de acuerdo con su etapa de desarrollo, ya sea larval, postlarval o adulta. En el caso de los reproductores en fase de acondicionamiento, la ración diaria de microalgas suele estimarse como un porcentaje de la biomasa total de los organismos. Para ostiones mantenidos a temperaturas de acondicionamiento entre 20 y 22°C, se recomienda una ración aproximada equivalente al 6 % de la biomasa, mientras que en condiciones de menor temperatura (alrededor de 16°C) la ración puede reducirse a aproximadamente el 3% (Utting y Millican, 1997).

Diversos estudios han demostrado que la calidad de la dieta suministrada a los reproductores durante el acondicionamiento reproductivo influye significativamente en el desarrollo gonadal, la gametogénesis, el almacenamiento de reservas energéticas y la supervivencia de la progenie durante las etapas larvarias y postlarvarias (Muranaka y Lannan, 1984; Chávez-Villalba *et al.*, 2003; Willer *et al.*, 2020).

Actualmente, en los criaderos se utilizan mezclas de diferentes especies de microalgas como alimento para favorecer la maduración gonadal de los ostiones. Entre las más utilizadas destacan *I. galbana* y *C. calcitrans*, debido a su elevado aporte nutricional, caracterizado por un contenido de proteína de aproximadamente 30–40%, lípidos entre 10–20% –principalmente ácidos grasos altamente insaturados– y carbohidratos entre 5–15% (Brown, 2002; Morais *et al.*, 2020).

No obstante, el valor nutricional de las microalgas puede variar considerablemente dependiendo de factores como el tamaño y la forma celular, la digestibilidad, la composición bioquímica y las condiciones del cultivo (Brown, 2002). Además, la producción de microalgas en laboratorio puede presentar problemas de estabilidad y variabilidad en su composición, lo que dificulta el establecimiento de dietas completamente estandarizadas para el cultivo de bivalvos (Napolitano, 1990; Guedes y Malcata, 2012).

2.1.3 Desove y desarrollo embrionario

Una vez que los reproductores alcanzan la madurez gonadal, el desove puede inducirse por choque térmico o extraerse directamente por medio del rasgado de las gónadas. Durante el desove, los machos liberan esperma en forma de un chorro continuo de líquido lechoso a través del sifón exhalante, mientras que los óvulos liberados por las hembras presentan una apariencia granular o en forma de pequeños racimos.

En condiciones controladas, los gametos recolectados se mezclan en agua de mar filtrada para permitir la fecundación externa. La calidad de los óvulos puede evaluarse mediante observación microscópica, lo que permite verificar su morfología y viabilidad. Posteriormente, los embriones fecundados se incuban en condiciones adecuadas de temperatura y densidad para favorecer su desarrollo temprano (Helm et al., 2006).

Durante las primeras horas posteriores a la fecundación ocurre el desarrollo embrionario inicial, dando origen a la larva trocófora, considerada la primera etapa larvaria libre nadadora. Esta fase se caracteriza por la presencia de cilios que permiten el desplazamiento y ocurre pocas horas después de la fecundación. Posteriormente, la larva desarrolla la concha y se transforma en larva veliger temprana o larva tipo “D” denominada así por la forma recta de la concha. En el ostión *C. gigas*, esta etapa se alcanza aproximadamente entre 24 y 48 horas después de la fecundación, con tallas cercanas a 70–80 μm .

A medida que continúa el desarrollo, las larvas atraviesan las fases de veliger umbonada temprana y tardía, caracterizadas por el crecimiento de la concha y la formación del umbo. Finalmente, se desarrolla la etapa pediveliger, en la cual aparece el pie funcional y la larva adquiere la capacidad de explorar el sustrato para iniciar la fijación y metamorfosis hacia la fase juvenil. En cultivos a gran escala, la recuperación de larvas tipo D puede variar entre 30 y 85 %, dependiendo de factores como la calidad de los gametos, las condiciones ambientales y la nutrición de los reproductores (Helm et al., 2006).

La etapa de larva tipo D representa un indicador importante del éxito reproductivo en criaderos de ostión, ya que refleja tanto la calidad de los gametos como las condiciones de fecundación y desarrollo embrionario.

2.2 Dietas alternativas

Las variaciones en el contenido nutricional de las microalgas, así como los altos costos asociados a su producción y mantenimiento, dificultan el establecimiento de dietas estandarizadas durante el acondicionamiento gonadal del ostión. Por esta razón, existe un creciente interés en el desarrollo de fuentes de alimentación alternativas que permitan sustituir parcial o totalmente a las microalgas vivas, o bien complementar la dieta, con el objetivo de mejorar el rendimiento productivo, incrementar la capacidad de producción y reducir los costos operativos en los criaderos (Coutteau y Sorgeloos, 1992).

Para que una dieta alternativa sea viable en el cultivo de bivalvos, debe presentar ciertas características, como un tamaño de partícula adecuado que permita su ingestión por filtración, alta digestibilidad, ausencia de compuestos tóxicos y una composición nutricional que satisfaga los requerimientos fisiológicos de los organismos (Robert y Trintignac, 1997).

Diversos estudios han evaluado el uso de diferentes fuentes de alimento alternativas en la alimentación de bivalvos. Entre ellas se encuentran los detritos unicelulares derivados de macroalgas (Uchida y Murata, 2002; Pérez Camacho et al., 2004; Felix y Pradeepa 2012; Tanyaros y Chuseingjaw, 2016; Peña-Rodríguez et al., 2020; Omont et al., 2021), las levaduras (Loor *et al.*, 2021) y dietas microencapsuladas (Langdon, 1989; Heras et al., 1994; Pernet et al., 2004; Bonilla-Ahumada et al., 2018; Willer et al., 2020; Skelton et al., 2021).

Aunque algunos de estos productos han mostrado resultados prometedores, hasta el momento ninguno ha demostrado ser completamente adecuado como sustituto total de las microalgas vivas. En muchos casos, las dietas alternativas carecen del valor nutricional necesario o presentan limitaciones en su digestibilidad, lo que puede traducirse en menores tasas de crecimiento y supervivencia en comparación con las dietas basadas en microalgas vivas (Skelton *et al.*, 2021).

2.2.1 Uso de macroalgas marinas como fuente nutricional en bivalvos

Las macroalgas marinas son un recurso natural cuyo interés comercial ha aumentado en los últimos años. En el año 2020 se reportó una recolección silvestre de 1.1 millones de toneladas, mientras que la producción de especies cultivadas alcanzó aproximadamente los 35.1 millones de toneladas, con un valor de 16,500 millones de dólares (FAO, 2022). Su uso se extiende a diversos sectores, incluyendo el consumo humano y animal; así como las industrias cosmética, alimentaria y farmacéutica; además de aplicaciones en medicina, tratamiento de aguas y producción de biocombustibles (FAO, 2020).

Las macroalgas presentan una amplia diversidad de tamaños, colores, composición química y contenido de compuestos bioactivos. De manera general, se agrupan en tres grandes grupos: macroalgas verdes, rojas, y pardas. Debido a su alta capacidad de propagación, rápido crecimiento y potencial de cultivo en ambientes marinos, estos organismos han sido considerados en una fuente alternativa de ingredientes nutricionales, particularmente por contenido de vitaminas, minerales, proteínas y compuestos bioactivos (Øverland *et al.*, 2019; Leandro *et al.*, 2019).

Entre las macroalgas verdes, las especies del género *Ulva*, comúnmente conocidas como lechugas de mar, presentan un gran potencial como fuente alternativa de nutrientes para la alimentación animal. Estas algas contienen fibras dietéticas insolubles (principalmente glucanos), así como fibras solubles y diversos compuestos minerales, como calcio y magnesio. Además, algunas especies de *Ulva* presentan un contenido proteico relativamente alto en comparación con otras macroalgas verdes (Corino *et al.*, 2019), lo que ha motivado su evaluación en diferentes estudios con animales terrestres y organismos acuícolas.

Ulva lactuca es una macroalga polimórfica que puede crecer adherida al sustrato, de forma sésil o flotando libremente en la columna de agua. Se caracteriza por su rápido crecimiento y proliferación debido a que puede reproducirse tanto de manera sexual como mediante fragmentación del talo (Dominguez y Loret, 2019). El contenido de compuestos bioactivos en esta especie puede variar dependiendo de factores como la ubicación geográfica, la estación

del año y las condiciones ambientales. Estas variaciones influyen en el contenido de ácidos grasos y la proporción omega-3 ($\omega 3$) y omega-6 ($\omega 6$), así como en el contenido de clorofilas, carotenoides, y compuestos fenólicos, lo que repercute en sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

En la región de la Ensenada de la Paz, Baja California Sur, se han reportado grandes volúmenes de *U. lactuca*, lo que ha originado estudios sobre su posible aprovechamiento. Castro-González et al. (1996) realizaron un análisis de composición química proximal de esta especie recolectada durante el verano en dicha zona, con el objetivo de evaluar su potencial para la alimentación animal (Tabla 3). Asimismo, estos autores cuantificaron el contenido de minerales como calcio (0.84%), hierro (0.66%), fósforo (0.14%) y cloro (9.8%).

Tabla 3. Análisis químico proximal de *U. lactuca* (g/100g materia seca) recolectada en la ensenada de La Paz, B.C.S.

Fracción	Porcentaje (%)
Proteína cruda	10.7
Carbohidratos	30.9
Cenizas	53.2
Fibra cruda	4.8
Digestibilidad <i>in vitro</i>	64.6
Digestibilidad multienzimática	86.5

No obstante, la información disponible sobre el uso de macroalgas como sustituto de microalgas en la alimentación de bivalvos aún es limitada. Rato et al., (2018) reportaron que una sustitución parcial del 25% de microalgas por *Ulva rigida* seca puede mejorar la condición fisiológica, el desarrollo gonadal y la composición bioquímica de *C. gigas*, posiblemente debido al aumento en el contenido de lípidos y proteínas, nutrientes indispensables durante el proceso de gametogénesis.

A pesar de sus características nutricionales, el uso directo de macroalgas como alimento para bivalvos presenta ciertas limitaciones. Su tamaño de partícula y la presencia de polisacáridos estructuralmente complejos en su pared celular pueden dificultar su ingestión y digestibilidad por parte de los organismos filtradores, lo que complica la asimilación de nutrientes y

compuestos bioactivos (Charoensiddhi et al., 2017). En este sentido, una alternativa prometedora consiste en el desarrollo de suplementos alimenticios elaborados a partir de biomasa de macroalgas sometida a diferentes procesos de transformación, que podría mejorar la disponibilidad de nutrientes y favorecer el rendimiento reproductivo en especies de ostión (Muranaka y Lannan, 1984).

2.2.2 Detritos unicelulares

Los detritos unicelulares (o Single Cell Detritus, SCD, por sus siglas en inglés) son un producto obtenido a partir de biomasa de macroalgas sometida a una serie de procesos fisicoquímicos y biológicos (Uchida, 1996; Uchida y Murata, 2002). Estos procesos pueden incluir digestión química o enzimática, manipulación del pH y fermentación microbiana, con el objetivo de desintegrar la estructura celular de las macroalgas. Como resultado, se obtiene un producto con tamaño de partícula reducido (generalmente menor a 20 μm), lo que facilita su ingestión por organismos filtradores y mejora la disponibilidad de sus nutrientes (Carboni et al., 2016).

El interés en este tipo de productos radica en su potencial como alternativa alimenticia en acuicultura, particularmente como sustituto parcial de microalgas utilizadas en la alimentación de moluscos bivalvos (Uchida y Murata, 2002, 2004; Uchida et al., 2004; Bonilla-Ahumada et al., 2018; Peña-Rodríguez et al., 2020; Omont et al., 2021).

Estudios previos han evaluado el uso de detritos unicelulares derivados de macroalgas marinas como reemplazo de microalgas marinas en especies de bivalvos, obteniendo resultados positivos respecto al rendimiento productivo. Entre los beneficios reportados se encuentran la disminución del tamaño de partícula de las macroalgas, así como el aumento del contenido nutricional, principalmente carbohidratos y proteínas. En la Tabla 4 se presentan algunos estudios que han evaluado el uso de detritos unicelulares derivados de macroalgas en la alimentación de moluscos bivalvos.

Tabla 4. Estudios sobre el uso de detritos unicelulares de macroalgas (SCD) como reemplazo de microalgas moluscos bivalvos.

Macroalga (SCD)	Especie evaluada	Principales resultados	Referencia
<i>Laminaria saccharina</i>	<i>Ruditapes decussatus</i>	Uso viable como alimento para larva y semilla; desempeño productivo comparable al obtenido con microalgas.	Pérez Camacho et al., 2004
<i>Porphyra haitanensis</i>	<i>Crassostrea belcheri</i>	Sustitución parcial viable de microalgas hasta un 50% sin afectar el crecimiento ni supervivencia.	Tanyaros y Chuseingjaw, 2016
<i>Ulva clathrata</i> , <i>U. lactuca</i> y <i>Porphyra sp.</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	Tamaño de partícula 3–18 μm y aumento del contenido de proteínas y lípidos en comparación con las harinas de algas: mejor desempeño con SCD de <i>U. lactuca</i> .	Peña-Rodríguez et al., (2020)
<i>U. lactuca</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	Tamaño de partícula 1–10 μm ; sustitución de microalgas hasta 50% sin afectar supervivencia ni crecimiento.	Omont et al., 2021

2.2.3 Micropartículas y dietas microintegradas

El desarrollo de micropartículas artificiales, como microcápsulas y dietas microintegradas, ha sido propuesto como una alternativa de reemplazo total o parcial de microalgas en la alimentación de bivalvos. Estas dietas permiten formular su composición nutricional de manera específica para cubrir los requerimientos de los organismos dependiendo de su etapa de desarrollo y condiciones de cultivo.

Las microcápsulas se elaboran encapsulando ingredientes dietéticos dentro de una membrana o pared protectora, mientras que las dietas microintegradas se producen mediante la mezcla de ingredientes dietéticos con sustancias aglutinantes que permiten la formación de partículas estables. Algunos ejemplos son los microencapsulados y las microesferas de lípidos, las cuales suelen enriquecerse con ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, por sus siglas en inglés), particularmente omega 3 (Delaporte et al., 2007; Willer et al., 2020).

Para que estas micropartículas funcionen como sustitutos adecuados de las microalgas vivas o como suplementos en la alimentación de ostiones, deben cumplir con ciertas características. Entre ellas se destacan la facilidad y rapidez de elaboración, la estabilidad de la composición

nutricional, tamaño de partícula adecuado para su ingestión, alta digestibilidad y estabilidad en la columna de agua. Asimismo, las partículas no deben agregarse ni sedimentar rápidamente, y el material de recubrimiento o aglutinante debe ser impermeable al medio, pero digerible para el organismo (Robert y Trintignac, 1997; Knauer y Southgate, 1999; Knauer y Southgate, 2007; Marshall et al., 2010).

Diversos estudios han desarrollado micropartículas artificiales para su uso como alimento en diferentes especies y etapas de cultivo de ostión. En general, estas dietas han permitido obtener partículas con tamaños que oscilan entre 1 y 80 μm , lo que las hace potencialmente adecuadas para su ingestión por organismos filtradores (Tabla 5).

Tabla 5. Estudios sobre el desarrollo de microcápsulas y microesferas utilizadas como alimento en especies de ostión.

Especie	Nutriente encapsulado	Método de encapsulación	Tamaño de micropartícula	Concentración	Referencia
<i>Crassostrea gigas</i>	Lípidos	Gelatina/acacia	2.75 μm	< 20 cápsulas/ μL	Langdon, 1981
<i>Crassostrea virginica</i>	Emulsión de lípidos	Carboximetil-celulosa	1-20 μm	2.65 mg/L (peso seco)	Langdon y Siegfried, 1984
<i>Crassostrea gigas</i>	Lípidos	Gelatina/Acacia	4.7 $\pm$ 2.2 μm	0.25 mg/larva (peso seco)	Knauer y Southgate, 2007
<i>Crassostrea gigas</i>	Microalgas	Alginato de sodio, carbonato de calcio, cloruro de calcio	21–80 μm	9 $\times$ 10 ³ partículas/mL	Pales Espinosa et al., 2007
<i>Ostrea edulis</i>	Emulsión de lípidos	Alcohol polivinílico	1–20 μm	120 $\times$ 10 ³ partículas/mL	Heras et al., 1994
<i>Crassostrea gigas</i>	Emulsión de lípidos	Agentes emulsificantes	1-5 μm	5% del peso del tejido seco del ostión	Delaporte et al., 2007

A pesar de los avances en el desarrollo de dietas alternativas para bivalvos, muchas de estas estrategias presentan limitaciones relacionadas con la digestibilidad, la disponibilidad de nutrientes o la estabilidad de los compuestos bioactivos. En este contexto, el uso combinado

de diferentes fuentes nutricionales, como detritos unicelulares derivados de macroalgas y micropartículas enriquecidas con lípidos esenciales, podría representar una estrategia prometedora para mejorar el acondicionamiento reproductivo y el rendimiento productivo en el cultivo de ostión.

3. JUSTIFICACIÓN

La ostricultura de *Crassostrea gigas* constituye una de las actividades acuícolas más importantes a nivel mundial debido a su alta demanda y valor comercial. Durante las etapas de acondicionamiento y maduración gonádica, los organismos son alimentados principalmente con especies seleccionadas de microalgas vivas; sin embargo, la producción y mantenimiento de estos cultivos incrementa significativamente los costos operativos en los sistemas de cultivo. En este contexto, la búsqueda de alternativas nutricionales que permitan complementar o sustituir parcialmente las microalgas constituye una estrategia relevante para mejorar la eficiencia y sostenibilidad de los sistemas de cultivo.

El desarrollo de suplementos alimenticios a base de detritos unicelulares de macroalgas marinas y microesferas lipídicas representa una alternativa potencial para optimizar la alimentación durante el acondicionamiento reproductivo del ostión. La evaluación de este tipo de suplementos podría contribuir a disminuir la dependencia de cultivos de microalgas vivas y, en consecuencia, reducir los costos asociados a su producción y mantenimiento en los sistemas de cultivo.

A pesar de su potencial, aún existe información limitada sobre el efecto de estos suplementos en la fisiología reproductiva y en la composición bioquímica de los tejidos en *C. gigas*. El análisis de la composición bioquímica en tejidos musculares y gonadales permite comprender cómo diferentes regímenes nutricionales influyen en la asignación de reservas energéticas y en los procesos de maduración gonádica, lo cual es fundamental para mejorar las estrategias de acondicionamiento reproductivo en bivalvos cultivados.

En este sentido, la presente investigación aborda esta problemática desde dos enfoques complementarios. En el primer experimento se evalúan diferentes combinaciones de suplementos alimenticios para determinar su efecto en la maduración gonádica, la fecundidad y la composición bioquímica de los tejidos. Posteriormente, en el segundo experimento se analiza el efecto combinado de estos suplementos durante un periodo fuera de la temporada reproductiva, con el propósito de evaluar su potencial para favorecer el acondicionamiento

fisiológico de los organismos al inicio del ciclo reproductivo. De esta manera, el estudio aporta información relevante sobre la relación entre el régimen nutricional, la bioquímica tisular y la fisiología reproductiva en *C. gigas*, contribuyendo al desarrollo de estrategias de alimentación más eficientes y sostenibles para su cultivo.

4. HIPÓTESIS

Si durante el acondicionamiento reproductivo de *Crassostrea gigas* se suministran dietas suplementadas con detritos unicelulares de macroalgas marinas y/o microesferas lipídicas ricas en ω -3, entonces estos podrán sustituir parcialmente a las microalgas en la alimentación, manteniendo el desarrollo gonádico y la acumulación de reservas bioquímicas en los tejidos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del uso de macroalgas marinas y microesferas lipídicas como suplemento alimenticio durante el acondicionamiento reproductivo y la fisiología del ostión *Crassostrea gigas*.

5.2 Objetivos particulares

1. Desarrollar suplementos alimenticios a base de la macroalga *Ulva lactuca* y de microesferas lipídicas.
2. Evaluar el efecto de los suplementos alimenticios sobre los parámetros biométricos, la maduración gonadal y la composición bioquímica de los reproductores de *Crassostrea gigas*.
3. Determinar el efecto de la inclusión de los suplementos alimenticios en los reproductores de *Crassostrea gigas* sobre la fecundidad y desempeño temprano de larvas D-veliger.
4. Evaluar el efecto de la combinación de detritos unicelulares y microesferas lipídicas en adultos de *Crassostrea gigas* fuera de la época reproductiva, mediante análisis histoquímicos y la caracterización de las comunidades bacterianas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Se evaluaron diferentes métodos para la elaboración de detritos de macroalgas y microencapsulados lipídicos, con la finalidad de obtener los suplementos alimenticios.

6.1.1 Obtención de las macroalgas *Ulva lactuca* y *Sargassum sp.*

Las macroalgas *U. lactuca* y *Sargassum sp.* utilizadas para la elaboración de los detritos fueron colectadas de la bahía de La Paz en Baja California Sur, México (24°08'15.2"N, 110°25'35.3"W). Consecutivamente fueron lavadas minuciosamente con agua marina previamente desinfectada y posteriormente cultivadas en tanques de 750 L con agua marina filtrada (<1 µm), provistos de dos difusores de aire de 3 pulgadas y fertilizadas con una solución de Miracle-Gro (8 g/L) y nitrato de amonio (NH₄NO₃) (12 g/L).

Las macroalgas cosechadas fueron lavadas con agua dulce y secadas en horno de convección a 60°C por 12 h, posteriormente pulverizadas y almacenadas a 4 °C hasta su uso.

6.2 Elaboración de suplementos alimenticios

6.2.1 Elaboración de detritos

Se realizaron pruebas preliminares para la elaboración de detritos utilizando harina de *U. lactuca* y de *Sargassum sp.*, mediante un tratamiento ácido con HCl 0.1 N y un tratamiento enzimático utilizando diferentes celulasas, basado en la metodología de Omont et al., (2021) con algunas modificaciones.

6.2.1.1 Pruebas utilizando enzima Celluzyme

Las harinas de las macroalgas se rehidrataron con agua destilada en una proporción 1:25 (p/v). Posteriormente, se realizó un tratamiento ácido durante 4 h a 40°C bajo agitación constante a pH a 1.5 mediante la adición de HCl 0.1 N.

Para el tratamiento enzimático, el pH se ajustó a 5 con NaOH 1 N y se añadió la celulasa Celluzyme® (ENMEX S.A. de C.V., México) la cual presenta una actividad carboximetilcelulosa de 90.000 U/g, y actividad β -glucanasa de 1500 U/g, en una proporción del 5% del peso de la harina del alga. La digestión enzimática se mantuvo bajo agitación continua (120 rpm) durante 24 h a 55 °C.

Los SCD producidos se filtraron a través de una malla de 25 μ m y se almacenaron en refrigeración a 4°C.

Posteriormente, se realizaron 17 pruebas adicionales para obtención de detritos de *U. lactuca* con modificaciones en la metodología, que incluyeron variaciones en la temperatura y tiempo del tratamiento ácido, así como en la concentración de la enzima Celluzyme, temperatura y tiempo del tratamiento enzimático.

Se realizaron recuentos de partículas de cada muestra en cámara de Neubauer para determinar su concentración (partículas/mL), así como para observar el tamaño y la forma de las partículas. Adicionalmente, se determinó la concentración de los detritos (mg/mL), por lo que se tomaron 5 mL de cada muestra y se colocaron en tubos de centrifuga de 15 mL previamente rotulados y pesados; después, las muestras se secaron en horno durante 48 h a 56°C y la concentración se determinó por diferencia de peso.

6.2.1.2 Pruebas utilizando enzima Cellulase 50 XL 6.

Se siguió la metodología descrita en el apartado 6.1.2.1, con la diferencia de que durante el tratamiento enzimático se utilizó la celulasa Cellulase 50 XL (Enziquim, Enzimas y Productos Químicos, S.A. de C.V., México), con una actividad celulasa de 45.000–50.000 U/g, en una concentración del 10% respecto del peso de la harina de las algas.

6.2.1.3 Pruebas utilizando enzima Celluzyme Extra

Se realizaron dos pruebas basadas en la metodología descrita en el apartado 6.1.2.1, con variaciones en las temperaturas del tratamiento ácido (40°C y 25°C) y del tratamiento enzimático (55°C y 25°C).

Para el tratamiento enzimático se utilizaron dos concentraciones de la enzima Celluzyme Extra (ENMEX S.A. de C.V., México) la cual contiene una actividad carboximetilcelulosa de 232,514 U/g y una actividad β -glucanasa de 77,261 U/g. Las concentraciones evaluadas fueron 2.5% y 1.5% respecto al peso de la harina de *U. lactuca*.

6.2.1.4 Pruebas utilizando enzima Zymefeed BG MX

Se realizaron dos pruebas siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.1.2.1, con variaciones en las temperaturas del tratamiento ácido (40°C y 25°C) y del tratamiento enzimático (55°C y 25°C).

Durante el tratamiento enzimático se utilizó la enzima Zymefeed BG MX (ENMEX S.A. de C.V., México) que contiene una actividad β -glucanasa de 34,701 U/g, en una concentración del 5 % respecto al peso de la harina de *U. lactuca*.

6.2.1.5 Método optimizado para elaboración de detritos de *U. lactuca*

Los detritos de *U. lactuca* se elaboraron con base en la metodología descrita por Omont et al., (2021), con algunas modificaciones. La harina de *U. lactuca* se rehidrató con agua destilada en una proporción 1:20 (p/v). A continuación, se aplicó un tratamiento ácido mediante el ajuste del pH a 1.5 con la adición de HCl 0.1 N diluido con agua destilada (1:1). La solución permaneció en agitación constante (85 rpm) durante 4 h a temperatura ambiente (25°C).

Posteriormente, se aplicó un tratamiento enzimático, el cual consistió en ajustar el pH a 5 mediante la adición gradual de NaOH 1 N. Una vez ajustado el pH, se añadió la enzima celulasa Celluzyme Extra (ENMEX S.A. de C.V., México), que presenta una actividad carboximetilcelulasa

de 232,514 U/g y una actividad β -glucanasa de 77,261 U/g, en una concentración del 1% respecto al peso de la harina de las algas.

La digestión enzimática se mantuvo en agitación continua (85 rpm) durante 24 h a temperatura ambiente. Los SCD de *U. lactuca* producidos se filtraron a través de un filtro de bolsa de polipropileno de 50 μ m y posteriormente se almacenaron en refrigeración a 4 °C.

6.2.2 Elaboración de microparticulados de lípidos

Se evaluaron tres metodologías para la obtención de las micropartículas lipídicas (microcápsulas y microesferas), con el objetivo de analizar tanto el tamaño y la cantidad de las micropartículas generadas, así como la viabilidad de cada método. Para ello, se realizaron recuentos de partículas utilizando una cámara de Neubauer y se obtuvieron fotomicrografías a 20X para determinar el tamaño de las partículas mediante el programa Image-Pro Plus 8.0.

6.2.2.1 Microcápsulas de gelatina/goma arábica enriquecidas con lípidos

La elaboración de microcápsulas de gelatina/goma arábica (acacia) se realizó con base en el método descrito por Southgate y Lou (1995), con algunas modificaciones.

Se preparó una solución al 2% (p/v) con 0.5 g de gelatina en 25 mL de agua destilada a 40°C y una solución al 2% (p/v) con 0.5 g de goma arábica en 25 mL de agua destilada a 40°C. Ambas soluciones se mezclaron en volúmenes iguales y se mantuvieron a 40°C.

Posteriormente, se agregaron 625 μ L de aceite de pescado Omega 3 (Nature's Life, con 212 mg de EPA, 142 mg de DHA y 3.57 mg de Vitamina E) a la mezcla gelatina/goma arábica y se homogenizó durante 70 s en una licuadora. El homogenizado se vertió en un vaso de precipitado y se agitó a 40°C.

Se ajustó el pH de la mezcla a 3.7 con la adición de HCl 0.1 N y se mantuvo la agitación durante 5 min y se mantuvo la temperatura a 40°C. Después se aumentó el pH a 9.3 con NaOH 1 N y la agitación continuó por 5 min a 40°C. La mezcla resultante se vertió en un volumen igual (50 mL) de agua destilada fría (5°C) y se almacenó en refrigeración por 2 h. Consecutivamente, la

solución se centrifugó a 3,000 RCP durante 15 min a 4°C. El precipitado correspondiente a las microcápsulas se recuperó con una espátula y se lavó tres veces para eliminar la solución de gelatina/goma arábiga mediante centrifugación y resuspensión en agua destilada fría. Finalmente, las microcápsulas se filtraron a través de una malla de 25 µm y se almacenaron en refrigeración a 4°C.

6.2.2.2 Microesferas de emulsiones lipídicas

La elaboración de microesferas de emulsiones se realizó con base en el método descrito por Heras et al. (1994), con algunas modificaciones, y consistió en emulsionar una mezcla de aceite de pescado Omega 3 (Nature's Life, con 212 mg de EPA, 142 mg de DHA y 3.57 mg de Vitamina E) con agua de mar para obtener las microesferas.

Se calentaron 1.2 mL de lecitina de soya hasta alcanzar su fase líquida y se agregaron 4.8 mL de aceite de pescado. Ambos lípidos fueron mezclados y se depositaron en un vaso de precipitado para ser sonicados (Ultrasonic Clear PS-10) durante 10 min a 40°C.

Previamente se agregó agua destilada a 40–50°C al sonicador.

Después, la emulsión se mezcló y se sonicó con una solución al 2% de alcohol polivinílico en agua de mar filtrada a 40–50°C durante 6 min. A continuación, la emulsión se enfrió inmediatamente colocándola sobre un baño de hielo y agregando agua de mar filtrada fría (4°C) en una proporción de emulsión lipídica y agua de mar de 1:2. Finalmente, la emulsión se almacenó a 4°C.

6.2.2.3 Microesferas con agentes emulsificantes

La elaboración de microesferas lipídicas se realizó con base en la metodología descrita por Pernet et al., (2004), con algunas modificaciones.

El aceite de pescado Omega 3 (Nature's Life, con 212 mg de EPA, 142 mg de DHA y 3.57 mg de Vitamina E) se calentó a 50°C y posteriormente se mezcló y homogenizó con el agente emulsionante Tween 80 en una proporción 10% (p/p).

Posteriormente, se preparó una solución de alcohol polivinílico al 2% con agua de mar filtrada ($<1\ \mu\text{m}$) a 50°C , la cual se añadió a la emulsión previamente formada. La mezcla se agitó durante 40 s en vórtex a máxima velocidad para formar las microesferas.

Inmediatamente después se agregó agua de mar filtrada fría (4°C) en una proporción 1:5 (v/v) respecto al aceite de pescado. Finalmente, las microesferas se agitaron vigorosamente y se almacenaron en refrigeración a 4°C .

6.2.3 Caracterización bioquímica

Se analizó el contenido bioquímico de proteínas, carbohidratos, lípidos, y el perfil de ácidos grasos y cenizas de la harina de la *macroalga* *U. lactuca*, de los detritos unicelulares y de las microalgas (*C. calcitrans* e *I. galbana*).

6.2.3.1 Determinación de proteínas totales

Se utilizó la metodología descrita por Lowry et al. (1951), la cual se basa en la determinación espectrofotométrica de la intensidad de color obtenida con el reactivo Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-tungstico, FMT), después de un tratamiento con una solución alcalina de cobre. Se pesaron de 5 a 10 mg de biomasa liofilizada por muestra (en triplicado) y se agregaron 5 mL de NaOH 0.1 N. Las muestras se sometieron a hidrólisis alcalina en un termo-baño a 100°C durante 1 h, y posteriormente se centrifugaron a $1,200 \times g$ durante 15 min a 10°C .

El extracto obtenido (sobrenadante) se recuperó y se transfirió en otro tubo limpio.

Se tomó un volumen previamente calculado de cada extracto para asegurar que el contenido de proteínas de la muestra se encontrara dentro del rango de concentración de la curva de calibración.

Se preparó la solución A, compuesta por carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2% (p/v) en NaOH 0.1 N, y la solución B, conformada por una mezcla 1:1 de sulfato de cobre (CuSO_4) al 5% y tartrato de potasio al 1%. Posteriormente, se mezclaron las soluciones A y B en proporción 50:1 para obtener la solución C, la cual se agregó al extracto obtenido de cada muestra.

Enseguida se añadieron 500 μL de una solución 1:1 de reactivo Folin-Ciocalteu y agua destilada (solución D). Las muestras se agitaron en vórtex y se dejaron reposar en obscuridad durante 40 min. Después, se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 750 nm.

El equipo se calibró utilizando un blanco sometido al mismo tratamiento que las muestras, pero utilizando 1 mL de NaOH 0.1 N en lugar del extracto.

La concentración de proteínas totales en las muestras se determinó a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Proteínas} = \frac{P([[(A_{750}/m) \times V_e]/V_m] \times 100}{P_s} \quad (1)$$

En donde A_{750} es la absorbancia a 750 nm, V_e es el volumen del extracto alcalino (mL), V_m es el volumen de la alícuota calculada (mL) y P_s es el peso de la muestra liofilizada (mg).

6.2.3.2 Determinación de carbohidratos totales

Se utilizó el método descrito por Ohemeng-Ntiamoah y Datta (2018), el cual se basa en la determinación espectrofotométrica de la intensidad de color obtenida mediante el reactivo antrona en H_2SO_4 .

Se pesaron de 5 a 10 mg de biomasa liofilizada por muestra (en triplicado) y se agregaron 5 mL de H_2SO_4 1.0 M. Las muestras se sometieron a digestión en un termo-baño a 100°C durante 1 h; posteriormente, se retiraron del baño y se dejaron reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente.

El extracto ácido (sobrenadante) se separó con una pipeta Pasteur y se transfirió a otro tubo limpio. Posteriormente, se tomó un volumen previamente calculado de cada extracto para asegurar que el contenido de carbohidratos de la muestra se encontrara dentro del rango de concentración de la curva de calibración.

Se preparó una solución de antrona (1:1) en H₂SO₄ concentrado al 95%, y se agregaron 3 mL de esta solución a cada muestra. Las muestras se agitaron en vortex y se dejaron reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Después, se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 630 nm. El equipo se calibró utilizando un blanco sometido al mismo tratamiento que las muestras, pero utilizando 1 mL de agua destilada en lugar del extracto.

La concentración de carbohidratos totales en las muestras se determinó a partir de la recta de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Carbohidratos} = \frac{P([[(A_{630}/m) \times V_e]/V_m] \times 100}{P_s} \quad (2)$$

En donde A₆₃₀ es la absorbancia a 630 nm, V_e es el volumen del extracto ácido (mL), V_m es el volumen de la alícuota calculada (mL) y P_s es el peso de la muestra liofilizada (mg).

6.2.3.3 Extracción y determinación de lípidos totales

La extracción de lípidos totales se realizó mediante el método cloroformo/metanol/agua de Folch et al. (1957), posteriormente modificado por Bligh y Dyer, (1959). Este método se basa en la formación de una mezcla monofásica de cloroformo, metanol y agua (CHCl₃:CH₃OH:H₂O), que permite la extracción de la mayoría de los lípidos. El extracto obtenido también se utilizó para la determinación del perfil de ácidos grasos.

Se pesaron de 5 a 10 mg de muestra liofilizada y se adicionaron 3 mL de la mezcla de solventes cloroformo:metanol (1:2) en un tubo de vidrio (tubo 1). Se agregaron 10 µL del antioxidante BHT y las muestras se sonicaron durante 15 min en un baño frío con agua y hielo. Posteriormente, las muestras se incubaron durante 24 h a 4°C, protegidas de la luz, para favorecer la extracción completa de los lípidos.

Después de la incubación, las muestras se sonicaron nuevamente durante 15 min en baño frío y posteriormente se centrifugaron a $2,795 \times g$ durante 20 min a 5°C . El extracto se recuperó con una pipeta Pasteur que se transfirió en otro tubo de vidrio (tubo 2).

A la biomasa residual se le agregaron 1.5 mL de cloroformo:metanol (1:2) y se centrifugó nuevamente a $2,795 \times g$ por 20 min a 5°C . El extracto recuperado se añadió en el tubo 2.

Posteriormente, al extracto recuperado se le agregaron 2 mL de agua destilada, se agitó en vórtex y se centrifugó a $2,795 \times g$ durante 10 min a 5°C para permitir la separación de fases. La fase inferior (cloroformo:lipido) se recuperó cuidadosamente con una pipeta Pasteur y se colocó en otro tubo (tubo 3).

Se agregó 1 mL de cloroformo al extracto restante y se repitió el procedimiento para recuperar la fase inferior. La fase cloroformo:lipido del tubo 3 se secó con nitrógeno gaseoso dentro de una campana de extracción y se posteriormente se resuspendió en 1 mL de cloroformo.

Para la cuantificación de lípidos totales se utilizó el método de calcinación descrito por Marsh y Weinstein (1966). Se tomó una alícuota previamente calculada del extracto para asegurar que el contenido de lípidos de la muestra quedara dentro del rango de concentración de la curva de calibración, y se transfirió a otro tubo limpio.

La muestra se concentró a sequedad con nitrógeno gaseoso, se agregaron 2 mL de H_2SO_4 concentrado y el tubo se selló con papel aluminio. Se calentó a 200°C durante 15 min. Finalizado el tiempo de calentamiento, la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 min. Las muestras se homogenizaron en vórtex y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 375 nm.

El porcentaje de lípidos se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lípidos} = 100 \times \left[\left[(A_{375}/m) / V_m \right] \times V_e / (P) \right] \times P \quad (3)$$

Donde A_{375} corresponde a la absorbancia a 375 nm, m a la pendiente de la curva de calibración, V_m al volumen de la muestra (mL), V_e al volumen del extracto (mL) y P al peso de la muestra liofilizada (mg).

6.2.3.4 Extracción y cuantificación de ácidos grasos

Se realizó la transesterificación de los lípidos totales extraídos en el punto 6.2.2.3, añadiendo 5 μ l del estándar interno C:23 (ácido tricosanoico). La cuantificación del perfil de ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases, basada en la comparación de los tiempos de retención de los picos obtenidos con la curva de calibración.

Se colocaron 500 μ l del extracto de cloroformo (lípidos totales) en un tubo de vidrio y se evaporó a sequedad con nitrógeno gaseoso. Se agregaron 2.5 mL de la mezcla HCl:CH₃OH (5:95 v/v). El tubo se cerró con tapón de rosca con membrana y se selló con cinta de teflón para evitar la evaporación de la muestra.

Los tubos se colocaron en termo-baño a 85°C durante 2.5 h para llevar a cabo la reacción de transesterificación. Los metil-ésteres obtenidos se extrajeron con 1.5 mL de hexano grado HPLC y el extracto de ácidos grasos se recuperó en un vial ámbar de 1.5 mL, los cuales se almacenaron a -20°C.

Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases (GC Agilent Technologies 6890, USA) equipado con una columna de sílice DB-23 (30 m $\times$ 0.25 mm ID $\times$ 0.25 μ m de grosor) y un detector de ionización de flama. Se utilizó helio como gas portador (0.7 mL $\times$ min⁻¹) con un gradiente de temperatura de 110 a 220°C.

Posteriormente, los datos obtenidos se analizaron mediante el software Galaxie Chromatography Data System. Las composiciones se expresaron como el porcentaje del contenido total de ácidos grasos (>1%).

6.2.3.5 Análisis de lípidos totales de microesferas lipídicas

Para el análisis de lípidos totales a las microcápsulas lipídicas se siguió la metodología de Bligh y Dyer (1959) con algunas adaptaciones.

Se pesaron tres tubos de vidrio de 15 mL y posteriormente se añadió a cada uno una muestra en base húmeda correspondiente cada tipo de microencapsulado lipídico elaborado (por triplicado). El peso de la muestra se determinó por diferencia. A cada tubo se agregaron 3 mL de cloroformo/metanol y se incubaron durante 24 h a 4°C. Posteriormente, las muestras se sonicaron en frío con baño de agua con hielo durante tres ciclos de 15 min cada uno.

Las muestras se centrifugaron a 2,450 rpm durante 15 min y el extracto lipídico de cada muestra fue recuperado con una pipeta Pasteur y se transfirió a otro tubo de vidrio de 15 mL. Este paso fue repetido en dos ocasiones para maximizar la recuperación del extracto lipídico de la muestra, añadiendo 1.5 mL de cloroformo/metanol.

Después se agregaron 2 mL de agua destilada en cada muestra, se mezclaron en vórtex y se centrifugaron a 2,450 rpm por 10 min para permitir la separación la fase inferior (cloroformo/lípido). Se agregó 1 mL de cloroformo adicional y se recuperó nuevamente la fase inferior con pipeta Pasteur.

Finalmente, los tubos con el extracto lipídico se colocaron bajo campana de extracción para evaporar el solvente con nitrógeno gaseoso. El porcentaje de lípidos totales se determinó por diferencia de peso.

6.3 Bioensayos de alimentación para determinar el efecto de la inclusión de los suplementos alimenticios en el acondicionamiento de reproductores de *Crassostrea gigas*

Una vez seleccionadas las metodologías de elaboración de detritos y de microesferas lipídicas, se realizó un ensayo preliminar de alimentación para ajustar las condiciones experimentales. Posteriormente, y de acuerdo con los resultados obtenidos, se llevó a cabo un bioensayo de alimentación durante el acondicionamiento de *C. gigas*.

6.3.1 Bioensayo preliminar de ingesta y aceptabilidad de detritos unicelulares y microesferas lipídicas

Se realizó un bioensayo de alimentación preliminar con duración de una semana en el mes de febrero de 2023, con la finalidad de ajustar los sistemas de alimentación continua, evaluar la ingesta y aceptabilidad de los suplementos, así como de identificar la formación de pseudoheces.

Esta prueba se realizó en el Laboratorio Experimental de Homeopatía Acuícola y Semillas Marinas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Para ello se utilizaron 15 ostiones adultos de *C. gigas*, distribuidos en tres unidades de maduración de 30 L (5 organismos por unidad experimental) con agua marina limpia (38 ± 0.5 ‰), filtrada (1 μm) y esterilizada mediante luz UV, con aireación constante.

Se evaluaron tres tratamientos:

1. 25% detritos de *U. lactuca* y 75% combinación de microalgas *C. calcitrans* e *I. galbana* (1:1).
2. 25% microesferas y 75% combinación de microalgas *C. calcitrans* e *I. galbana* (1:1).
3. 12.5% detritos de *U. lactuca*, 12.5% microesferas y 75% combinación de microalgas *C. calcitrans* e *I. galbana* (1:1).

Los detritos empleados fueron elaborados siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.2.1.5, mientras que las microesferas fueron producidas de acuerdo con la metodología descrita en la sección 6.2.2.3.

La concentración diaria de microalgas correspondiente al 75% del alimento fue de 1.5×10^9 células por ostión, y fueron proporcionadas al cuarto día de cosecha por el Laboratorio de Microalgas del CIBNOR. Las microalgas fueron cultivadas en sistema estático con agua de mar estéril enriquecida con medio Guillard f/2, a temperatura de 20–21°C y bajo iluminación continua durante 24 h.

Para el suministro de los suplementos se utilizaron bombas dosificadoras automatizadas Kamoer, modelo KSP-F, las cuales suministraron los suplementos de manera fraccionada cada hora durante un periodo de 24 h (Fig. 1).



Figura 1. Bioensayo preliminar de alimentación de *C. gigas* con detritos unicelulares y microencapsulados lipídicos.

6.3.2 Bioensayo 1 de alimentación con detritos unicelulares y microesferas lipídicas.

Se realizó un bioensayo de alimentación con duración de 59 días, durante los meses de marzo a mayo de 2023, con el objetivo de determinar el efecto de la inclusión de los suplementos alimenticios durante el acondicionamiento gonadal de *C. gigas*. El experimento se realizó en el Laboratorio Experimental de Homeopatía Acuícola y Semillas Marinas del CIBNOR.

Se utilizaron 45 ostiones adultos de *C. gigas* por tratamiento, los cuales fueron distribuidos en tres unidades de maduración de 30 L (15 organismos por unidad experimental) con agua marina limpia (38 ± 0.5 ‰), filtrada ($1 \mu\text{m}$) y esterilizada por luz UV, con aireación constante (oxígeno disuelto $> 4 \text{ mg/L}$) y a una temperatura de $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Los ostiones presentaron un peso promedio inicial de $93.26 \pm 2.64 \text{ g}$ y fueron alimentados diariamente con una combinación de microalgas *C. calcitrans* e *I. galbana* en proporción 1:1, a una densidad de 2×10^9 células por ostión, suministradas por medio de un sistema de flujo continuo.

Los suplementos fueron administrados con las mismas bombas dosificadoras automatizadas utilizadas en el bioensayo preliminar (Fig. 2).



Figura 2. Sistemas de alimentación utilizados en el bioensayo 1, con duración de 59 días.

Se evaluaron los siguientes tratamientos (Fig.3):

1. D25: 25% detritos y 75% combinación de microalgas *C. calcitrans* e *I. galbana* (1:1).
2. M25: 25% microesferas y 75% combinación de microalgas *C. calcitrans* e *I. galbana* (1:1).
3. DM25: 12.5% detritos, 12.5% microesferas y 75% combinación de microalgas *C. calcitrans* e *I. galbana* (1:1).
4. CDM10 (Complemento): 100% combinación de microalgas *C. calcitrans* e *I. galbana* 1:1 + suplementación adicional de 5% detritos y 5% microesferas.
5. Control: 100% combinación de microalgas *C. calcitrans* e *I. galbana* 1:1.

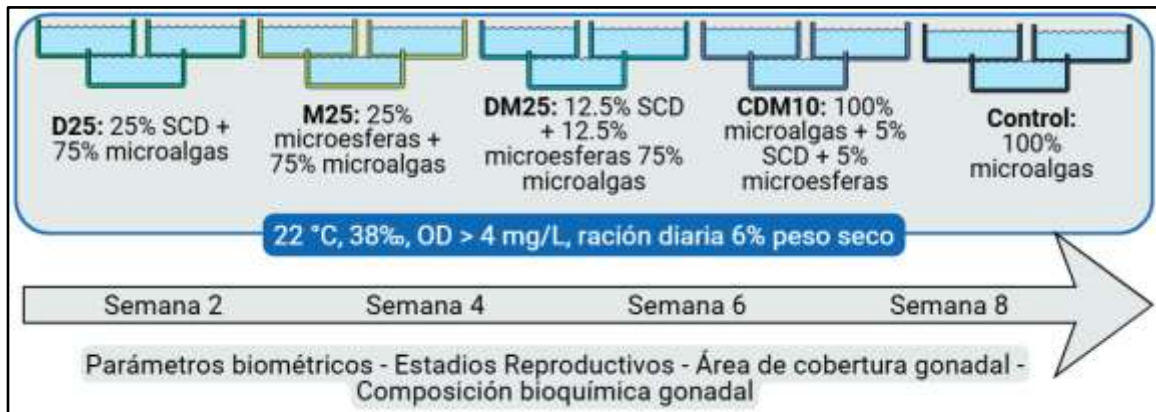


Figura 3. Diagrama del diseño experimental de los diferentes tratamientos que se evaluaron en el bioensayo de alimentación durante el proceso de acondicionamiento de *C. gigas*.

6.3.3 Parámetros biométricos

Al finalizar el bioensayo se evaluaron los siguientes parámetros biológicos con el fin de determinar el rendimiento productivo de los organismos: supervivencia, peso vivo final (PVF), longitud final (LF), biomasa y ganancia de peso (GP).

$$S = \frac{NF}{Ni} \times 100 \quad (4)$$

$$GP = \frac{PF - Pi}{Pi} \times 100 \quad (5)$$

6.3.3.1 Análisis estadísticos

La normalidad de los datos se verificó con una prueba de Shapiro-Wilk. Los datos obtenidos de los parámetros biométricos del bioensayo 1 se expresaron como la media de cada tratamiento $\pm$ desviación estándar (DE) y se sometieron a un análisis de la varianza de un factor (ANOVA) utilizando el programa IBM SPSS Statistics, versión 25.

En caso de encontrar diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$), se realizó una comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey.

6.3.4 Desarrollo gonadal

En el bioensayo 1 se realizó un muestreo inicial y posteriormente muestreos cada dos semanas. En cada muestreo se seleccionaron seis ostiones al azar por tratamiento, a los cuales se les realizó la biometría correspondiente; posteriormente, los organismos fueron sacrificados, se extrajo la carne de la concha y disecó una sección transversal de aproximadamente 1 cm a nivel visceral, que incluía una porción de gónada y glándula digestiva.

Las muestras obtenidas fueron utilizadas para evaluar el estado de desarrollo gonadal mediante análisis histológico.

6.3.5 Análisis histológico

Cada muestra se colocó en un casete de histología y se fijó en solución de Davidson durante 48 h, siguiendo la metodología descrita por Howard y Smith (1983).

A continuación, las muestras de tejido se deshidrataron mediante una serie gradual de alcohol etílico a diferentes concentraciones (70, 80, 90, 96 y 100%), seguidas de una mezcla de alcohol etílico absoluto y xilol (1:1), y finalmente en xilol absoluto.

Las muestras fueron infiltradas en parafina (Paraplast X-Tra, Mc Cormick Scientific, San Diego, CA, EE. UU.) utilizando un procesador automático de tejidos LEICA ASP200S. Posteriormente, se incluyeron en parafina líquida a 60°C y se enfriaron a -5°C en un centro de inclusión LEICA EG1150H y EG1150C.

A partir de los bloques de parafina se realizaron cortes de 4 µm de espesor mediante un micrótopo rotatorio LEICA RM2155, los cuales se colocaron sobre portaobjetos. Para cada técnica de tinción se obtuvieron tres cortes consecutivos. Los tejidos se tiñeron con hematoxilina de Harris-eosina (H&E) utilizando un teñidor automático LEICA ST5020 y posteriormente se montaron en resina sintética con cubreobjetos.

Finalmente, las preparaciones histológicas se observaron bajo el microscopio compuesto OLYMPUS BX41 con objetivos 10, 20 y 40×.

6.3.6 Identificación de estadios reproductivos

La identificación de los estadios de desarrollo en las gónadas y la clasificación de los gametos masculinos y femeninos de cada ostión se realizó con base en las descripciones de Rodríguez-Jaramillo et al. (2008).

Para ostiones hembras se identificaron los siguientes estadios de desarrollo gonadal:

0 – indiferenciado

I – previtelogénesis

II – vitelogénesis

III – postvitelogénesis

IV – desove parcial

En los ostiones macho se identificaron los siguientes estadios:

0 – indiferenciado

I – gametogénesis temprana

II – gametogénesis tardía

III – maduro

IV – desove parcial

Asimismo, se consideró la frecuencia de cada tipo de ovocito (previtelogénico, vitelogénico, postvitelogénico y ovocitos atrésicos), incluyendo ovogonias, así como de las células germinales masculinas (espermatogonias, espermatocitos y espermatozoides).

Estas clasificaciones histológicas permiten describir el progreso de la gametogénesis en ostiones y evaluar la condición reproductiva de los organismos.

6.3.7 Área de cobertura gonadal

Para la cuantificación del área de cobertura gonadal, el índice de tejido conjuntivo y el índice de ovocitos (μm^2) se utilizó el programa Image-Pro Plus, versión 9.0. El análisis se realizó mediante segmentación digital de los píxeles de cada imagen, basada en la intensidad del color

específica de los distintos tipos de tejido o célula, de acuerdo con la técnica de tinción histológica.

Para cada laminilla se capturaron cinco imágenes a un aumento de 20×, las cuales fueron analizadas individualmente para estimar las áreas correspondientes a cada tipo de tejido.

Las áreas fueron calculadas con la siguiente fórmula descrita por Rodríguez-Jaramillo et al. (2008):

$$\text{Área de cobertura (\%)} = \frac{\text{Área de cobertura del tejido o célula específico}}{\text{Área total de la imagen}} * 100 \quad (6)$$

Este análisis permite estimar cuantitativamente la proporción del tejido gonadal respecto al área total del tejido observado en la sección histológica.

6.3.8 Composición bioquímica de gónada y músculo

Los análisis de composición bioquímica de los tejidos se realizaron en el Laboratorio de Bioquímica Fisiológica del CIBNOR utilizando diferentes kits comerciales. Durante cada muestreo se tomaron muestras de gónada y músculo, las cuales fueron depositadas en tubos de 1.5 mL y almacenados a -60°C hasta su análisis.

Previo a los análisis bioquímicos, se pesaron 0.1 g de cada muestra, las cuales fueron liofilizadas a -110°C con presión de vacío a 100 torr para determinar su peso seco por diferencia. Posteriormente, las muestras fueron rehidratadas mediante la adición de 1 mL de agua destilada y homogenizadas durante 10 s utilizando el homogeneizador de tejidos Fastprep-24. A partir del homogenizado se separaron alícuotas de 25 µL para los análisis de lípidos y proteínas, y alícuotas de 50 µL para los análisis de carbohidratos y glucógeno.

A las alícuotas destinadas al análisis de carbohidratos y glucógeno se les agregaron 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3,600 rpm durante 10 min a 5°C. Finalmente, se recuperaron 25 µL del sobrenadante de cada muestra, los cuales fueron transferidos a tubos de microcentrífuga para su análisis.

Las determinaciones de proteínas, carbohidratos, lípidos y glucógeno se realizaron de acuerdo con los protocolos específicos de cada kit comercial, los cuales se describen a continuación

6.3.8.1 Análisis de lípidos totales

Se utilizó un kit comercial de Bio-Rad para el análisis de lípidos totales. A cada alícuota de 25 μL se le agregaron 250 μL de H_2SO_4 concentrado; posteriormente, las muestras se agitaron en vórtex y se calentaron en baño maría a 90°C durante 10 min. Finalizado el tiempo de reacción, las muestras se enfriaron en un baño de hielo para detener la reacción. Posteriormente, se tomaron 20 μL de cada muestra y se colocaron en una microplaca. A cada pozo se añadieron 200 μL del reactivo vainillina y las muestras se incubaron durante 40 min a 60°C.

La absorbancia se midió a 540 nm utilizando un espectrofotómetro de microplaca Multiskan. La concentración de lípidos totales se calculó con base en la regresión obtenida a partir de una curva estándar preparada con una mezcla de lípidos.

6.3.8.2 Análisis de proteínas

La determinación de proteínas se realizó utilizando un kit comercial de Bio-Rad, basado en el método de Smith et al. (1985). A cada alícuota de 25 μL se añadieron 500 μL de NaOH 0.1 N y las muestras se dejaron digerir durante 2 h. Después, se agitaron y se tomaron 25 μL para colocarlos en una microplaca. A continuación, se agregaron 200 μL del reactivo BCA y se dejó incubar a 60°C por 15 min.

La absorbancia se midió a 562 nm en el espectrofotómetro de microplaca Multiskan. La concentración de proteínas se calculó mediante la regresión obtenida de una curva estándar preparada con albúmina sérica bovina.

6.3.8.3 Análisis de carbohidratos

Para la determinación de carbohidratos se utilizó el método de antrona basado en la metodología descrita por Roe et al., (1961). A cada muestra se le agregaron 250 μL de una solución de antrona preparada en H_2SO_4 al 76%, y se calentaron en baño maría a 85°C durante 10 min. Finalizado el tiempo de reacción, las muestras se enfriaron en un baño de hielo. Se

tomaron 200 μL de cada muestra y se colocaron en una microplaca. La absorbancia se midió a 620 nm en el espectrofotómetro de microplaca (Multiskan).

La concentración de carbohidratos en cada muestra se calculó a partir de la regresión obtenida de una curva estándar de dextrosa preparada en TCA al 10%.

6.3.8.4 Análisis de glucógeno

Para la determinación de glucógeno se añadieron 500 μL de metanol (4°C) y 10 μL de sulfato de sodio a cada muestra. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3,600 rpm durante 10 min a 5°C . El sobrenadante fue retirado con pipeta y el residuo se evaporó en horno a 90°C durante 1 h. Posteriormente se añadieron 25 μL de agua destilada y 250 μL de una solución de antrona en H_2SO_4 al 76%. Las muestras se calentaron en baño maría a 85°C durante 10 min y posteriormente se enfriaron en un baño de hielo. Se tomaron 200 μL de cada muestra y se colocaron en una microplaca para la lectura de absorbancia a 620 nm utilizando el espectrofotómetro Multiskan.

La concentración de glucógeno se calculó con base en la regresión obtenida a partir de una curva estándar de glucógeno tipo II de ostión.

6.3.8.5 Análisis estadísticos

La normalidad de los resultados obtenidos de la composición bioquímica en gónada y músculo (expresados en mg/g) se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

Los datos se expresaron como la media de cada tratamiento $\pm$ desviación estándar (DE) y se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Cuando se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$), se aplicó una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software IBM SPSS Statistics, versión 25.

6.3.9 Efecto de la inclusión de los suplementos alimenticios en la fecundidad y desempeño temprano de larvas D-veliger de *Crassostrea gigas*.

Una vez que los ostiones de todos los tratamientos del bioensayo 1 alcanzaron la madurez, se seleccionaron dos machos y dos hembras por tratamiento. A cada organismo se le realizó un corte en la gónada para la extracción de los gametos (espermatozoides u ovocitos), los cuales fueron depositados individualmente en 750 mL de agua de mar.

Enseguida, los gametos de cada organismo fueron cuantificados y agrupados por tratamiento para realizar la fecundación. Una vez realizada la fertilización, se evaluó el desempeño larvario a las 24 h post-fecundación.

6.3.9.1 Desarrollo embrionario hasta larva D-veliger

Los huevos fecundados se depositaron en tanques cilíndricos de fibra de vidrio de 200 L con agua de mar ($38 \pm 0.5\text{‰}$), filtrada a $1 \mu\text{m}$ y esterilizada mediante luz ultravioleta (UV).

Los cultivos se mantuvieron con aireación constante para asegurar concentraciones de oxígeno disuelto superiores a 4 mg/L. Se manejó una densidad aproximada de 5 larvas/mL y se utilizaron tres réplicas por tratamiento (Fig. 4).

Posterior a las 24 h, se tomaron muestras de cada réplica, las cuales fueron filtradas mediante un tamiz de $< 40 \mu\text{m}$. Las larvas fueron contabilizadas bajo microscopía utilizando una cámara de conteo Sedgwick Rafter, y clasificadas de acuerdo con su estadio de desarrollo embrionario en blástula, trocófora y larva D-veliger, siguiendo las descripciones de Llor Mera (2012).

A partir de los conteos obtenidos se estimaron las tasas de desarrollo embrionario y el porcentaje de larvas D-veliger a las 24 h post-fecundación.



Figura 4. Tanques de fibra de vidrio utilizados para la prueba de desarrollo larvario.

6.3.9.2 Análisis estadísticos

La normalidad de los datos se verificó mediante la prueba de Shapiro–Wilk. El número de embriones y larvas se expresó como la media de cada tratamiento $\pm$ desviación estándar (DE). Posteriormente, los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$), se realizó una comparación múltiple de medias utilizando la prueba de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software IBM SPSS Statistics, versión 25.

6.4 Bioensayo 2 de alimentación para evaluar el efecto de la combinación de detritos unicelulares y microesferas lipídicas en adultos de *Crassostrea gigas* después de la época reproductiva

Se realizó un segundo bioensayo de alimentación con duración de 52 días durante los meses de octubre a diciembre de 2023 en el Laboratorio de Mejoramiento Genético en Acuicultura del CIBNOR, con el objetivo de determinar el efecto de la inclusión de los suplementos alimenticios durante el acondicionamiento gonadal de *C. gigas* posterior a su época reproductiva. Los suplementos evaluados correspondieron a la combinación seleccionada del tratamiento DM25 del bioensayo 1, denominada en adelante como tratamiento “Suplementos”.

Se utilizaron 66 ostiones adultos por tratamiento, los cuales fueron distribuidos en tres unidades de maduración de 60 L con agua de mar ($38 \pm 0.5 \text{ ‰}$), filtrada a $1 \text{ }\mu\text{m}$ y esterilizada mediante luz UV. Los sistemas se mantuvieron con aireación constante, con concentraciones de oxígeno disuelto superiores a 4 mg/L y a una temperatura de $22^\circ\text{C} \pm 0.5$.

Los ostiones presentaron un peso promedio inicial de $89.93 \pm 24.56 \text{ g}$ y fueron alimentados inicialmente con una mezcla de microalgas *C. calcitrans* e *I. galbana* en proporción 1:1, a una densidad de 3×10^9 células por organismo. El alimento fue suministrado por medio de un sistema de flujo continuo con recirculación (Fig. 5, A).

Los suplementos fueron administrados a través de un sistema independiente de flujo continuo con recirculación (Fig. 5, C). Después de cuatro semanas de experimentación, la densidad de la mezcla de microalgas se redujo a 1.5×10^9 células por organismo.



Figura 5. Sistema de alimentación para tratamiento control (A), unidades de maduración (B) y sistema de alimentación de suplementos (C) utilizados en el bioensayo 2 con duración de 52 días.

Se evaluaron dos tratamientos (Fig. 6):

1. Control: 100% mezcla de microalgas *C. calcitrans* e *I. galbana* en proporción 1:1.
2. Suplementos: 12.5% detritos, 12.5% microesferas y 75% mezcla de microalgas *C. calcitrans* e *I. galbana* en proporción 1:1.

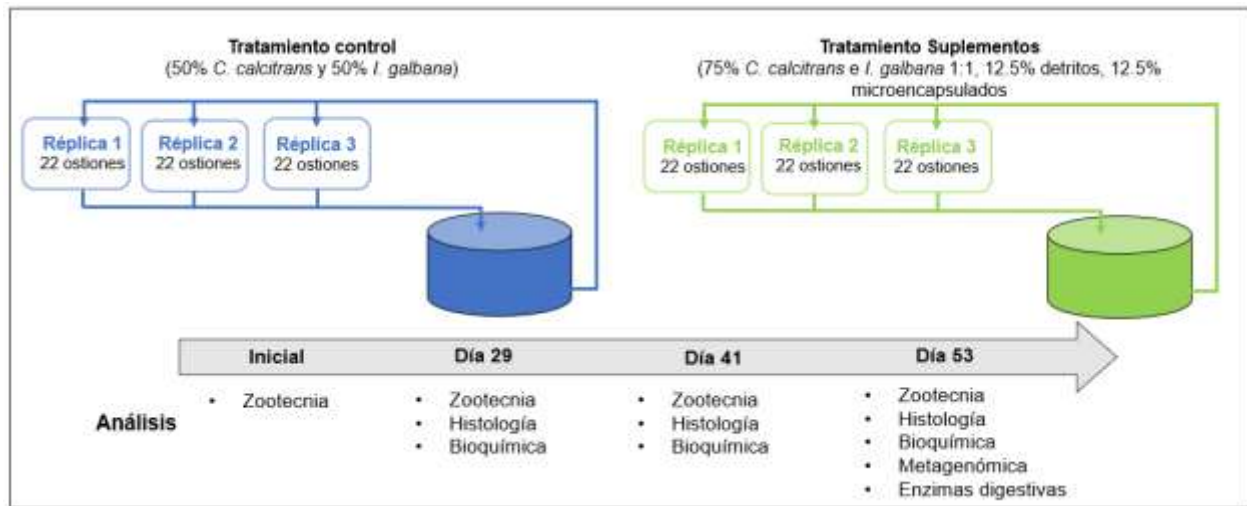


Figura 6. Diagrama del diseño experimental de dos tratamientos que se evaluaron en el bioensayo 2 de alimentación durante el proceso de acondicionamiento de octubre-diciembre de *C. gigas*.

6.4.1 Parámetros biométricos

Al finalizar el bioensayo se consideraron los siguientes parámetros biológicos para calcular el rendimiento productivo: supervivencia, peso vivo final (PVF), longitud final (LF), biomasa y ganancia de peso (GP).

La supervivencia se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$S = \frac{NF}{Ni} \times 100 \quad (4)$$

Donde NF corresponde al número final de organismos y Ni al número inicial de organismos.

La ganancia de peso se estimó utilizando la siguiente expresión:

$$GP = \frac{PF - Pi}{Pi} \times 100 \quad (5)$$

donde P_f es el peso final y P_i el peso inicial de los organismos.

6.4.1.1 Análisis estadísticos

La normalidad de los datos se verificó mediante la prueba de Shapiro–Wilk. Los parámetros biométricos del bioensayo 2 se expresaron como la media de cada tratamiento $\pm$ desviación estándar (DE).

Posteriormente, las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante una prueba de t Student para comparación de medias. La homogeneidad de varianzas se verificó mediante la prueba de Levene.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software IBM SPSS Statistics, versión 25, considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$.

6.4.2 Análisis histoquímico del tejido gonadal, tejido conectivo vesicular y glándula digestiva

Se realizó la preparación histológica e histoquímica de muestras de tejido gonadal, tejido conectivo vesicular y glándula digestiva de *C. gigas*, recolectadas durante el segundo bioensayo de acondicionamiento reproductivo, en el cual se evaluaron los tratamientos Control y Suplementos. El procesamiento histológico incluyó la toma de muestras siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.3.4. Se analizaron muestras correspondientes a cuatro momentos del bioensayo:

- Muestreo inicial: 20 organismos.
- Muestreo al día 29: 4 organismos por réplica por tratamiento.
- Muestreo al día 41: 4 organismos por réplica por tratamiento.
- Muestreo final (día 52): 7 organismos por réplica por tratamiento.

La fijación de los tejidos, deshidratación, inclusión en parafina y cortes seriados con microtomo, conforme a lo descrito previamente en la sección 6.3.5. Las secciones obtenidas fueron teñidas de acuerdo con el protocolo descrito por Rodríguez-Jaramillo et al (2008) empleando los siguientes métodos histoquímicos:

- Hematoxilina-eosina: para la observación general de la estructura tisular.
- Ácido Periódico de Schiff-Azul Alcino (PAS–AB): para la detección de carbohidratos neutros, visibles en color magenta.
- Sudán Negro: para la detección de lípidos, donde los triglicéridos se observan en tonalidades negro-azuladas y los fosfolípidos en tonos grises.

En todos los casos se obtuvieron cinco imágenes por organismo a 40× de aumento, capturadas en distintas regiones de las secciones utilizando un microscopio óptico. Las imágenes fueron analizadas cualitativa y cuantitativamente mediante el programa Image-Pro Plus, versión 9.0. El cálculo de porcentaje de carbohidratos y lípidos se realizó utilizando la misma ecuación (6) descrita en el apartado 6.3.7.

6.4.3 Área de cobertura de gónada o tejido conectivo vesicular y glándula digestiva

Se calculó el área de cobertura de la gónada o tejido conectivo tisular y de glándula digestiva de los ostiones del bioensayo 2. Para ello, se utilizó el programa Image-Pro Plus 8.0, el cual se basa en la segmentación de los píxeles de la imagen con base en la intensidad del color característico de cada tipo de tejido, de acuerdo con las técnicas de tinción empleadas y descritas anteriormente por Rodríguez-Jaramillo et al. (2008).

El área de cobertura utilizando la misma fórmula descrita en el punto 6.3.7.

6.4.3.1 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los datos obtenidos mediante los análisis histoquímicos se realizaron utilizando el software R, versión 4.4.1.

Previo a los análisis inferenciales, se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. La normalidad de los datos se verificó mediante la prueba de Shapiro–Wilk, mientras que la homogeneidad de varianzas se evaluó mediante la prueba de Levene.

Para las variables que cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se aplicó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías) para evaluar el efecto del tratamiento, el día de muestreo y la interacción entre ambos factores.

En los casos en que los datos no cumplieron los supuestos de normalidad y/o homogeneidad de varianzas, se utilizaron pruebas no paramétricas. Las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante la prueba de Mann–Whitney U, realizando adicionalmente comparaciones entre tratamientos dentro de cada día de muestreo.

En todos los análisis se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. Los datos descriptivos se presentaron como media $\pm$ desviación estándar (DE) para facilitar la interpretación biológica de los resultados.

6.4.4 Actividad enzimática digestiva

Al finalizar el segundo bioensayo de acondicionamiento, se recolectaron muestras de glándula digestiva de *C. gigas*, las cuales fueron almacenadas en tubos de 1.5 mL y conservadas a -20°C hasta su procesamiento. Se obtuvieron extractos enzimáticos utilizando una proporción de 50 μL de buffer por cada 100 mg de tejido, empleando como solución extractora un buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7.4). Las muestras fueron homogenizadas utilizando un homogenizador de tejidos FastPrep, y posteriormente centrifugadas durante 10 minutos a 12,000 rpm a 4°C . El sobrenadante resultante fue recuperado y utilizado como extracto para determinar el contenido total de proteínas y la actividad digestiva específica de las enzimas tripsina, quimotripsina, amilasa y lipasa.

El contenido de proteínas fue cuantificado mediante el método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Esta cuantificación permitió normalizar las actividades enzimática específicas.

La actividad tripsina y quimotripsina se determinó siguiendo el protocolo descrito por Toledo et al. (2011). Para la determinación de tripsina se utilizó el sustrato Boc-Gln-Ala-Arg-7-amido-4-

metilcumarina, mientras que para quimotripsina N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-7-amido-4-metilcumarina. Para ambos casos, los sustratos se emplearon una concentración de 0.8 mmol L^{-1} en dimetilsulfóxido (DMSO), utilizando un buffer de Tris-HCl 50 mmol/L con y CaCl_2 10 mmol/L (pH 8.0). Las reacciones se incubaron a 37°C y la fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 355 nm y emisión de 460 nm . Una unidad de actividad enzimática se definió como $1 \text{ }\mu\text{mol}$ de sustrato hidrolizado por minuto.

La actividad específica de lipasa se determinó con el método de Nolasco-Soria *et al.*, (2018), utilizando metilumbeliferilo como sustrato, a una concentración de 50 mmol L^{-1} en DMSO, empleando un de buffer de fosfatos 0.1 M (pH 8.0). La fluorescencia se midió a 460 nm con excitación a 355 nm . Una unidad de actividad lipasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar $1 \text{ }\mu\text{mol}$ de metilumbeliferilo por minuto.

La actividad específica de amilasa se determinó de acuerdo con el método descrito por Métais y Bieth (1968), utilizando almidón (3 g/L) como sustrato en buffer NaH_2PO_4 0.06 M (pH 7.4). La reacción se detuvo mediante la adición de una solución de yodo y la absorbancia se midió a 580 nm . Una unidad de actividad amilasa se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar $1 \text{ }\mu\text{mol}$ de almidón por minuto.

6.4.4.1 Análisis estadísticos

Los datos de actividad enzimática en la glándula digestiva se expresaron como media $\pm$ desviación estándar. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para las variables con distribución normal se aplicó la prueba t de Student para muestras independientes, mientras que para aquellas que no cumplieron el supuesto de normalidad se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R, versión 4.4.1.

6.4.5 Caracterización de comunidades bacterianas digestivas

Al término del ensayo de alimentación (día 52), se recolectaron muestras de glándula digestiva de dos ostiones por réplica en cada tratamiento. Los tejidos fueron colocados en tubos de 1.5 mL con etanol al 90% y almacenados a -20°C hasta su procesamiento.

6.4.5.1 Extracción de ADN

Previo a la extracción de ADN, los tejidos fueron homogenizados mecánicamente. La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el kit comercial DNeasy UltraClean Microbial de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del ADN obtenido se cuantificó mediante fluorometría utilizando el sistema Qubit® 3.0 de Thermo Fisher Scientific, mientras que su integridad se verificó por electroforesis en gel de agarosa.

La construcción de librerías para secuenciación se llevó a cabo mediante la amplificación de la región V3–V4 del gen 16S ribosomal (ARNr), utilizando el primer forward 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3' y el primer reverse 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'.

La secuenciación fue realizada por la empresa Novogene, mediante la plataforma Illumina NovaSeq 6000, con lecturas pareadas de 250 pb.

6.4.5.2 Procesamiento bioinformático y análisis de comunidades bacterianas

El procesamiento bioinformático de las secuencias se realizó en el entorno RStudio, empleando herramientas especializadas para el análisis de microbiomas.

Las secuencias crudas obtenidas mediante secuenciación de amplicones del gen 16S ARNr fueron sometidas a un proceso de control de calidad que incluyó el filtrado de lecturas de baja calidad, eliminación de secuencias truncadas y detección de quimeras. Este procedimiento se realizó siguiendo el flujo de trabajo del paquete DADA2, el cual permite inferir variantes de secuencia de amplicón (ASVs) con alta resolución taxonómica.

Posteriormente, las ASVs obtenidas fueron clasificadas taxonómicamente mediante comparación con la base de datos SILVA ribosomal RNA database, asignando la afiliación taxonómica en los distintos niveles jerárquicos (reino, filo, clase, orden, familia y género).

Las matrices de abundancia de ASVs, la información taxonómica y los metadatos experimentales fueron integrados en un único objeto analítico utilizando el paquete phyloseq, lo que permitió la organizar y manipular los datos para los análisis posteriores.

6.4.5.3 Análisis de comunidades bacterianas

Para facilitar la comparación entre muestras, los conteos de secuencias fueron transformados a abundancia relativa (%), normalizando los datos respecto al número total de secuencias por muestra. A partir de estos datos se calcularon las abundancias relativas promedio por tratamiento en distintos niveles taxonómicos (filo, familia y género). Los taxones con abundancias relativas inferiores al 1% se agruparon dentro de la categoría “Otros”, con el fin de simplificar la visualización de la estructura comunitaria.

La composición bacteriana de las muestras se representó mediante gráficos de barras apiladas, generados con el paquete ggplot2.

La estructura de las comunidades bacterianas se exploró mediante análisis de ordenación multivariada, incluyendo el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) y el Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS), ambos basados en matrices de distancia de Bray–Curtis. Estas representaciones permitieron visualizar la similitud o disimilitud en la composición microbiana entre los tratamientos experimentales.

6.4.5.4 Análisis estadísticos

La diversidad microbiana se evaluó mediante índices de diversidad alfa, incluyendo los índices de Shannon, Simpson y Chao1, los cuales estiman respectivamente la diversidad, dominancia y riqueza de especies presentes en las comunidades bacterianas.

Las diferencias en diversidad alfa entre tratamientos se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon, considerando el tamaño de muestra y la posible desviación de los supuestos de normalidad.

La diversidad beta, que describe las diferencias en la composición de las comunidades bacterianas entre muestras, se evaluó mediante una matriz de distancia de Bray–Curtis. Las diferencias en la estructura de la comunidad microbiana entre tratamientos se analizaron mediante un análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA) utilizando la función `adonis2` del paquete `vegan`, considerando el tratamiento como factor fijo.

Para verificar el supuesto de homogeneidad de dispersión multivariada entre grupos, se realizó un análisis de dispersión mediante la función `betadisper`, seguido de una prueba de análisis de varianza (ANOVA). Este procedimiento permitió confirmar que las diferencias observadas en PERMANOVA no estuvieran influenciadas por variaciones en la dispersión interna de los grupos. De manera complementaria, se realizó un análisis de abundancia diferencial de los taxones bacterianos a partir de los datos de conteo sin rarefacción, utilizando el paquete `DESeq2`, implementado en el entorno de programación R en conjunto con `phyloseq`. Previo al análisis, los datos fueron aglomerados a nivel taxonómico (filo, familia y género) y se aplicó un criterio de prefiltrado para excluir aquellos taxones con baja abundancia (suma total de conteos ≤ 10), con el objetivo de reducir la influencia del ruido estadístico.

El análisis de abundancia diferencial se llevó a cabo mediante la implementación de modelos lineales generalizados basados en una distribución binomial negativa, considerando el tratamiento como variable explicativa. La normalización de los datos se realizó mediante el método de estimación de factores de tamaño incluido en `DESeq2`, el cual permite corregir las diferencias en la profundidad de secuenciación entre muestras. Las comparaciones entre tratamientos se efectuaron mediante la definición de contrastes específicos entre grupos experimentales.

Los valores de significancia estadística fueron ajustados por comparaciones múltiples mediante el procedimiento de Benjamini–Hochberg, con el fin de controlar la tasa de descubrimientos

falsos (FDR). Se consideraron como estadísticamente significativos aquellos taxones con valores de p ajustados (p_{adj}) menores a 0.05.

Los resultados de los análisis se representaron gráficamente mediante diagramas de caja para los índices de diversidad alfa, análisis de ordenación multivariada para la diversidad beta, así como gráficos de abundancia relativa.

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el entorno de programación R (R Core Team), empleando los paquetes phyloseq, vegan y DESeq2.

7. RESULTADOS

7.1 Pruebas utilizando diferentes enzimas

7.1.1 Pruebas utilizando enzima Celluzyme y enzima Cellulase 50 XL

Los detritos unicelulares, elaborados a partir de harina de *U. lactuca* y *Sargassum sp.*, siguiendo la metodología de Omont *et al.*, (2021), y utilizando dos enzimas diferentes para el tratamiento enzimático, fueron observados bajo microscopio para evaluar su formación, morfología y tamaño aproximado de partículas.

En las pruebas realizadas con la enzima Cellulase 50 XL no se observó una adecuada formación de detritos en ninguna de las dos macroalgas, ya que las partículas obtenidas fueron heterogéneas y de gran tamaño. En contraste, los detritos obtenidos a partir de *U. lactuca* utilizando la enzima Celluzyme presentaron partículas más pequeñas y homogéneas, por lo que esta combinación fue seleccionada para las pruebas posteriores.

7.1.2 Pruebas de optimización de enzima Celluzyme

Con base en los resultados preliminares, se seleccionó la harina de *U. lactuca* y la enzima Celluzyme para realizar la optimización del método descrito por Omont *et al.* (2021). Para ello, se evaluó una prueba control y 17 pruebas adicionales con modificaciones en los parámetros de tiempo, temperatura y concentración enzimática.

La evaluación visual de los detritos obtenidos, en conjunto con los recuentos de partículas/mL y la concentración (mg/L) (Tabla 6), permitió identificar diferencias entre las condiciones evaluadas respecto a la prueba control.

Los mejores resultados se obtuvieron en la prueba 11, en la cual se utilizó Celluzyme al 3%, con una concentración de detritos de 47.82 mg/mL, y en la prueba 15, donde también se utilizó la enzima al 3% pero el tratamiento ácido y el tratamiento enzimático se realizaron a temperatura ambiente (25°C), obteniéndose la concentración de detritos (52.8 mg/mL).

Tabla 6. Resultados de las pruebas de optimización realizadas para la elaboración de detritos unicelulares de *Ulva lactuca* utilizando la enzima Celluzyme.

Pruebas	Tratamiento ácido		Tratamiento enzimático			Concentración de detritos	
	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Concentración (% p/v)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Partículas/mL	mg/mL
Control	4	40	5	24	55	2.7×10^3	28.9
1	1	25	5	2	25	1.2×10^4	14.06
2	1	25	10	2	25	6.9×10^3	14.56
3	3	25	5	4	25	3.8×10^3	19.5
4	3	25	10	4	25	5.3×10^3	16.56
5	3	25	2.5	4	25	1×10^4	18.86
6	2	38	3	4	50	1.6×10^3	22.8
7	2	36	5	4	50	3×10^3	25
8	2	38	10	4	50	4.7×10^3	25.3
9	2	35	3	20	50	8.7×10^3	31.98
10	2	35	5	20	50	8.8×10^3	45.84
11	2	25	3	20	50	1.9×10^3	47.82
12	2	25	5	20	50	1.1×10^4	42.46
13	4	25	5	24	25	1.3×10^4	41.12
14	4	25	3	24	25	2.4×10^4	44.73
15	3	25	5	20	25	4.7×10^3	52.8
16	2	25	5	20	25	4.4×10^3	33.62
17	2	25	5	18	25	1×10^4	34.7

7.1.3 Pruebas utilizando enzima Celluzyme Extra

Se realizaron seis pruebas con variaciones en los parámetros utilizados en la metodología para elaboración de detritos unicelulares de *U. lactuca*. Entre las condiciones evaluadas, la prueba A, en la cual se utilizó Celluzyme Extra al 1% y se aplicaron los tratamientos ácido y enzimático a temperatura ambiente (25°C), presentó la mayor cantidad de detritos, con una concentración de 3.04×10^6 partículas/mL y de 27.63 mg/mL. Además, visualmente se observaron partículas de tamaño más pequeño y homogéneo en comparación con las demás condiciones evaluadas, por lo cual fue la metodología seleccionada para la producción de detritos del bioensayo.

En las pruebas C y D se registraron concentraciones mayores (52.7 mg/mL y de 61.6 mg/mL, respectivamente): sin embargo, el número de partículas fue considerablemente menor (1.9×10^6 partículas/mL y 1.3×10^6 partículas/mL, respectivamente) (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados de las pruebas realizadas para elaboración de detritos unicelulares de *Ulva lactuca* utilizando la enzima Celluzyme Extra.

Prueba	Tratamiento ácido		Tratamiento enzimático			Concentración de detritos	
	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Concentración (% p/v)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Partículas/ mL	mg/mL
A	4	25	1	24	25	3.04×10^6	27.63
B	2	25	1.5	20	25	1.07×10^6	25.90
C	4	40	1.5	24	55	1.9×10^6	52.70
D	4	25	1.5	24	25	1.3×10^6	61.60
E	4	40	2.5	24	55	1.5×10^6	23.54
F	4	25	2.5	24	25	1.2×10^6	33.17

7.1.4 Pruebas utilizando enzima Zymefeed BG MX

Para las pruebas utilizando la enzima Zymefeed BG MX se utilizó una concentración del 5% (p/v), seleccionada con base en la concentración utilizada previamente para la enzima Celluzyme. Se evaluaron dos condiciones de temperatura durante los tratamientos ácido y enzimático.

La prueba A, en la que se aplicaron temperaturas de 40°C para el tratamiento ácido y 55°C para el tratamiento enzimático, siguiendo el método descrito por Omont *et al.*, (2021), presentó una mayor concentración de detritos (67.15 mg/mL) y un recuento de 1.2×10^4 partículas/mL de detritos, en comparación con la prueba B, realizada a temperatura ambiente (25°C) (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados de las pruebas realizadas para elaboración de detritos unicelulares utilizando la enzima Zymefeed BG MX.

Prueba	Tratamiento ácido		Tratamiento enzimático			Concentración de detritos	
	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Concentración % p/v	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Partículas/ mL	mg/mL
A	4	40	5	24	55	1.2×10^4	67.15
B	4	25	5	24	25	5.1×10^3	25.9

7.2 Elaboración de microcápsulas y microesferas lipídicas

Se obtuvieron microcápsulas y microesferas enriquecidas con lípidos mediante los tres métodos de elaboración evaluados. El número de partículas producida se determinó mediante recuento en cámara Neubauer (Tabla 9). Adicionalmente, se tomaron fotomicrografías a 20× para visualizar el tamaño y la morfología de las partículas producidas (Fig. 7).

Las microcápsulas elaboradas con gelatina/goma arábica tuvieron diámetros menores a 20 μm , con la mayoría de las partículas dentro de los rangos de 1–5 μm (44%) y 6–10 μm (36%).

Las microesferas de emulsiones lipídicas presentaron diámetros menores a 50 μm (sin filtrar), predominando tamaños de 1–5 μm (33%) y de 6–10 μm (27%).

Por su parte, las microesferas elaboradas con agentes emulsificantes presentaron diámetros menores a 45 μm (sin filtrar), con la mayoría de las partículas dentro de los rangos 1–5 μm (45%) y 6–10 μm (25%).

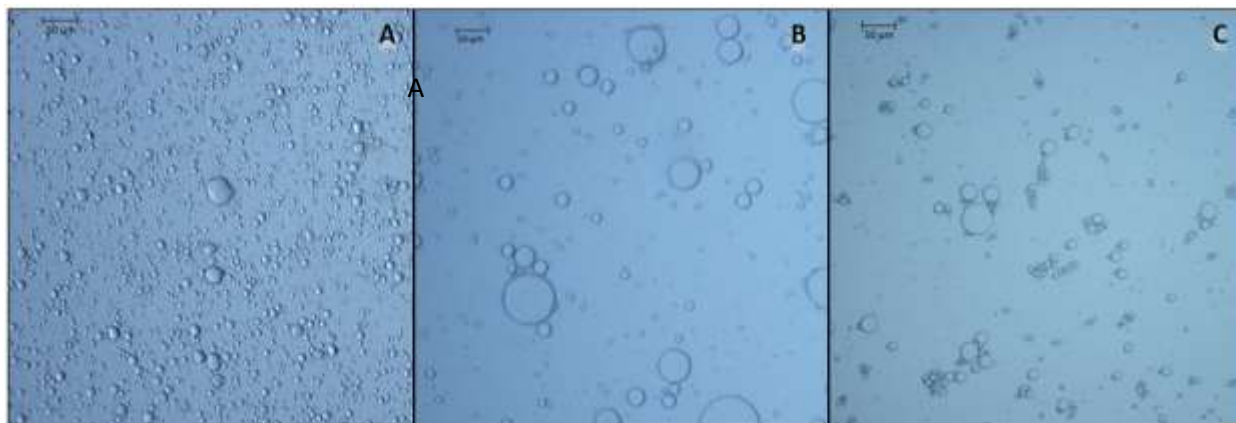


Figura 7. Fotomicrografías a 20× de microcápsulas de gelatina/goma arábica (A), microesferas de emulsiones lipídicas (B) y microesferas con agentes emulgentes (C).

Tabla 9. Recuento de microcápsulas y microesferas obtenidas mediante los diferentes métodos de elaboración.

Métodos	Concentración (partículas/mL ⁻¹)
Gelatina/goma arábica	3.3×10^4
Microesferas de emulsiones lipídicas	4.4×10^4
Microesferas con agentes emulsificantes	6.3×10^4

7.2.1 Lípidos totales de microcápsulas y microesferas

El contenido de lípidos totales en base húmeda fue de 5% en las microcápsulas de gelatina/goma arábica, 33% en microesferas de emulsiones lipídicas y 44% en las microesferas elaboradas con agentes emulgentes. Debido a su mayor contenido lipídico, estas últimas fueron seleccionadas para su uso en los bioensayos de alimentación.

7.3 Contenido bioquímico de harina de *Ulva lactuca*, detritos unicelulares y microalgas utilizadas en los bioensayos.

La composición nutricional de las dietas evaluadas (proteínas totales, carbohidratos totales, lípidos totales y cenizas) se presenta en la Tabla 10.

La combinación de microalgas *C. calcitrans* e *I. galbana* 1:1 (1.5×10^9 cel/mL), presentó el mayor contenido de proteínas, seguida por los detritos unicelulares y la harina de *U. lactuca*. En contraste, los detritos unicelulares presentaron la mayor concentración de carbohidratos totales, seguidos por la harina de *U. lactuca* y la combinación de microalgas.

Respecto a lípidos totales, los detritos unicelulares y la combinación de microalgas presentaron concentraciones mayores en comparación con la harina de *U. lactuca*. Por otro lado, el contenido de cenizas fue mayor en la harina de *U. lactuca*, seguido por la combinación de microalgas y los detritos unicelulares.

Tabla 10. Contenido bioquímico de harina de *U. lactuca*, detritos unicelulares y la combinación de microalgas (*C. calcitrans* e *I. galbana*, 1:1) empleadas en los bioensayos 1 y 2.

	Harina de <i>Ulva lactuca</i>	Detritos unicelulares	Microalgas (<i>C. calcitrans</i> e <i>I. galbana</i> 1:1)
Bioensayo 1			
Proteínas (%)	12.85 ± 1.55 ^a	36.68 ± 2.60 ^b	45.24 ± 3.61 ^c
Carbohidratos (%)	13.78 ± 0.43 ^b	27.08 ± 1.04 ^c	7.67 ± 0.58 ^a
Lípidos (%)	9.24 ± 1.19 ^a	34.11 ± 2.34 ^b	36.67 ± 1.94 ^b
Ceniza (%)	32.27 ± 1.64 ^c	3 ± 2.3 ^a	13.99 ± 1.18 ^b
Bioensayo 2			
Proteínas (%)	14.67 ± 0.30 ^a	31.77 ± 4.78 ^b	45.24 ± 3.60 ^c
Carbohidratos (%)	17.26 ± 0.91 ^b	30.39 ± 1.06 ^c	7.67 ± 0.58 ^a
Lípidos (%)	10 ± 2.15 ^a	38.33 ± 1.68 ^b	36.67 ± 1.94 ^b
Ceniza (%)	27.49 ± 1.69 ^c	2.21 ± 1.08 ^a	13.99 ± 1.18 ^b

7.3.1 Perfil de ácidos grasos de harina de *Ulva lactuca*, detritos unicelulares, microencapsulados lipídicos y la combinación de microalgas utilizadas en los bioensayos

El perfil de ácidos grasos (>1 % del total de ácidos grasos) de la harina de *U. lactuca*, detritos unicelulares, microencapsulados lipídicos y la combinación de microalgas (*C. calcitrans* e *I. galbana*, 1:1) utilizada en el bioensayo 1 se presenta en la Tabla 11.

En la harina de *U. lactuca* y en los detritos unicelulares predominaron los ácidos grasos saturados (AGS), siendo el ácido palmítico (16:0) el componente mayoritario en ambos casos. En contraste, los microencapsulados lipídicos presentaron una alta proporción de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), destacando el EPA (20:5n-3) y el DHA (22:6n-3).

La combinación de microalgas mostró un perfil intermedio, caracterizado por una mayor presencia de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA), con contenidos importantes de EPA y menores proporciones de DHA en comparación con los microencapsulados.

El contenido total de HUFA y ácidos grasos ω -3 fue considerablemente mayor en los microencapsulados lipídicos, los cuales también presentaron la mayor relación ω -3/ ω -6 entre los ingredientes evaluados.

Tabla 11. Composición de ácidos grasos (>1% del total) de harina de *U. lactuca*, detritos unicelulares, microesferas lipídicas y la combinación de microalgas (*C. calcitrans* e *I. galbana*) utilizadas en el bioensayo 1.

Ácidos grasos	Harina <i>Ulva lactuca</i>	Detritos unicelulares	Microencapsulados lipídicos	Microalgas 1:1
13:0	1.76 ± 0.07 ^b	2.38 ± 0.1 ^c	0 ^a	1 ± 0.15 ^a
14:0	1.69 ± 0.17 ^a	0.93 ± 0.03 ^a	0.03 ± 0.00 ^a	14.24 ± 0.53 ^b
16:0	31.49 ± 3.24 ^b	39.56 ± 2.12 ^c	0.22 ± 0.00 ^a	10.72 ± 0.35 ^a
16:1n-9	0.62 ± 0.06 ^b	1±0.08 ^c	0 ^a	0.06 ± 0.03 ^a
16:1n-7	4.6 ± 0.38 ^a	6.92 ± 1.45 ^a	0.21 ± 0.00 ^a	19.13±0.75 ^b
17:0	0.39 ± 0.09	0.25 ± 0.04	0.06 ± 0.00 ^a	3.95 ± 3.33
17:1n-8	8.98 ± 0.76 ^c	4.82 ± 0.04 ^b	0.02 ± 0.00 ^a	0.27±0.01 ^a
18:0	3.7 ± 1.21 ^b	2.04 ± 0.36 ^{ab}	3.16 ± 0.15 ^{bc}	1.14 ± 0.04 ^a
18:1n-9	1.67 ± 1.03 ^a	1.89 ± 0.03 ^a	5.19 ± 0.12 ^b	9.01 ± 0.12 ^b
18:1n-7	12.98 ± 0.57	17.88 ± 0.44	2.08 ± 0.05 ^a	1.23 ± 0.12
18:2n-6	3 ± 0.71	3.64 ± 0.11	0.74 ± 0.01	3.78 ± 0.28
18:3n-3	13.5 ± 1.14 ^c	9.14 ± 0.14 ^b	0.75 ± 0.01 ^a	7.13 ± 0.46 ^a
20:1n-9	0.34 ± 0.10 ^a	0.38 ± 0.01 ^a	2.40 ± 0.92 ^b	0.03 ± 0.00 ^a
20:4n-6	0.43 ± 0.03 ^b	0.18 ± 0.03 ^a	2.21 ± 0.04 ^d	1.03 ± 0.09 ^c
20:5n-3	0.69 ± 0.18 ^b	0.18 ± 0.01 ^a	37.43 ± 1.14 ^d	13.29 ± 0.17 ^c
22:0	4.11±0.41 ^b	4.3 ± 0.16 ^b	0.25 ± 0.01 ^a	0.60 ± 0.03 ^a
22:1n-11	0 ^a	0 ^a	2.76 ± 0.09 ^b	0 ^a
22:5n-6	3.36 ± 2.39	1.77 ± 0.02	0 ^a	0
22:5n-3	0 ^a	0 ^a	5.55 ± 0.38 ^b	0 ^a
22:6n-3	0.83 ± 0.73 ^a	0 ^a	32.71 ± 0.28 ^c	9.27 ± 0.83 ^b
24:1n-9	0 ^a	0 ^a	1 ± 0.03 ^b	0 ^a
Otros	5.82	2.96	3.23	4.08
ΣAGS	45.60 ± 2.50 ^b	50.56 ± 2.22 ^b	4.5 ± 0.21 ^a	33.02 ± 2.70 ^a
ΣMUFA	31.42 ± 0.90	33.69 ± 2.05	14.94 ± 0.80 ^a	30.98 ± 1.09
ΣPUFA	17.67 ± 1.56 ^b	13.63 ± 0.19 ^a	2.65 ± 0.05 ^a	12.30 ± 0.96 ^a
ΣHUFA	5.31 ± 1.99 ^b	2.12 ± 0.06 ^a	77.90 ± 0.80 ^d	23.69 ± 0.71 ^c
Σ ω-3	15.4 ± 0.28 ^b	9.77 ± 0.01 ^a	76.70 ± 0.80 ^d	29.86 ± 1.23 ^c
Σ ω-6	7.58 ± 2.79	5.98 ± 0.17	3.76 ± 0.07 ^a	6.13 ± 0.45
ω-3/ ω-6	2.27 ± 0.99 ^a	1.64 ± 0.05 ^a	20.40 ± 0.43 ^c	4.88 ± 1.57 ^b

Nota: Microalgas 1:1 = *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana*. Los valores se presentan como la media de tres réplicas ± DE. Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$).

7.4 Bioensayos de alimentación para determinar el efecto de la inclusión de los suplementos alimenticios en el acondicionamiento de reproductores de *Crassostrea gigas*

7.4.1 Ensayo preliminar de alimentación con detritos unicelulares y microesferas lipídicas

Después de 7 días del bioensayo preliminar, se realizaron los ajustes necesarios de flujo para la administración continua de la combinación 1:1 de microalgas y de los tratamientos experimentales (25% detritos, 25% microesferas y 12.5% detritos + 12.5% microesferas).

La supervivencia en los tres tratamientos fue del 100%. Se verificó la funcionalidad correcta de las bombas dosificadoras utilizadas para el suministro de los suplementos, garantizando las raciones cada hora durante 24 h. Asimismo, se observó el consumo y aceptabilidad de los suplementos en los tres tratamientos, sin detectar la presencia de pseudoheces.

7.4.2 Bioensayo 1 de alimentación con detritos unicelulares y microesferas lipídicas

Después de 59 días de alimentación, los tratamientos CTRL, M25 y CDM10 presentaron supervivencia del 100%, sin embargo, en los tratamientos D25 y DM25 se registraron eventos de mortalidad en los días 11 y 12 del bioensayo en una de las réplicas de cada tratamiento, lo que redujo la supervivencia a 69% y 91% respectivamente.

Los ostiones de todos los tratamientos alcanzaron longitudes finales entre 8 y 9 cm. Se encontraron diferencias significativas en la ganancia de peso (GP) y en el peso húmedo de los tejidos (biomasa) entre los tratamientos CTRL y D25, con 16.86% y 3.65%, y 18.66 g y 14.70 g de biomasa, respectivamente (Tabla 12).

Tabla 12. Supervivencia (S), longitud inicial (Li), longitud final (LF), peso vivo inicial (PVi), peso vivo final (PVf), ganancia de peso (GP) y biomasa (B) de *Crassostrea gigas* alimentado durante 59 días con los diferentes tratamientos.

	CTRL	D25	M25	DM25	CDM10
S (%)	100 ± 0	69 ± 27.62	100 ± 0	91 ± 10.15	100 ± 0
Li (cm)	9.25 ± 1.18	9.35 ± 0.97	9.78 ± 3.98	9.01 ± 0.92	9.02 ± 1.06
LF (cm)	9.64 ± 1.02	9.14 ± 0.64	8.92 ± 1.31	9.08 ± 0.96	9.07 ± 0.98
PVi (g)	94.79 ± 15.52	95.38 ± 18.89	88.8 ± 19.37	94.31 ± 22	93 ± 22.28
PVf (g)	110.55 ± 18.3	98.8 ± 16.06	99.8 ± 21.3	106.02 ± 21.47	102.14 ± 22.27
GP (%)	16.86 ± 7.13 ^b	3.65 ± 1.43 ^a	10.35 ± 1.66 ^{ab}	12.44 ± 0.62 ^{ab}	9.82 ± 1.59 ^{ab}
B (g)	18.66 ± 4.52 ^b	14.70 ± 3.87 ^a	15.13 ± 4.60 ^{ab}	18.37 ± 6.65 ^{ab}	17.74 ± 4.28 ^{ab}

Nota: CTRL= Control 100% microalgas 1:1, D25= 25% detritos y 75% combinación de microalgas 1:1, M25= 25% microesferas y 75% combinación de microalgas 1:1, DM25= 12.5% detritos, 12.5% microesferas y 75% combinación de microalgas 1:1, CDM10= Complemento: 100% combinación de microalgas 1:1 + 5% detritos y 5% microesferas.

7.4.3 Estadios reproductivos

En las Figuras 8 y 9 se muestran fotomicrográficas de secciones histológicas de gónada donde se observan los diferentes estadios de desarrollo gonadal de *C. gigas* identificados durante el experimento. A lo largo de las ocho semanas la presencia de machos fue más prominente (8:2 macho:hembra) (Fig. 10).

Los ostiones muestreados previo al inicio del bioensayo de alimentación se encontraron principalmente en el estadio 0 (E0) o indiferenciado y en el estadio I (EI) de gametogénesis temprana para machos o previtelogénesis para hembras (Fig. 11).

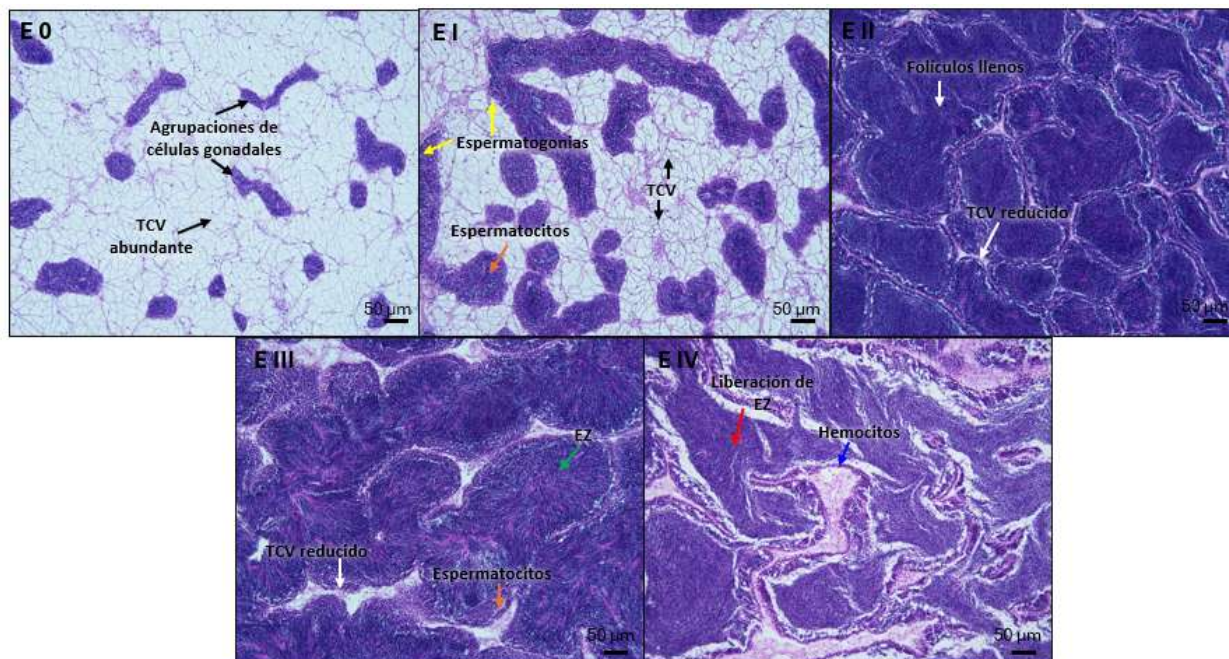


Figura 8. Estadios de desarrollo gonadal en machos de *C. gigas* identificados durante el bioensayo de alimentación. E0= indiferenciado, E1= gametogénesis temprana, E2= gametogénesis tardía, E3= maduración, E4= desove parcial. Fotomicrografías a 20×. EZ, espermatozoides; TCV, tejido conectivo vesicular.

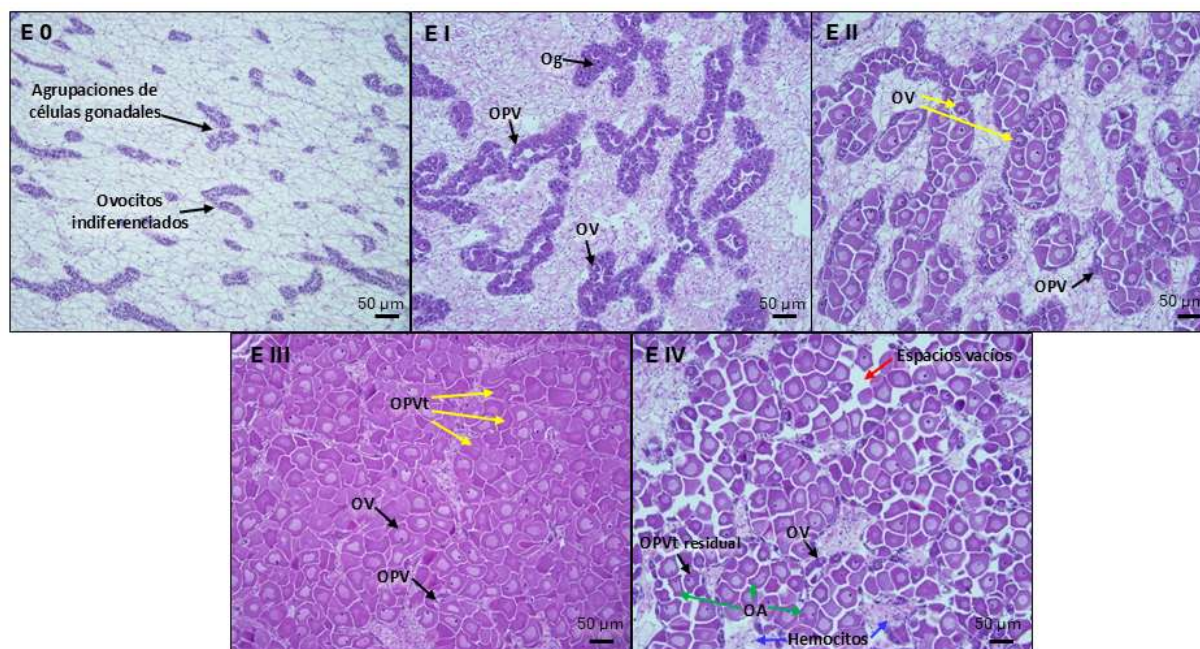


Figura 9. Estadios de desarrollo gonadal en hembras de *C. gigas* identificados durante el bioensayo de alimentación. E0= indiferenciado, E1= previtelógenesis, E2= vitelogénesis, E3= postvitelogénesis, E4= desove parcial. Fotomicrografías a 20×, barra de escala = 50 µm. OA, ovocito atrésico/degenerado; Og, oogonia; OPV, ovocito previtelogénico; OPVt, ovocito postvitelogénico; OV, ovocito vitelogénico.

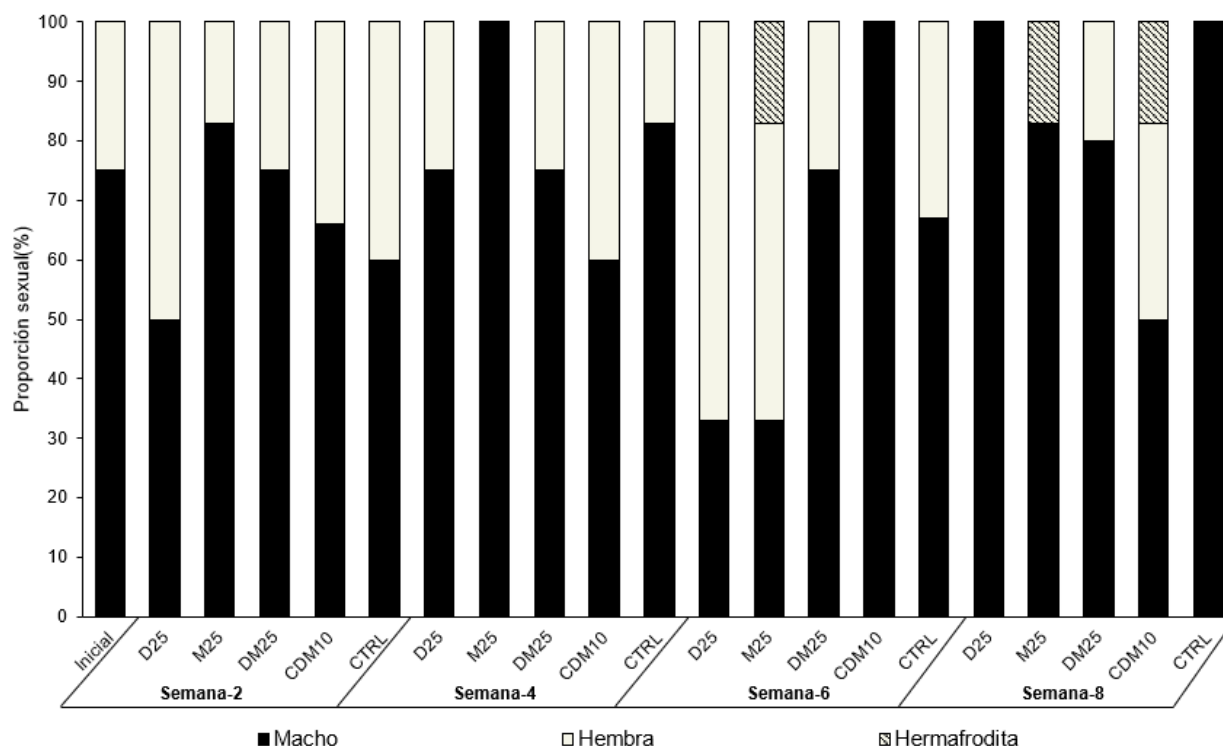


Figura 10. Proporción de sexos (%) determinada mediante histología en ostiones *C. gigas* acondicionados con diferentes regímenes alimenticios durante 8 semanas. Los tratamientos incluyeron: D25 (25 % de detritos + 75 % de mezcla de microalgas); M25 (25 % de microesferas lipídicas + 75 % de mezcla de microalgas); DM25 (12.5 % de detritos + 12.5 % de microesferas lipídicas + 75 % de mezcla de microalgas); CDM10 (100 % de mezcla de microalgas + 5 % de detritos + 5 % de microesferas lipídicas); CTRL (100 % de mezcla de microalgas). Las barras representan la proporción de machos (negro), hembras (blanco) y hermafroditas (rayado).

A partir de la segunda semana de alimentación con los diferentes tratamientos el 100 % de los machos de los tratamientos D25 y DM25 se encontraron en E1, mientras que en M25 el 80% se registró en E1 y el 20% en EII (gametogénesis tardía) (Fig. 12A). En los tratamientos CTRL y CDM10, el 30 y 50% de los machos, respectivamente, permanecieron en E0.

En el caso de las hembras, los organismos de CTRL, D25 y DM25 se encontraron en E0, mientras que en M25 el 100% alcanzó E1. Por su parte, en CDM10, el 50% de las hembras se encontró en EII, correspondiente a vitelogénesis (Fig. 12B).

Después de un mes de alimentación, se observaron machos en el estadio III (EIII) de maduración en los tratamientos D25, M25 y DM25 (20–30%). Además, en DM25 y CDM10, entre 30 y 50% de los organismos se encontraron en EIV (desove parcial).

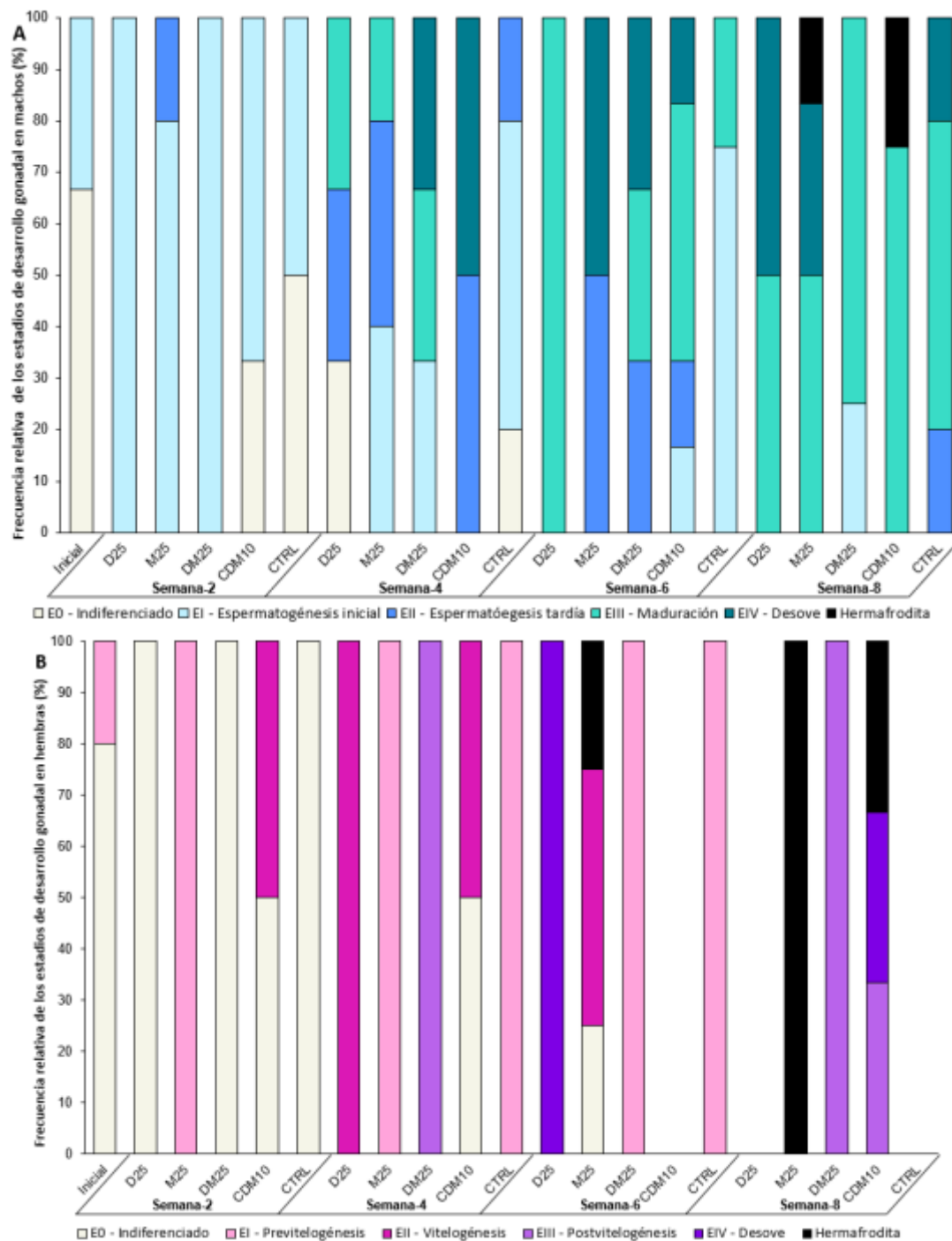


Figura 11. Frecuencia relativa (%) en machos (A) y hembras (B) de *C. gigas* sometidos a diferentes regímenes alimentarios durante la semana 8. D25: 25 % detritos + 75 % microalgas; M25: 25 % microesferas lipídicas + 75 % microalgas; DM25: 12.5 % detritos + 12.5 % microesferas lipídicas + 75 % microalgas; CDM10: 100 % microalgas + 5 % detritos + 5 % microesferas lipídicas; CTRL: 100 % microalgas. Estadios gonadales: EO = indiferenciado; EI = espermatogénesis inicial / previtelogénesis, EII = espermatogénesis tardía / vitelogénesis, EIII = maduración / postvitelogénesis; EIV = desove; Hermafrodita.

En las hembras, los tratamientos CTRL y M25 presentaron el 100% de los organismos en EI, mientras que D25 se registró 100% en EII. Únicamente en DM25 se observaron hembras en EIII, correspondiente a postvitelogénesis.

Para la sexta semana, en los tratamientos CTRL, D25, DM25 y CDM10 se encontraron machos en EIII (maduración), mientras que en M25, DM25 y CDM10 algunos organismos alcanzaron EIV (desove parcial). En el tratamiento CDM10 no se identificaron hembras durante el muestreo. Las hembras del tratamiento D25 presentaron EIV (desove parcial), en comparación con el resto de los tratamientos que presentaron estadios menos avanzados (E0, I y II).

En el muestreo final (octava semana), se encontraron machos en EIII (maduración) en todos los tratamientos, y EIV (desove parcial) en CTRL, D25 y M25. No se identificaron hembras en CTRL y D25 en este muestreo. En los tratamientos M25 y CDM10 se observaron ostiones hermafroditas, es decir, que contaban con presencia simultánea de gametos masculinos y femeninos en estadios tempranos de desarrollo (Fig. 12).

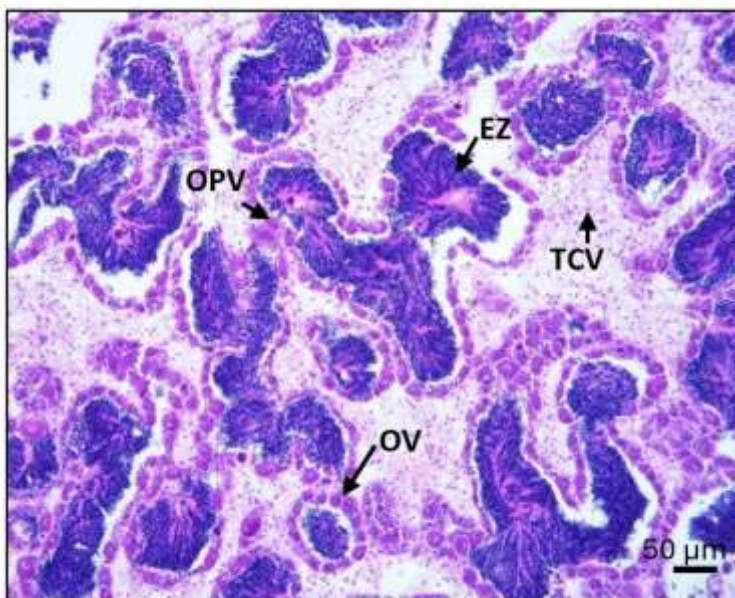


Figura 12. Fotomicrografía a 20x de sección histológica de gónada de organismo hermafrodita del tratamiento CDM10, después de 8 semanas de alimentación experimental. EZ, espermatozoide; OPV, ovocito previtelogénico; OV, ovocito vitelogénico; TCV, tejido conectivo vesicular.

7.4.4 Cobertura gonadal

Al inicio del bioensayo se observó un área de cobertura gonadal (ACG) del 17.32 ± 15.73 % en machos y del 8.16 ± 7.68 % en hembras. A partir de la semana 2, no fue posible determinar estadísticamente el ACG en hembras debido a la limitación en el número de muestras obtenidas.

En la semana 2, el ACG en machos fue mayor en los tratamientos M25 (23 ± 7.41 %), DM25 (20.56 ± 9.04 %) y CDM10 (19.04 ± 6.11 %) en comparación con el tratamiento control; sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$).

Para la semana 4, se registró un incremento en el ACG en todos los tratamientos, sin presentar diferencias significativas entre ellos. Los valores fueron mayores en D25 (63.7 ± 19.61 %) y DM25 (62.54 ± 19.38 %), seguidos por M25 (52.71 ± 4.69 %), CDM10 (42.52 ± 15.93 %) y el CTRL (41.68 ± 8.65 %).

En la semana 6, se observaron diferencias significativas, con valores mayores en D25 (83.56 ± 4.45 %), M25 (87.05 ± 4.82 %) y DM25 (84.48 ± 14.57 %) respecto al tratamiento control, en el cual se registró el porcentaje más bajo de ACG (37.83 ± 19.68 %).

Para el último muestreo (semana 8), se observó un incremento del ACG en D25 (89.86 ± 4.73 %), M25 (81.6 ± 11.27 %), CTRL (78.71 ± 11.82 %) y CDM10 (70.25 ± 11.68 %) en comparación con la semana 6, mientras que en DM25 se observó una disminución, con un ACG de 77.64 ± 10.7 %.

7.4.5 Composición bioquímica en músculo y gónada

En la Tabla 13 se presenta la composición bioquímica de músculo de *C. gigas* durante los diferentes muestreos del bioensayo.

El contenido inicial de carbohidratos fue de 25.4 ± 21.3 mg/g. En la semana 2, se observaron variaciones entre tratamientos, destacando valores menores en D25. Posteriormente, en las semanas 4 y 6, se registraron fluctuaciones sin un patrón definido. En la semana 8, se

observaron diferencias significativas, con valores mayores en D25 y M25 en comparación con CTRL, DM25 y CDM10.

El contenido inicial de glucógeno fue de 40.8 ± 45.4 mg/g, disminuyendo notablemente en la semana 2 en todos los tratamientos. Durante las semanas subsecuentes se observaron valores bajos y relativamente estables, con un incremento en la semana 8 en D25, donde se registraron los valores más altos y diferencias significativas respecto a DM25 y M25.

Para las proteínas, el valor inicial fue de 24.8 ± 13.1 mg/g. A partir de la semana 2, se observó una disminución en la mayoría de los tratamientos, con fluctuaciones en las semanas intermedias. En la semana 6, se registraron diferencias significativas, con valores menores en M25, DM25 y CDM10 en comparación con D25. En la semana 8, algunos tratamientos como DM25 y CDM10 mostraron una recuperación en el contenido proteico.

El contenido inicial de lípidos totales fue de 30.8 ± 26.39 mg/g. Durante el bioensayo, se observaron valores relativamente bajos en todos los tratamientos; con una tendencia general a la disminución hacia las semanas finales. En la semana 4 se detectaron diferencias significativas, con valores mayores en D25 (32.6 ± 10.1^b) en comparación con CDM10 (3.3 ± 3.9^a). En la semana 8, los valores fueron mínimos o nulos en varios tratamientos.

El análisis de la composición bioquímica de la gónada mostró una respuesta variable entre los diferentes regímenes nutricionales, siendo los lípidos totales el compuesto predominante, seguido por carbohidratos, glucógeno y proteínas (Tabla 14).

En el caso de los carbohidratos, durante la semana 2 se observaron valores más bajos en comparación con el contenido inicial, seguidos de un aumento en las semanas 4 y 6, y una disminución significativa en la semana 8 en todos los tratamientos.

El contenido de glucógeno presentó valores reducidos en la semana 2 en los tratamientos D25, M25, DM25 y CDM10. Posteriormente, en D25 hubo un aumento en la semana 4 (18.21 ± 13.22

mg/g), manteniéndose en niveles altos hasta la semana 8 (26.88 ± 17.80 mg/g). En este último muestreo se registraron los valores más altos en D25, M25 y CDM10.

Para las proteínas, se observó una disminución general a partir de la semana 2 en todos los tratamientos. Sin embargo, en la semana 6 se registraron diferencias significativas, con valores mayores en M25 entre los tratamientos D25 y control (2.25 ± 0.83 mg/g y 6.41 ± 3.03 mg/g), respectivamente. En la semana 8, el tratamiento M25 presentó valores superiores respecto a CTRL.

El contenido inicial de lípidos totales fue de 305.46 ± 93.95 mg/g, representando el valor más alto observado. Durante la semana 2 se observó una disminución marcada en todos los tratamientos, con diferencias significativas entre D25 (63.13 ± 19.83 mg/g) y CDM10 (211.75 ± 110.69 mg/g). Posteriormente en las semanas 4 y 6 se observó una tendencia ascendente en el contenido lipídico en todos los tratamientos, seguida de una disminución en la semana 8, con diferencias destacadas entre los tratamientos M25 (171 ± 103.29 mg/g) y CDM10 (0 mg/g).

Tabla 13. Composición bioquímica (media $\pm$ DE) en músculo de *C. gigas* alimentado con los diferentes tratamientos durante los muestreos.

	Semanas	CTRL	D25	M25	DM25	CDM10
Lípidos totales (mg/g)	2	19.1 $\pm$ 24.9	15.6 $\pm$ 13.2	10.0 $\pm$ 5.0	12.5 $\pm$ 10.8	19.9 $\pm$ 18.5
	4	15.1 $\pm$ 13.6 ^{ab}	32.6 $\pm$ 10.1 ^b	14.6 $\pm$ 6.8 ^{ab}	20.3 $\pm$ 9.5 ^{ab}	3.3 $\pm$ 3.9 ^a
	6	15.8 $\pm$ 22.3	15.3 $\pm$ 13.6	3.9 $\pm$ 3.3	9.2 $\pm$ 11.4	0.0
	8	0.0	2.8 $\pm$ 4.0	8.5 $\pm$ 10.6	21.1 $\pm$ 25.3	0.0
Carbohidratos (mg/g)	2	39.2 $\pm$ 30.2	12.5 $\pm$ 9.4	28.6 $\pm$ 11.3	22.7 $\pm$ 5.0	19.7 $\pm$ 11.0
	4	25.2 $\pm$ 8.9	27.9 $\pm$ 3.4	18.2 $\pm$ 6.5	32.2 $\pm$ 14.1	19.8 $\pm$ 6.3
	6	32.3 $\pm$ 26.0	49.2 $\pm$ 45.9	20.6 $\pm$ 7.1	22.2 $\pm$ 4.3	21.1 $\pm$ 3.9
	8	25.0 $\pm$ 4.7	24.1 $\pm$ 17.2	22.0 $\pm$ 9.3	20.1 $\pm$ 8.5	26.0 $\pm$ 4.4
Glucógeno (mg/g)	2	5.4 $\pm$ 3.45	8.5 $\pm$ 5.4	14.4 $\pm$ 5.4	6.6 $\pm$ 2.7	7.6 $\pm$ 3.5
	4	12.2 $\pm$ 7.0	12.9 $\pm$ 3.7	7.8 $\pm$ 3.5	17.5 $\pm$ 6.1	9.2 $\pm$ 3.5
	6	7.7 $\pm$ 2.0	10.7 $\pm$ 6.3	10.3 $\pm$ 7.4	11.0 $\pm$ 1.9	8.8 $\pm$ 2.2
	8	10.6 $\pm$ 3.0 ^{ab}	24.4 $\pm$ 11.7 ^b	5.4 $\pm$ 5.3 ^b	3.8 $\pm$ 0.7 ^a	15.9 $\pm$ 9.4 ^{ab}
Proteínas (mg/g)	2	10.6 $\pm$ 12.9	7.5 $\pm$ 9.3	18.3 $\pm$ 10.2	13.5 $\pm$ 3.4	20.3 $\pm$ 7.8
	4	17.3 $\pm$ 5.6	19.0 $\pm$ 4.7	15.01 $\pm$ 6.0	27.2 $\pm$ 18.7	26.2 $\pm$ 24.0
	6	15.8 $\pm$ 22.3 ^a	15.3 $\pm$ 13.6 ^b	9.7 $\pm$ 1.4 ^a	9.2 $\pm$ 11.4 ^a	7.9 $\pm$ 3.0 ^a
	8	6.7 $\pm$ 2.1	8.2 $\pm$ 4.8	9.0 $\pm$ 4.3	21.0 $\pm$ 11.8	19.0 $\pm$ 7.4

Nota: CTRL= 100% microalgas 1:1, D25= 25% detritos y 75% microalgas 1:1, M25= 25% microesferas y 75% microalgas 1:1, DM25= 12.5% detritos, 12.5% microesferas y 75% microalgas 1:1, CDM10= Complemento: 100% microalgas 1:1 + 5% detritos y 5% microesferas. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos en la misma semana de muestreo ($p < 0.05$).

Tabla 14. Composición bioquímica (media $\pm$ DE) en gónada de *C. gigas* alimentado con los diferentes tratamientos durante los muestreos.

	Semanas	CTRL	D25	M25	DM25	CDM10
Lípidos totales (mg/g)	2	154.2 $\pm$ 33.9	72.4 $\pm$ 8.5	164.1 $\pm$ 57	160.2 $\pm$ 35.6	151.1 $\pm$ 57.9
	4	206 $\pm$ 38.3 ^a	244.1 $\pm$ 26.1 ^a	323.9 $\pm$ 16.5 ^b	258.2 $\pm$ 15.4 ^a	220.2 $\pm$ 18.5 ^a
	6	176.9 $\pm$ 10	182.1 $\pm$ 2.7	280.5 $\pm$ 12.9	209.1 $\pm$ 11.7	212.7 $\pm$ 69
	8	111.2 $\pm$ 1.5 ^a	228.6 $\pm$ 37.9 ^b	220.7 $\pm$ 26.6 ^b	167.2 $\pm$ 19.9 ^{ab}	124.6 $\pm$ 13.8 ^a
Carbohidratos (mg/g)	2	86.5 $\pm$ 0.2 ^a	87.2 $\pm$ 1.8 ^a	155.8 $\pm$ 23.4 ^{ab}	209.8 $\pm$ 65.7 ^{ab}	267.4 $\pm$ 20.7 ^b
	4	319.4 $\pm$ 50.9 ^{ab}	306.3 $\pm$ 46.6 ^a	417.4 $\pm$ 78.6 ^{ab}	324.4 $\pm$ 27 ^b	335 $\pm$ 88.8 ^{ab}
	6	284.6 $\pm$ 4.2 ^{ab}	205.8 $\pm$ 44.1 ^a	277.2 $\pm$ 49.7 ^{ab}	360.1 $\pm$ 50.8 ^b	287.8 $\pm$ 10.2 ^{ab}
	8	23.2 $\pm$ 7.4 ^a	66 $\pm$ 15 ^b	57.3 $\pm$ 2.8 ^b	27.8 $\pm$ 8.6 ^a	28.2 $\pm$ 0.9 ^a
Glucógeno (mg/g)	2	26 $\pm$ 1	16.3 $\pm$ 7.8	26.2 $\pm$ 10.3	12.3 $\pm$ 1.2	18 $\pm$ 2.2
	4	23 $\pm$ 4.5 ^{ab}	49.3 $\pm$ 22.9 ^b	28.8 $\pm$ 8.8 ^{ab}	16.1 $\pm$ 2.9 ^a	14 $\pm$ 4.3 ^a
	6	12.8 $\pm$ 2.1 ^{ab}	11.4 $\pm$ 3.8 ^{ab}	10 $\pm$ 1.4 ^a	16.7 $\pm$ 2.1 ^b	9.1 $\pm$ 0.9 ^a
	8	7.5 $\pm$ 5.3 ^a	37.5 $\pm$ 3.9 ^b	37.5 $\pm$ 3 ^b	8.9 $\pm$ 2.1 ^a	27.4 $\pm$ 5.2 ^b
Proteínas (mg/g)	2	4.6 $\pm$ 0.8	2.8 $\pm$ 0.2	5.6 $\pm$ 4.7	4.1 $\pm$ 1.4	5.5 $\pm$ 1.4
	4	8 $\pm$ 1.1	8.7 $\pm$ 2.5	12.1 $\pm$ 0.6	11.6 $\pm$ 3	9.8 $\pm$ 2
	6	10.6 $\pm$ 1.6 ^{ab}	9.2 $\pm$ 0.0 ^a	13.2 $\pm$ 1.5 ^b	11.5 $\pm$ 0.7 ^{ab}	11.6 $\pm$ 1.3 ^{ab}
	8	5.6 $\pm$ 2.4	8.7 $\pm$ 2.6	8.6 $\pm$ 1.1	8.5 $\pm$ 1.6	5.8 $\pm$ 0.7

Nota: CTRL= 100% microalgas 1:1, D25= 25% detritos y 75% microalgas 1:1, M25= 25% microesferas y 75% microalgas 1:1, DM25= 12.5% detritos, 12.5% microesferas y 75% microalgas 1:1, CDM10= Complemento: 100% microalgas 1:1 + 5% detritos y 5% microesferas. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos en la misma semana de muestreo ($p < 0.05$).

7.4.6 Fecundidad y cultivo de embriones de Bioensayo

Los recuentos de huevos fecundados mostraron diferencias entre tratamientos (Tabla 15).

El mayor número se registró en el tratamiento DM25, seguido D25, mientras que el tratamiento CTRL presentó la menor fecundación.

Para el análisis de desarrollo embrionario, se manejó la densidad aproximada de 5 larvas/mL en cada tanque de 200 L. A las 24 h post-fecundación, en todos los tratamientos se observaron larvas tipo D (D-veliger) (Fig. 13).

Tabla 15. Número de huevos fecundados de *C. gigas* alimentados con los diferentes tratamientos, previo al cultivo embrionario.

Tratamientos	Número de huevos fecundados (huevos/mL)
CTRL	397
D25	809
M25	467
DM25	2,234
CDM10	568

Nota: CTRL = 100% combinación de microalgas 1:1, D25 = 25% detritos y 75% combinación de microalgas 1:1, M25 = 25% microesferas y 75% combinación de microalgas 1:1, DM25 = 12.5% detritos, 12.5% microesferas y 75% combinación de microalgas 1:1, CDM10 = Complemento: 100% combinación de microalgas 1:1 + 5% detritos y 5% microesferas.

El número de organismos en cada estadio embrionario mostró diferencias entre tratamientos (Tabla 16). En la etapa de blástula, el tratamiento CTRL presentó los valores más altos (3.2 ± 0.52 larvas/mL), mientras que en los demás tratamientos los valores fueron cercanos a cero. En la fase de trocófora, CTRL y M25 mostraron valores significativamente mayores (3.73 ± 0.30 y 1.87 ± 0.46 , respectivamente) en comparación con el resto de los tratamientos.

En contraste, en la etapa de larva D, se observaron valores significativamente más altos en los tratamientos M25, DM25 y CDM10, en comparación con CTRL. El tratamiento D25 presentó valores intermedios.



Figura 13. Fotomicrografía a 10× de larvas D-veliger obtenidas después de 24 h de la fecundación.

Tabla 16. Número de embriones en estadios blástula, trocófora y larva D obtenidos de la fecundación de *C. gigas* alimentado con los diferentes tratamientos, expresado en número de embriones o larvas por mililitro.

Tratamientos	Desarrollo embrionario (larvas/mL)		
	Blástula	Trocófora	Larva D
CTRL	3.2 ± 0.52^b	3.73 ± 0.30^c	0.66 ± 0.61^a
D25	0.03 ± 0.05^a	0.26 ± 0.25^a	2.33 ± 0.40^b
M25	0.0 ± 0.0^a	1.87 ± 0.46^b	5.46 ± 0.41^c
DM25	0.0 ± 0.0^a	0.07 ± 0.05^a	5.2 ± 0.43^c
CDM10	0.0 ± 0.0^a	0.13 ± 0.05^a	4.4 ± 0.4^c

Nota: CTRL= 100% microalgas 1:1, D25 = 25% detritos y 75% combinación de microalgas 1:1, M25 = 25% microesferas y 75% combinación de microalgas 1:1, DM25 = 12.5% detritos, 12.5% microesferas y 75% combinación de microalgas 1:1, CDM10 = Complemento: 100% combinación de microalgas 1:1 + 5% detritos y 5% microesferas.

7.4.7 Bioensayo 2 para evaluar el efecto de la combinación de detritos unicelulares y microesferas lipídicas fuera de la época reproductiva

Después de 52 días de alimentación, ambos tratamientos presentaron altas tasas de supervivencia, con valores de 100% en el tratamiento Control y 99.4% en el tratamiento Suplementos.

Los ostiones alcanzaron una longitud final similar (8.5–8.6 cm) en ambos tratamientos. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el peso final, la ganancia de peso ni en el peso húmedo de los tejidos (biomasa) entre los tratamientos evaluados (Tabla 17). En conjunto, estos resultados indican que la inclusión de detritos unicelulares y microesferas lipídicas como suplemento no afecta negativamente el desempeño productivo de *C. gigas* en condiciones fuera de la época reproductiva.

Tabla 17. Supervivencia (S), longitud inicial (Li), longitud final (LF), peso vivo inicial (PVi), peso vivo final (PVf), ganancia de peso (GP), biomasa inicial (Bi) y biomasa final (BF) de *C. gigas* alimentado durante 52 días con los diferentes tratamientos.

	Control	Suplementos
Supervivencia (%)	100 ± 0.0	99.4 ± 1.1
Li (cm)	8.5 ± 0.9	8.5 ± 0.9
LF (cm)	8.7 ± 1.0	8.6 ± 1.2
PVi (g)	89.9 ± 24.6	89.9 ± 24.6
PVf (g)	98.3 ± 21.6	95.3 ± 37.2
GP (%)	9.3 ± 9.1	6.0 ± 0.3
Bi(g)	15.5 ± 6.2	15.5 ± 6.2
BF (g)	19.2 ± 5.4	19.4 ± 7.9

7.4.8 Estadios reproductivos y cobertura gonadal

En las secciones histológicas analizadas de los organismos recolectados durante el bioensayo realizado posterior a la época reproductiva, no se observó desarrollo de tejido gonadal. En su lugar, se identificó únicamente tejido conectivo vesicular en la región donde normalmente se localiza la gónada.

En el muestreo inicial, se observaron productos sexuales residuales de machos y hembras dispersos en el tejido conectivo (Fig. 14), lo que indica un estado posterior al desove.

Este hallazgo fue consistente en todos los organismos analizados, tanto del tratamiento Control como Suplementos.

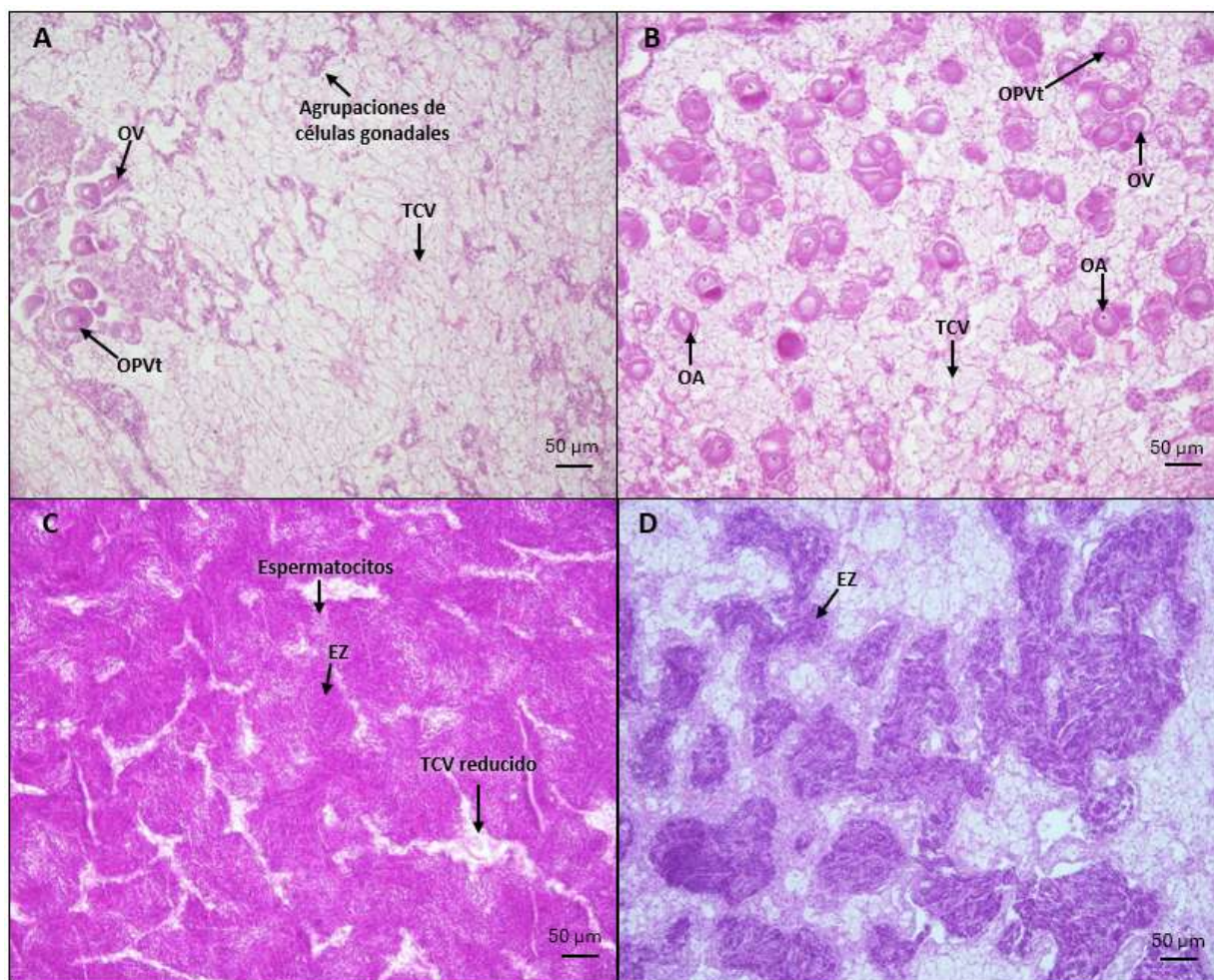


Figura 14. Fotomicrografía (20×) de secciones histológicas de la gónada de *C. gigas*, donde se observan gametos residuales en organismos correspondientes al muestreo inicial del bioensayo de alimentación realizado posterior a la época reproductiva. A y B = hembras postdesove; C = macho maduro; D = macho post desove. EZ, espermatozoides; OA, ovocito atrésico/degenerado; OPVt, ovocito postvitelogénico; OV, ovocito vitelogénico; TCV, tejido conectivo vesicular.

7.4.9 Contenido histoquímico

Mediante análisis histológico a 40×, se identificaron estructuras correspondientes a gónada, tejido conectivo vesicular y glándula digestiva.

Las secciones teñidas con Ácido Periódico de Schiff – Azul Alciano (PAS-AB) permitieron evidenciar la presencia de carbohidratos neutros, observados en color magenta (Fig 15 y Fig. 16). Por otro lado, la tinción con Sudán Negro permitió identificar lípidos de reserva, distinguiendo triglicéridos con tonalidades negro-azuladas y fosfolípido en gris (Fig. 17 y 18).

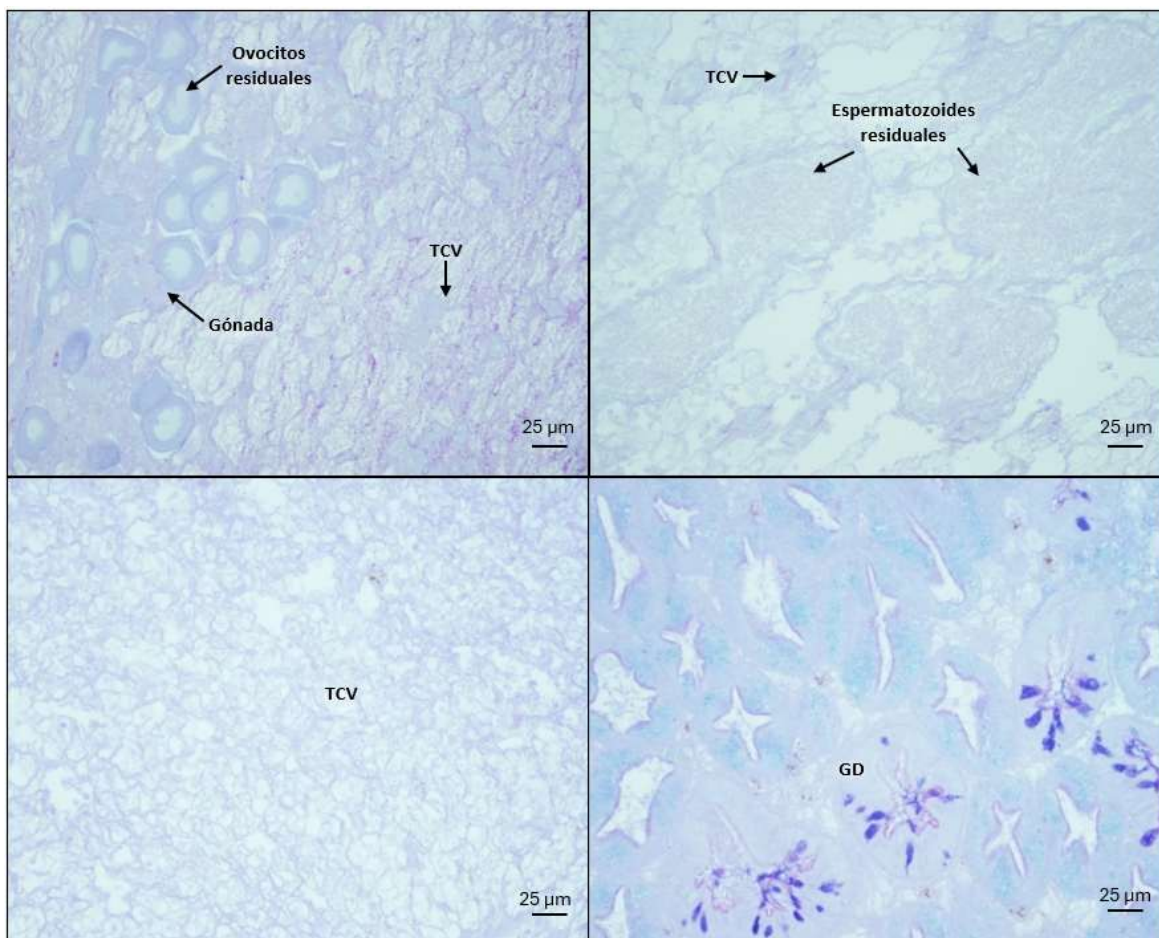


Figura 15. Fotomicrografías (40×) de secciones histológicas de *C. gigas*, correspondientes al muestreo inicial del bioensayo posterior a la época reproductiva. Se observan estructuras de gónada, tejido conectivo vesicular (TCV) y glándula digestiva (GD). Las secciones fueron teñidas con Ácido Periódico de Schiff-Azul Alciano (PAS-AB) para la detección de carbohidratos neutros (color magenta).

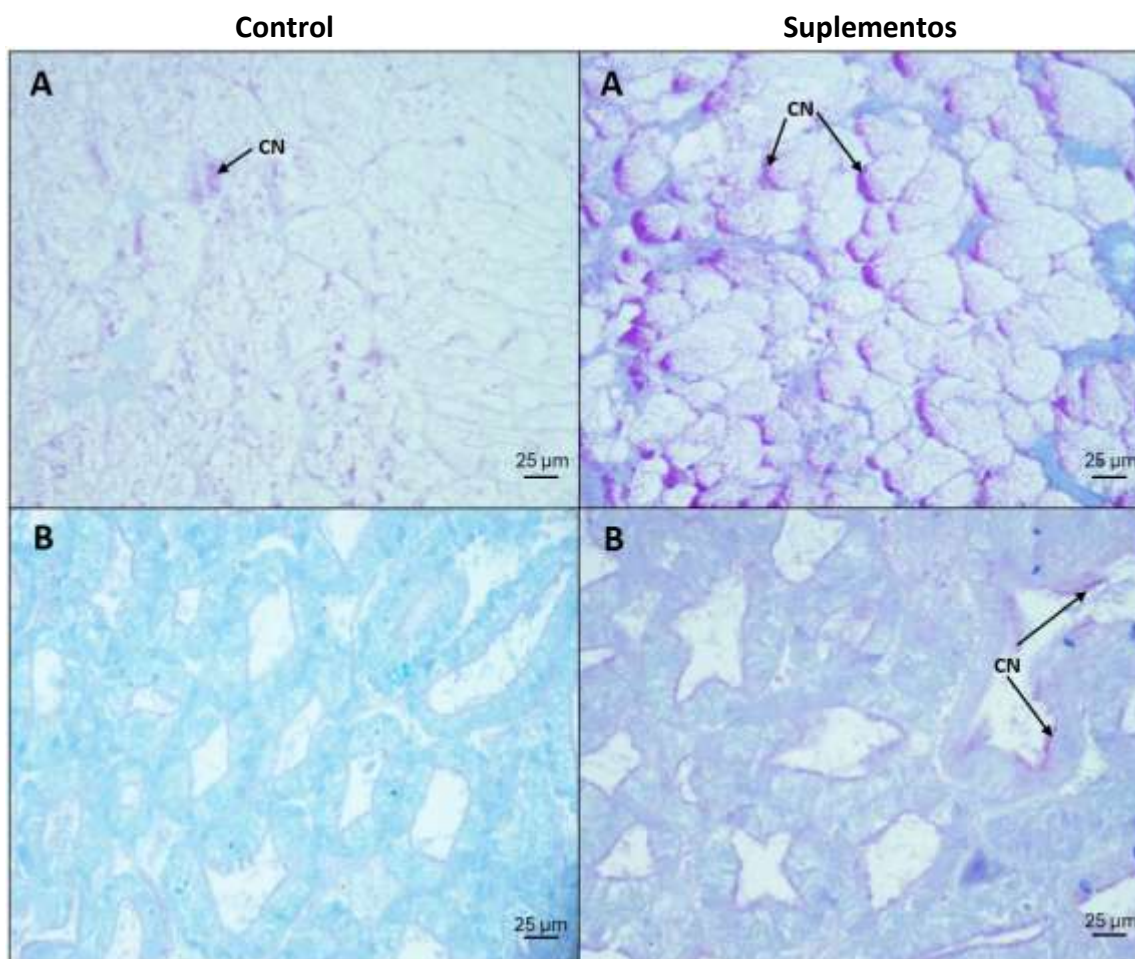


Figura 16. Fotomicrografías (40×) de secciones histológicas de *C. gigas*, correspondientes al muestreo final del tratamiento Control y del tratamiento Suplementos del bioensayo posterior a la época reproductiva. Se observan estructuras de tejido conectivo vesicular (A) y glándula digestiva (B). Las secciones fueron teñidas con Ácido Periódico de Schiff-Azul Alciano (PAS-AB) para la detección de carbohidratos neutros (CN) en color magenta.

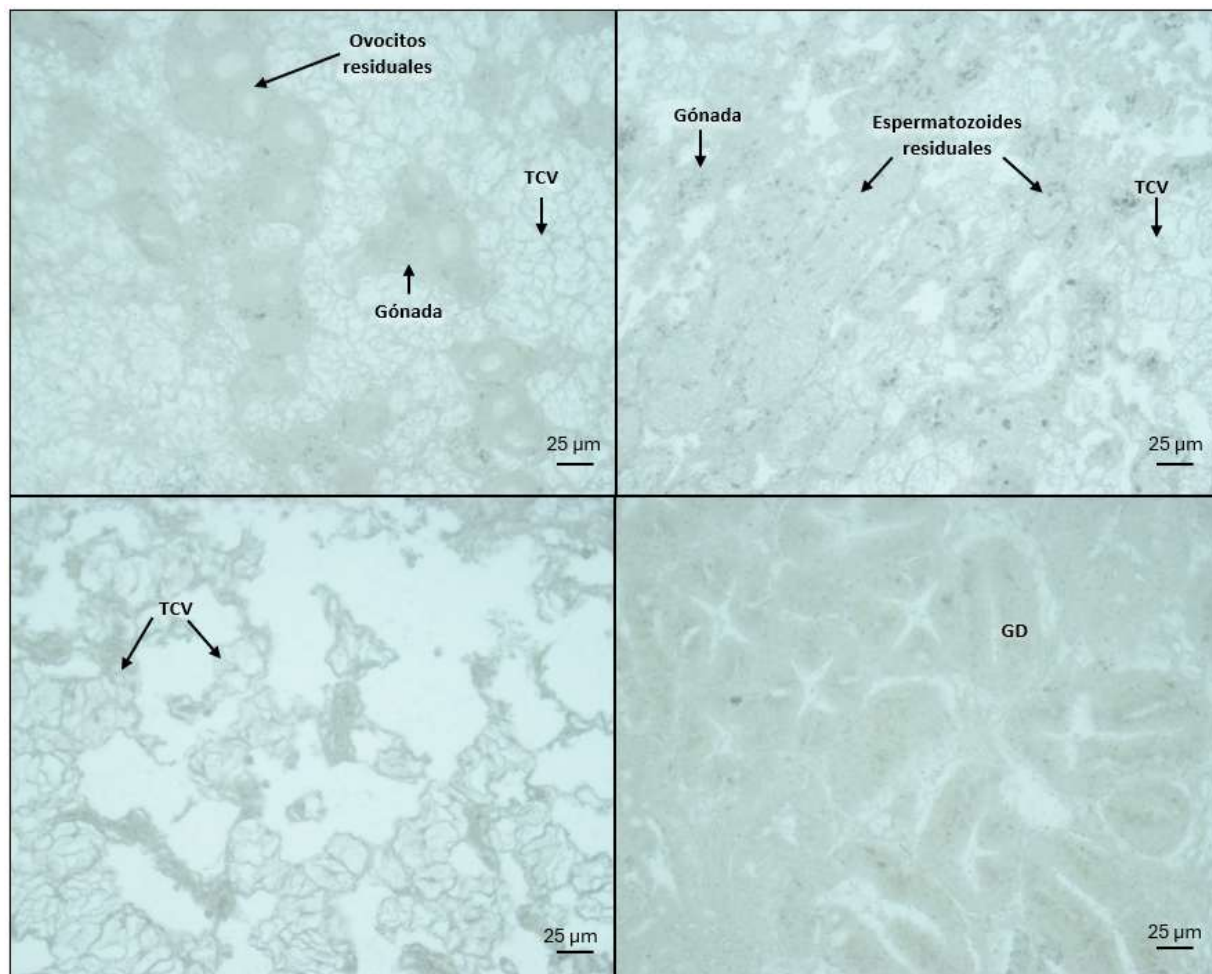


Figura 17. Fotomicrografías (40×) de secciones histológicas de *Crassostrea gigas*, correspondientes al muestreo inicial del bioensayo posterior a la época reproductiva. Se observan estructuras de gónada, tejido conectivo vesicular y glándula digestiva. Las secciones fueron teñidas con Sudán Negro para la detección de lípidos (triglicéridos en tonalidades negro-azulado y fosfolípidos en gris).

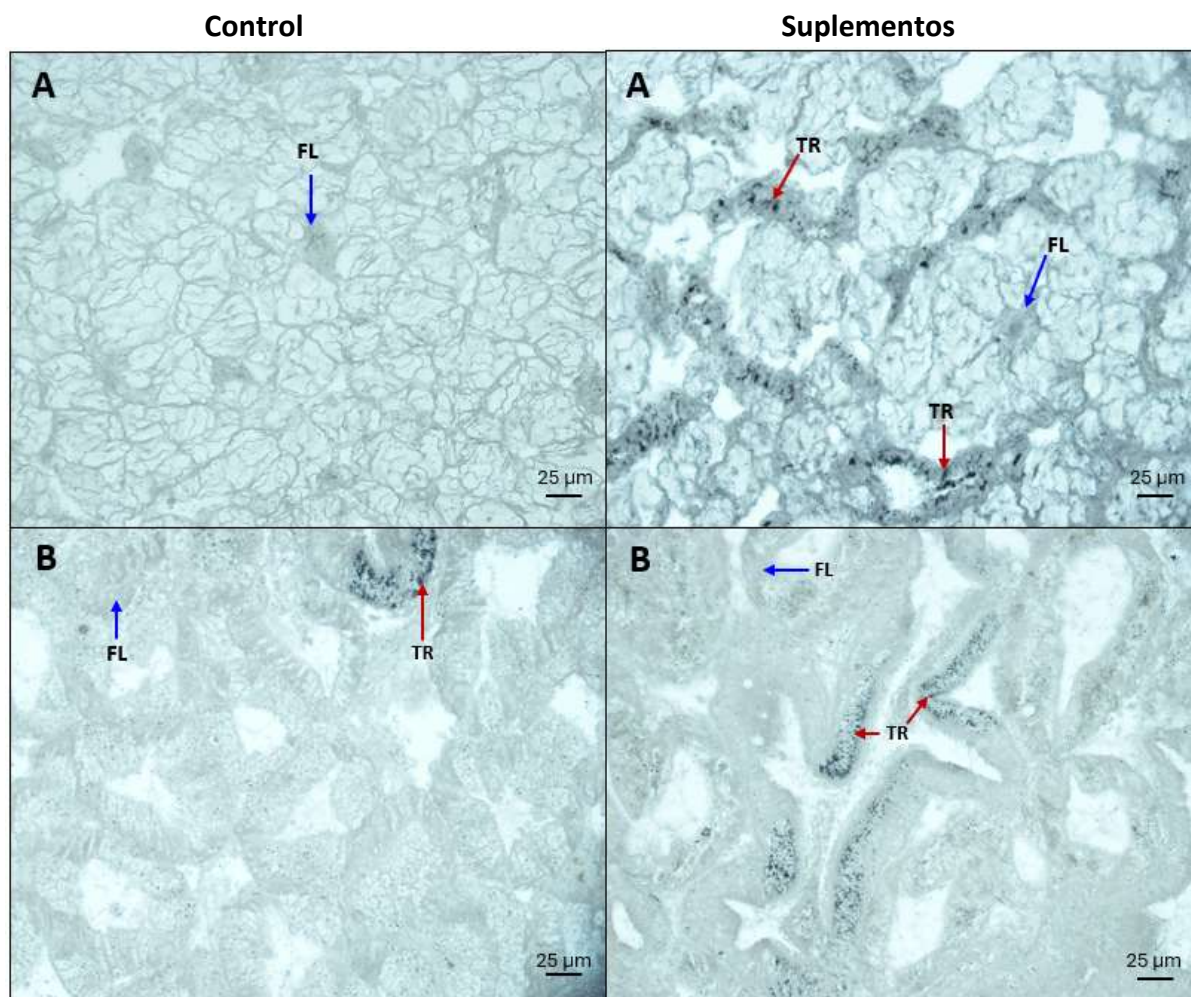


Figura 18. Fotomicrografías (40×) de secciones histológicas de *C. gigas*, correspondientes al muestreo final del tratamiento Control y del tratamiento Suplementos del bioensayo posterior a la época reproductiva. Se observan estructuras de tejido conectivo vesicular (A) y glándula digestiva (B). Las secciones fueron teñidas con Sudán Negro para la detección de lípidos, triglicéridos (TR) en tonalidades negro-azulado y fosfolípidos (FL) en gris.

7.4.9.1 Contenido histoquímico en tejido conectivo vesicular

El contenido histoquímico de carbohidratos, triglicéridos y fosfolípidos en el tejido conectivo vesicular durante el periodo experimental se presenta en la Tabla 18.

Se observaron diferencias significativas entre tratamientos en el contenido de triglicéridos y carbohidratos (prueba de Mann–Whitney, $p < 0.001$). En particular, el contenido de triglicéridos fue mayor en el tratamiento Suplementos, con diferencias significativas en los días 40 y 52 de muestreo ($p < 0.001$). De manera similar, los carbohidratos presentaron valores más altos en

Suplementos, mostrando diferencias significativas en el día 52 ($p < 0.001$). De manera similar, los carbohidratos de Suplementos fueron mayores, con diferencia significativa ($p < 0.001$) en el día 52.

En contraste, el contenido de fosfolípidos no mostró diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los días de muestreo ($p > 0.05$).

Durante el análisis histológico del tejido gonadal no se observó formación de gónada; en su lugar, el tejido correspondió predominantemente a tejido conectivo vesicular, caracterizado por la presencia de vesículas de almacenamiento distribuidas en la matriz conectiva.

Tabla 18. Contenido histoquímico (%) de carbohidratos neutros, triglicéridos y fosfolípidos en tejido conectivo vesicular de *Crassostrea gigas* durante el periodo experimental. Los valores corresponden a media $\pm$ desviación estándar. Diferencias significativas entre tratamientos se evaluaron mediante la prueba de Mann–Whitney U para carbohidratos y triglicéridos y ANOVA de dos vías para fosfolípidos ($p < 0.05$).

Día	Tratamiento	n	Carbohidratos (%)	Triglicéridos (%)	Fosfolípidos (%)
	Inicial	95	3.47 $\pm$ 3.13	1.72 $\pm$ 1.87	79.25 $\pm$ 9.44
28	Control	60	0.53 $\pm$ 0.99	8.76 $\pm$ 10.8	79.2 $\pm$ 6.83
	Suplementos	60	2.04 $\pm$ 2.74	9.76 $\pm$ 7.27	74.9 $\pm$ 7.27
40	Control	60	1.89 $\pm$ 2.54	2.0 $\pm$ 1.60 ^a	76.8 $\pm$ 6.78
	Suplementos	60	2.14 $\pm$ 2.31	9.69 $\pm$ 7.27 ^b	77.1 $\pm$ 7.15
52	Control	105	2.82 $\pm$ 3.4 ^a	5.55 $\pm$ 3.16 ^a	75.7 $\pm$ 5.64
	Suplementos	105	7.15 $\pm$ 5.15 ^b	9.06 $\pm$ 4.95 ^b	74.3 $\pm$ 7.15

Nota: Para triglicéridos se observaron diferencias significativas entre tratamientos en los días 40 y 52 ($p < 0.05$). Para carbohidratos se observaron diferencias significativas únicamente en el día 52 ($p < 0.05$). El contenido de fosfolípidos no presentó diferencias significativas entre tratamientos ni entre días (ANOVA de dos vías, $p > 0.05$).

7.4.9.2 Contenido histoquímico en glándula digestiva

El contenido histoquímico de carbohidratos, triglicéridos y fosfolípidos en glándula digestiva durante el periodo experimental se presenta en la Tabla 19.

Para los triglicéridos, se observaron diferencias significativas entre tratamientos al considerar el total del periodo experimental ($p < 0.001$), con valores mayores en el tratamiento Suplementos en comparación con el Control. A nivel temporal, no se detectaron diferencias significativas en el día 28 ($p = 0.083$); sin embargo, en los días 40 ($p < 0.001$) y 52 ($p < 0.001$) se observaron valores significativamente mayores en Suplementos.

En el caso de los carbohidratos, también se observaron diferencias significativas entre tratamientos al considerar el total del periodo ($p < 0.001$), con valores más altos en el tratamiento Suplementos. Por día de muestreo, no se detectaron diferencias significativas en los días 28 ($p = 0.078$) y 40 ($p = 0.126$); mientras que en el día 52 se registraron valores significativamente mayores en Suplementos ($7.38 \pm 5.05 \%$, $p < 0.001$).

Para los fosfolípidos, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0.136$), ni entre días de muestreo ($p = 0.056$), y tampoco se detectó una interacción significativa entre ambos factores ($p = 0.132$).

Tabla 19. Contenido histoquímico (%) de carbohidratos neutros, triglicéridos y fosfolípidos en glándula digestiva de *C. gigas* durante el periodo experimental. Los valores corresponden a media $\pm$ desviación estándar. Diferencias significativas entre tratamientos se evaluaron mediante la prueba de Mann–Whitney U ($p < 0.05$).

Día	Tratamiento	n	Carbohidratos (%)	Triglicéridos (%)	Fosfolípidos (%)
	Inicial	95	0.88 ± 1.27	3.47 ± 3.65	45.97 ± 15.19
28	Control	60	0.53 ± 0.98^a	4.08 ± 3.32^a	44.3 ± 12.4
	Suplementos	60	2.13 ± 2.79^b	10.0 ± 5.79^b	64.9 ± 11.2
40	Control	60	1.62 ± 2.11^a	3.09 ± 2.34^a	47.4 ± 12.4
	Suplementos	60	2.21 ± 2.32^b	8.22 ± 4.47^b	58.2 ± 11.5
52	Control	90	2.24 ± 2.57^a	5.33 ± 4.62^a	54.3 ± 12.1
	Suplementos	90	7.38 ± 5.05^b	15.6 ± 4.26^b	57.3 ± 12.6

Nota: Para triglicéridos y carbohidratos se observaron diferencias significativas entre tratamientos en los días 28, 40 y 52 ($p < 0.05$). El contenido de fosfolípidos no presentó diferencias significativas entre tratamientos ni entre días (ANOVA de dos vías, $p > 0.05$).

7.4.10 Actividad enzimática digestiva

La actividad enzimática digestiva en la glándula digestiva no presentó diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($p > 0.05$) (Tabla 20).

El contenido de proteína total presentó fue similar entre tratamientos, con promedios de 23.58 mg/mL en el grupo Control y 25.33 mg/mL en Suplementos ($p > 0.05$).

De manera similar, la actividad específica de tripsina, quimotripsina, lipasa y amilasa no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). Aunque la actividad promedio de tripsina fue mayor en el tratamiento con suplemento, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Tabla 20. Actividad de enzimas digestivas en la glándula digestiva de *C. gigas* bajo los tratamientos Control y Suplementos. Los valores corresponden a media $\pm$ desviación estándar.

Actividad Específica	Control	Suplementos	<i>p</i>
Tripsina (U/mg)	0.18 $\pm$ 0.17	0.87 $\pm$ 1.13	0.28
Quimotripsina (U/mg)	5.24 $\pm$ 2	5.52 $\pm$ 1.73	0.72
Lipasa (U/mg)	2.00 $\pm$ 1.53	1.87 $\pm$ 0.53	0.80
Amilasa (U/mg)	0.007 $\pm$ 0.004	0.007 $\pm$ 0.002	0.50

Nota: Las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante prueba t de Student o prueba de Mann–Whitney U, dependiendo del cumplimiento del supuesto de normalidad ($p < 0.05$).

7.4.11 Caracterización de las comunidades bacterianas

El análisis de las secuencias del gen 16S rRNA permitió identificar 1669 variantes de secuencia de amplicón (ASVs) en las muestras analizadas, las cuales se clasificaron en 24 filos, 39 clases, 97 órdenes, 128 familias y 236 géneros bacterianos, evidenciando una elevada diversidad microbiana.

7.4.11.1 Diversidad Alfa

La diversidad alfa se evaluó mediante los índices de Chao1, Shannon y Simpson (Fig. 19). En la riqueza estimada mediante el índice Chao1, el tratamiento Control presentó valores entre 230–508.53, mientras que el tratamiento Suplementos mostró valores entre 231–294.03. El índice de Shannon presentó valores entre 2.76–3.68 en el tratamiento Control y 3.03–3.11 en Suplementos. El índice de Simpson mostró valores elevados en ambos tratamientos, con rangos de 0.82–0.95 en el Control y 0.90 en Suplementos.

La comparación entre tratamientos mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon ($n = 3$) no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los índices evaluados ($p > 0.05$).

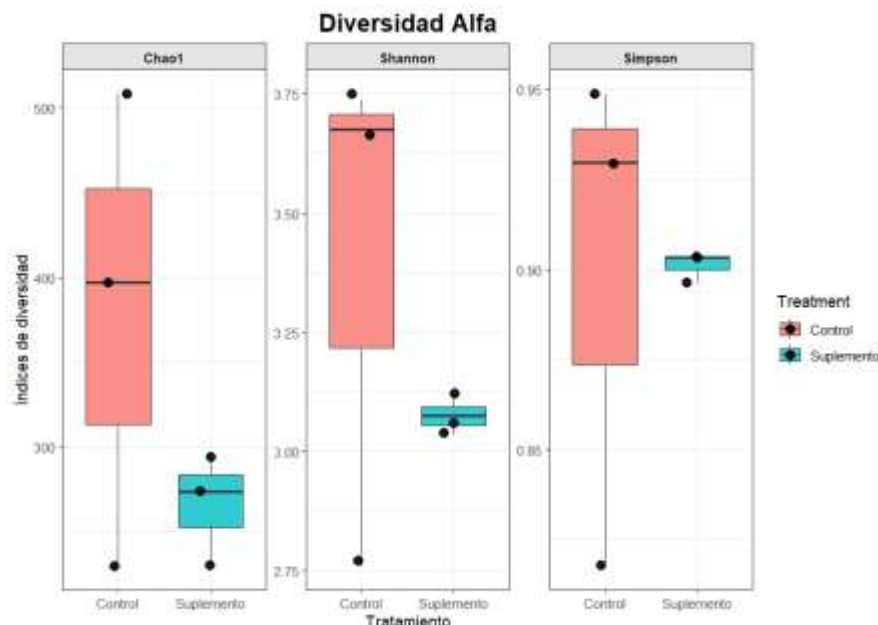


Figura 19. Índices de diversidad Alfa (Chao1, Shannon, Simpson) entre tratamientos Control y Suplementos.

7.4.11.2 Diversidad Beta

La estructura de la comunidad bacteriana se evaluó mediante un análisis de distancias de Bray–Curtis y su ordenación con Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) (Fig. 20). La representación mostró una separación visual entre los tratamientos a lo largo del primer eje, sugiriendo diferencias en la composición bacteriana.

Los resultados del análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA) indicaron que el tratamiento explicó el 64.3% de la variación observada en la composición bacteriana, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (PERMANOVA, $R^2 = 0.643$; $p = 0.100$).

Con el fin de verificar el supuesto de homogeneidad de dispersión entre grupos, se realizó un análisis de dispersión multivariada (betadisper). Los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas en la dispersión interna de las comunidades bacterianas entre tratamientos (ANOVA, $F = 3.28$; $p = 0.144$), lo que indica que la variabilidad interna de los grupos fue comparable.

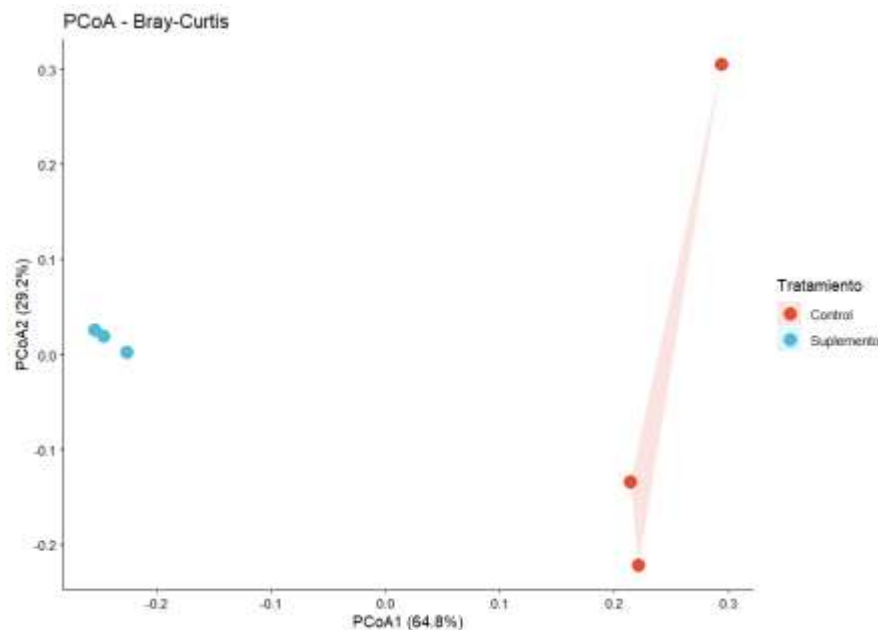


Figura 20. Ordenación mediante Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) entre tratamientos tratamiento Control y Suplementos.

7.4.11.3 Composición a nivel de Filo

A nivel de filo, ambos tratamientos presentaron una comunidad bacteriana dominada principalmente por Proteobacteria (Fig. 21). En el grupo Control, los taxones más abundantes fueron Gammaproteobacteria y Bacteroidota con abundancias relativas de 27.79% y 26.29% respectivamente, seguidos por Alphaproteobacteria (20.44%) y Actinobacteriota (9.43%). Otros grupos como Chloroflexi (6.51%), Verrucomicrobiota (5.03%) y Patescibacteria (3.94%) estuvieron presentes en menores proporciones.

En contraste, el tratamiento Suplementos mostró una modificación en la estructura de la comunidad bacteriana, caracterizada por un incremento en la abundancia relativa de Alphaproteobacteria (39.68%), Verrucomicrobiota (15.09%) y Patescibacteria (10.70%). La abundancia relativa de Actinobacteriota se mantuvo similar entre tratamientos (9.82%), mientras que Gammaproteobacteria disminuyó notablemente hasta 5.56%. De manera similar, Bacteroidota redujo su abundancia relativa bajo la suplementación, representando el 10.17 % de la comunidad bacteriana, mientras que Chloroflexi presentó una abundancia relativa de 6.99%.

El análisis de abundancia diferencial mostró cambios significativos en la estructura taxonómica de la comunidad bacteriana entre tratamientos. Se observó un aumento significativo en Proteobacteria ($\log_2FC = 0.91$; $p_{adj} = 0.003$), Bacteroidota ($\log_2FC = 1.07$; $p_{adj} < 0.001$) y Actinobacteriota ($\log_2FC = 1.19$; $p_{adj} = 0.004$). En contraste, filos como Fusobacteriota ($\log_2FC = -2.29$; $p_{adj} = 8.18 \times 10^{-14}$), Verrucomicrobiota ($\log_2FC = -2.28$; $p_{adj} = 0.002$) y Bdellovibrionota ($\log_2FC = -2.22$; $p_{adj} = 0.0001$) presentaron reducciones significativas en el tratamiento Suplementos.

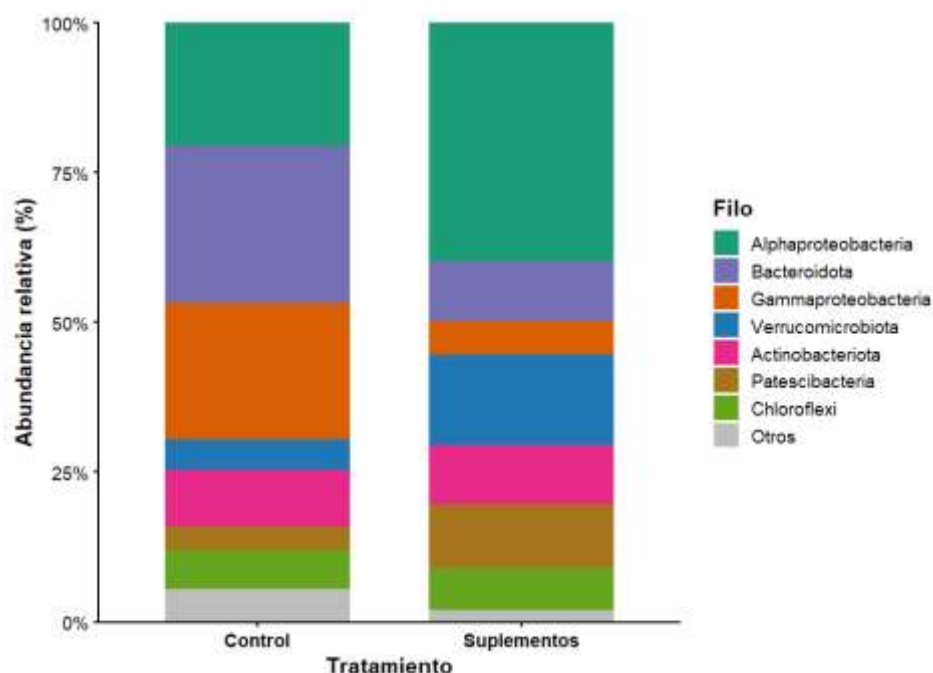


Figura 21. Abundancia relativa a nivel Filo entre tratamientos Control (alimentado exclusivamente con microalgas) y Suplementos (detritos unicelulares de *U. lactuca* y microesferas lipídicas). Se muestran únicamente los filos con mayor abundancia relativa; el resto se agrupó en la categoría “Otros”.

7.4.11.4 Composición a nivel de Familia

La composición bacteriana a nivel de familia mostró diferencias en la estructura de la comunidad entre los tratamientos evaluados (Fig. 22). En el grupo Control, las familias más abundantes fueron Vibrionaceae (26.40%), Kangiellaceae (14.07%), Ilumatobacteraceae (10.86%) y Flavobacteriaceae (8.19%), las cuales en conjunto representaron la mayor proporción de la comunidad microbiana. Otras familias presentes en menor proporción incluyeron Marinobacteraceae (6.21%), Rhodobacteraceae (4.85%), Demequinaceae (4.68%), Caldilineaceae (3.54%), Psychromonadaceae (2.92%) y Pseudoalteromonadaceae (2.87%).

En el tratamiento Suplementos se observó una modificación en la estructura de la comunidad bacteriana, caracterizada por una mayor representación de familias como Demequinaceae (17.02%), Rhodobacteraceae (16.22%) e Ilumatobacteraceae (10.82%), así como un incremento en la diversidad de familias de baja abundancia.

El análisis de abundancia diferencial permitió identificar cambios significativos en taxones asociados a distintas familias bacterianas ($p_{adj} < 0.05$). En este sentido, se observaron disminuciones significativas en el grupo con suplementos ($\log_2\text{FoldChange}$ negativo) en ASVs pertenecientes a familias como Chlamydiaceae ($\log_2\text{FC} = -8.77$, $p_{adj} = 0.0014$), Moduliflexaceae (-8.39 , $p_{adj} = 0.0156$), Thalassobaculaceae (-7.90 , $p_{adj} = 0.036$) y Micrococcaceae (-7.71 , $p_{adj} = 0.025$). Asimismo, otras familias como Saccharospirillaceae, Terasakiellaceae y Fusobacteriaceae también mostraron reducciones significativas.

Por otro lado, se detectó un incremento significativo ($\log_2\text{FoldChange}$ positivo) en ASVs asociados a familias como Xanthomonadaceae ($\log_2\text{FC} = 9.02$, $p_{adj} = 6.89 \times 10^{-38}$), Stappiaceae (10.90 , $p_{adj} = 1.01 \times 10^{-10}$), Lentimicrobiaceae (9.97 , $p_{adj} = 4.07 \times 10^{-8}$) y Psychromonadaceae (5.07 , $p_{adj} = 1.01 \times 10^{-10}$). También se observaron incrementos en Oleiphilaceae, Parvibaculaceae y Anaerovoracaceae, lo que sugiere un cambio importante en la estructura funcional de la comunidad bacteriana bajo el tratamiento con suplementos.

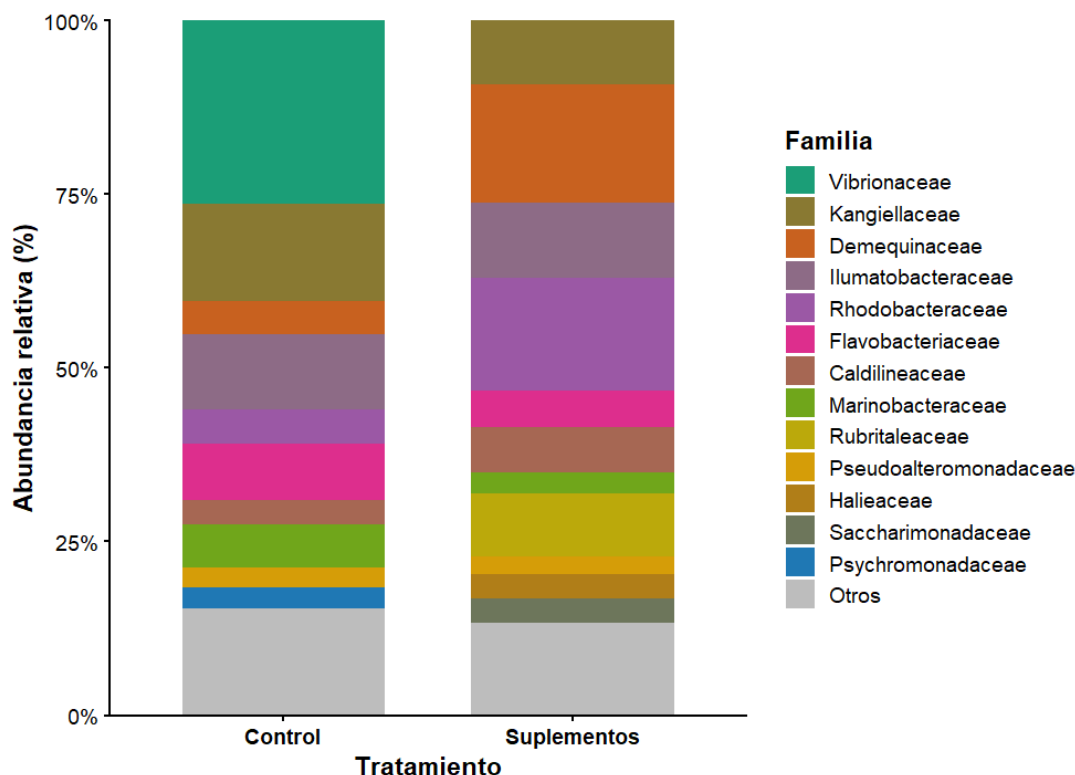


Figura 22. Abundancia relativa promedio (%) de la comunidad bacteriana a nivel Familia en los tratamientos Control (alimentado exclusivamente con microalgas) y Suplementos (detritos unicelulares de *U. lactuca* y microesferas lipídicas). Se muestran únicamente las familias con mayor abundancia relativa; el resto se agrupó en la categoría “Otros”.

7.4.11.5 Composición a nivel de Género

El análisis a nivel de género evidenció variaciones en las abundancias relativas entre tratamientos (Fig. 23). En ambos grupos destacaron géneros pertenecientes principalmente a las clases Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria, incluyendo *Ruegeria*, *Roseobacter*, *Actibacter*, *Pontibaca* e *Ilumatobacter*.

En el tratamiento Control, *Vibrio* presentó una mayor abundancia relativa (23.39%), seguido de *Actibacter* (20.27%), *Ruegeria* (7.82%) y *Sungkyunkwania* (6.86%). Asimismo, géneros asociados al clado *Roseobacter* y miembros de la familia Flavobacteriaceae, como *Meridianimaribacter*, también estuvieron bien representados.

En contraste, el tratamiento Suplementos mostró modificaciones en la estructura de la comunidad bacteriana, caracterizada por una marcada dominancia de *Ruegeria* (32.83%),

seguido de *Actibacter* (12.57%) y miembros del clado *Roseobacter* (6.97%). De manera notable, *Vibrio* presentó una disminución considerable en su abundancia relativa respecto al tratamiento Control, representando menos del 1% de la comunidad bacteriana.

El análisis de abundancia diferencial identificó múltiples ASVs asociados a distintos géneros bacterianos con diferencias significativas entre tratamientos ($\text{padj} < 0.05$).

Se observaron incrementos significativos en ASVs afiliados a géneros como *Stenotrophomonas* ($\log_2\text{FC} = 9.22$; $\text{padj} = 4.93 \times 10^{-13}$), *Labrenzia* (10.84; $\text{padj} = 2.70 \times 10^{-6}$), *Paraglaciecola* (10.03; $\text{padj} = 1.76 \times 10^{-5}$), *Psychromonas* (5.04; $\text{padj} = 0.00059$) y *Leisingera* (4.27; $\text{padj} = 0.0046$).

En contraste, ASVs asociados a géneros como *Halobacteriovorax* ($\log_2\text{FC} = -10.87$; $\text{padj} = 2.70 \times 10^{-6}$), *Oleibacter* (-10.34; $\text{padj} = 1.76 \times 10^{-5}$), *Haloferula* (-8.08; $\text{padj} = 0.0026$), *Iamia* (-7.50; $\text{padj} = 0.0056$), *Thalassobaculum* (-7.77; $\text{padj} = 0.0407$) y *Celeribacter* (-7.35; $\text{padj} = 0.0477$) mostraron disminuciones significativas en el tratamiento Suplementos.

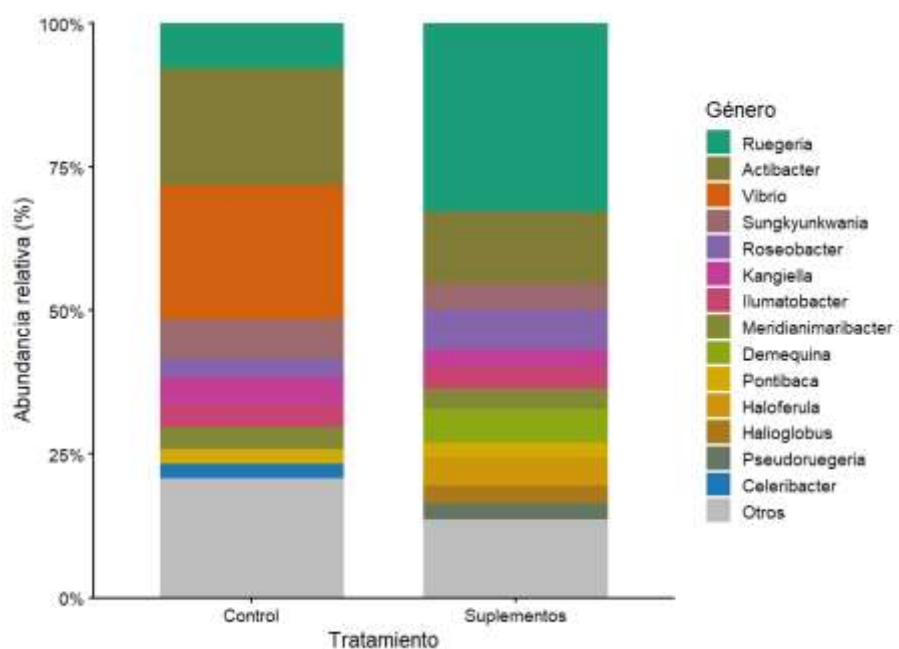


Figura 23. Abundancia relativa promedio a nivel Género de los tratamientos Control (alimentado exclusivamente con microalgas) y el tratamiento suplementado con detritos unicelulares de *U. lactuca* y microesferas lipídicas. Se muestran únicamente los géneros con mayor abundancia relativa; el resto se agrupó en la categoría “Otros”.

Es importante señalar que las tendencias observadas en las gráficas de abundancia relativa no necesariamente coinciden con los resultados del análisis de abundancia diferencial. Esto se debe a que DESeq2 evalúa cambios en ASVs individuales a partir de conteos normalizados y considerando la variabilidad entre muestras, mientras que las gráficas de abundancia relativa representan proporciones agregadas a distintos niveles taxonómicos. En consecuencia, algunos taxones pueden presentar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos aun cuando los cambios no sean evidentes en términos proporcionales, debido a la naturaleza composicional de los datos microbiológicos.

8. DISCUSIÓN

8.1 Desarrollo de suplementos para acondicionamiento de ostión *Crassostrea gigas*

El desarrollo de alternativas alimenticias en acuicultura es clave para optimizar la producción de moluscos bivalvos y reducir la dependencia de alimento vivo (microalgas), lo que representa un reto tanto técnico como económico. En este estudio, se optimizó la metodología de obtención de detritos de la macroalga *Ulva lactuca* y microesferas lipídicas, con la finalidad de ser utilizados como suplementos para reproductores en el acondicionamiento gonádico de *C. gigas*.

En la elaboración de detritos, la aplicación de tratamientos enzimáticos con celulasas comerciales favoreció la degradación de polisacáridos estructurales de la pared celular, incrementando la disponibilidad de nutrientes (Castro-González *et al.*, 1996; Pérez Camacho *et al.*, 2004; Peña-Rodríguez *et al.*, 2020). Entre las enzimas evaluadas, Celluzyme Extra mostró mayor eficiencia en la generación de partículas de menor tamaño, probablemente debido a su mayor actividad carboximetilcelulasa y β -glucanasa en comparación con otras enzimas (González *et al.*, 2011). Este proceso permitió reducir la concentración de enzima al 1% y operar a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$), lo que representa una ventaja práctica frente a metodologías previas que requieren mayores concentraciones enzimáticas y condiciones de incubación a temperaturas elevadas (Omont *et al.*, 2021). No obstante, factores como el pH, temperatura y concentración enzimática siguen siendo determinantes en la eficiencia del proceso (Grahame *et al.*, 2015). Además, las pruebas preliminares realizadas con *Sargassum* sp. presentaron una menor formación de partículas homogéneas en comparación con *U. lactuca*, lo que podría relacionarse con diferencias en la composición y complejidad de la pared celular entre macroalgas verdes y pardas. Esto sugiere que la eficiencia del tratamiento enzimático depende tanto del tipo de enzima utilizada como de las características estructurales de la biomasa algal. En cuanto a los microparticulados lipídicos, se obtuvieron partículas menores a $45\ \mu\text{m}$ (predominantemente de $1\text{--}5\ \mu\text{m}$), un rango adecuado para su ingestión por bivalvos juveniles y adultos (Knauer y Southgate, 1999). Los tamaños obtenidos fueron comparables con los reportados previamente para microencapsulados destinados a ostiones, incluyendo partículas

de 2.75 μm en *C. gigas* (Langdon, 1981), 1–20 μm en *C. virginica* juvenil (Langdon y Siegfried, 1984) y *Ostrea edulis* (Heras *et al.*, 1994), así como 4.7 ± 2.2 μm en semillas de *C. gigas* (Knauer y Southgate, 2007). Asimismo, Delaporte *et al.* (2007) reportaron tamaños de 1–5 μm utilizando agentes emulsificantes, coincidiendo con el rango predominante observado en el presente estudio.

De los métodos evaluados, el basado en agentes emulsificantes (Pernet *et al.*, 2004) resultó el más eficiente, al presentar ventajas en contenido lipídico, concentración de partículas, tamaño de cápsula y facilidad de preparación.

La combinación de microalgas utilizada en este estudio mostró altos niveles de proteínas, lípidos y ácidos grasos, como EPA y DHA, fundamentales para la nutrición y reproducción de los bivalvos (Brown *et al.*, 2002). Asimismo, el procesamiento de *U. lactuca* en forma de detritos incrementó su contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos respecto a la harina inicial. En ambos bioensayos, el contenido proteico aumentó de 12.85%–14.67% en la harina a 31.77–36.68% en los detritos, mientras que los lípidos incrementaron de 9.24–10% hasta 34.11–38.33%. De manera similar, los carbohidratos aumentaron de 13.78–17.26% a 27.08–30.39%.

Los valores obtenidos de la composición para los detritos en el presente estudio fueron superiores a los reportados previamente para *Ulva* procesada mediante metodologías similares. Omont *et al.* (2021) reportaron contenidos de 25.6% de proteína y 8.8% de lípidos en detritos de *Ulva*, mientras que Peña-Rodríguez *et al.* (2020) registraron aproximadamente 23.4% de proteína y 0.47% de lípidos en detritos de *U. lactuca*. Las diferencias observadas en el presente estudio podrían atribuirse no solo a factores asociados con la estacionalidad y el sitio de recolección (Castro-González *et al.*, 1996), sino también a las condiciones de procesamiento empleadas durante la obtención de los detritos. En particular, la optimización del tratamiento enzimático, incluyendo la concentración de la enzima, el tiempo de hidrólisis y el procesamiento a temperatura ambiente, pudo favorecer una mayor liberación y disponibilidad de compuestos bioquímicos (McCauley *et al.*, 2016).

Conjuntamente, los resultados sugieren que los detritos de la macroalga *U. lactuca* y las microesferas lipídicas ricas en ácidos grasos ω -3 de cadena larga podrían emplearse como sustitutos parciales de las microalgas, con potencial para reducir costos de producción. Además, el uso de *U. lactuca*, una macroalga de amplia distribución, rápido crecimiento y fácil cultivo representa una alternativa sostenible (Øverland *et al.*, 2019; Leandro *et al.*, 2019). La combinación de ambos suplementos podría cubrir los requerimientos de lípidos y ácidos grasos esenciales durante la fase de acondicionamiento gonádico de *C. gigas* (Ehteshami *et al.*, 2011) lo que permite su evaluación no solo como alternativa alimenticia, sino también por sus efectos sobre la fisiología y microbiota del organismo.

8.2 Efectos de los suplementos en el acondicionamiento de ostión *Crassostrea gigas*

8.2.1 Maduración gonádica

La maduración de las gónadas en *C. gigas*, es un proceso complejo influenciado por factores genéticos, ambientales y nutricionales, como la disponibilidad y calidad de alimento, la temperatura y la presencia de estrés o patógenos (Boudry *et al.*, 1998; Huvet *et al.*, 2004; Lemasson *et al.*, 2008; Burge *et al.*, 2016). En este contexto, la alimentación juega un papel central al determinar la acumulación de reservas energéticas necesarias para la gametogénesis. La relación entre el alimento y el desarrollo gonadal es una preocupación importante en la acuicultura. La calidad nutricional, la cantidad de alimento disponible en el entorno y la variabilidad de este a lo largo del año debido a cambios estacionales y condiciones ambientales, así como la competencia por los recursos alimenticios en áreas con múltiples especies filtradoras pueden influir en la alimentación y acumulación de reservas energéticas, y, por lo tanto, en el desarrollo de gónadas (Muranaka y Lannan, 1984; Zhang *et al.*, 2018; Munari *et al.*, 2019).

Debido a la alta dependencia de microalgas en criaderos, se han desarrollado estrategias de suplementación que buscan mantener el perfil nutricional y reducir costos de producción (Knauer y Southgate, 1999). Entre estas, los detritos unicelulares de macroalgas y las microesferas lipídicas han mostrado potencial como alternativas alimenticias.

Los detritos son reconocidos como una fuente eficiente de alimento para bivalvos filtradores (Tanyaros y Chuseingjaw, 2016), con resultados exitosos en juveniles de *C. gigas*, donde han logrado sustituir completamente las microalgas sin afectar la supervivencia (Peña-Rodríguez *et al.*, 2020; Omont *et al.*, 2021). Asimismo, los microencapsulados lipídicos han demostrado favorecer el crecimiento y la maduración en diferentes especies del género *Crassostrea* (Langdon, 1981, 1989; Langdon y Siegfried, 1984; Delaporte *et al.*, 2006, 2007; Hurtado *et al.*, 2009; Willer *et al.*, 2020).

En el presente estudio, se evaluó la inclusión de detritos de *U. lactuca* y microesferas lipídicas ricas en ácidos grasos ω -3 como suplementos, en diferentes niveles de sustitución de una dieta base de microalgas (*Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana*) durante un acondicionamiento gonadal de ocho semanas en sistema de alimentación continua.

En general, los parámetros biológicos obtenidos en ambos bioensayos fueron consistentes con estudios previos, mostrando que el uso de estos suplementos no comprometió la supervivencia ni el desempeño reproductivo. No obstante, en el tratamiento con 25% de detritos (D25) se observaron disminuciones puntuales en la supervivencia (71% en días 11–12 y 69% en día 23), lo que sugiere posibles efectos asociados a la calidad del agua. En este sentido, la acumulación y sedimentación de detritos podría favorecer la proliferación de bacterias oportunistas, como se ha reportado en otros estudios (Tanyaros y Chuseingjaw, 2016), por lo que se recomienda implementar recambios frecuentes de agua y limpieza de sedimentos.

La mayor biomasa registrada en el tratamiento D25 (14.7 g) podría estar relacionada con la predominancia de organismos en estadio III, particularmente machos, los cuales presentan menor biomasa en comparación con las hembras en etapas equivalentes (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008). Durante el periodo de estudio del bioensayo 1, se observó una mayor proporción de machos y la presencia de individuos hermafroditas en etapas iniciales, un patrón consistente con el carácter protándrico de *C. gigas*, donde inicialmente predominan los machos y posteriormente aumenta la proporción de hembras (Paniagua-Chávez y Acosta-Ruiz, 1995).

El análisis histológico indicó que previo al inicio del bioensayo de alimentación, la mayoría de los organismos se encontraban en estadio indiferenciado (E0) o en etapas iniciales de desarrollo gonadal (EI). Conforme avanzó el periodo experimental, se observó una progresión gradual de la gametogénesis en todos los tratamientos, aunque con diferencias en la velocidad de desarrollo gonadal entre los tratamientos evaluados.

En machos, los tratamientos M25, DM25 y CDM10 promovieron un desarrollo gonadal más temprano, ya que desde la semana 2 la mayoría de los organismos alcanzaron el estadio EI, mientras que en CTRL y D25 aún se registraron individuos en estadio indiferenciado. Posteriormente, durante la semana 4, los tratamientos DM25 y CDM10 presentaron organismos en estadio IV (desove parcial), sugiriendo una aceleración del proceso reproductivo bajo estas condiciones alimenticias.

En hembras, el desarrollo gonadal fue más variable; sin embargo, el tratamiento D25 presentó organismos en estadio IV durante la semana 6, mientras que DM25 fue el único tratamiento donde se observaron hembras en estadio III desde la semana 4. Estos resultados sugieren que las dietas suplementadas favorecieron el avance de la gametogénesis, particularmente durante las fases intermedias y avanzadas del desarrollo gonadal.

Los resultados histológicos fueron consistentes con el incremento en el área de cobertura gonadal (ACG), la cual aumentó progresivamente conforme avanzaron los estadios de maduración. Aunque este patrón se observó en todos los tratamientos, durante la semana 6 los valores de ACG fueron significativamente mayores en D25 ($83.56 \pm 4.45\%$), M25 ($87.05 \pm 4.82\%$) y DM25 ($84.48 \pm 14.57\%$) respecto al CTRL ($37.83 \pm 19.68\%$), indicando una mayor asignación de reservas energéticas hacia el tejido reproductivo.

Este patrón coincide con lo reportado previamente para *C. gigas*, donde el incremento en el desarrollo gonadal y la expansión de los túbulos gonadales se encuentran estrechamente asociados con la disponibilidad y movilización de reservas energéticas, particularmente glucógeno y lípidos acumulados en los tejidos de reserva (Berthelin *et al.*, 2000; Berthelin *et al.*, 2001). Asimismo, estudios de acondicionamiento reproductivo en ostiones han demostrado

que dietas con mayor disponibilidad energética favorecen el esfuerzo reproductivo y aceleran la gametogénesis (Samain *et al.*, 2007; Jouaux *et al.*, 2013).

Bajo condiciones nutricionales favorables, los bivalvos almacenan reservas en forma de proteínas, lípidos y carbohidratos que posteriormente son utilizadas en la gametogénesis (Ojea *et al.*, 2004; Albentosa *et al.*, 2007; Joaquim *et al.*, 2011). En este sentido, el incremento en la cobertura gonadal observado en los tratamientos suplementados podría estar relacionado con el aporte adicional de nutrientes provenientes de los detritos unicelulares y microesferas lipídicas, favoreciendo el desarrollo y maduración gonadal de *C. gigas*.

8.2.2 Composición bioquímica en gónada y músculo (Bioensayo 1)

En bivalvos, cuando el suministro de alimento es adecuado y abundante, la energía se almacena previo a la gametogénesis en forma de proteínas, carbohidratos (principalmente glucógeno) y lípidos, los cuales posteriormente se utilizan en la formación y liberación de gametos (Ojea *et al.*, 2004; Albentosa *et al.*, 2007; Joaquim *et al.*, 2011).

En este estudio, la composición bioquímica en gónada y músculo mostró una respuesta variable entre tratamientos, evidenciando que los distintos regímenes nutricionales influyen de manera diferencial en la acumulación de macronutrientes (Liu *et al.*, 2010).

En general, el tratamiento CTRL presentó una disminución progresiva de la mayoría de los componentes bioquímicos, particularmente de carbohidratos y lípidos totales, mientras que D25 favoreció la retención de glucógeno y proteínas. Por su parte, M25, DM25 y CDM10 mostraron respuestas intermedias, destacando CDM10 por un incremento en carbohidratos y glucógeno hacia el final del periodo de estudio, acompañado de una reducción en lípidos totales.

En términos de lípidos, se observó una alta variabilidad entre tratamientos durante el acondicionamiento. El contenido inicial en gónada (236.6 ± 68.5 mg/g), fue consistente con valores reportados previo al acondicionamiento gonadal (Berthelin *et al.*, 2000). A lo largo del experimento, M25 presentó las mayores concentraciones de lípidos, lo cual coincide con

estudios que reportan incrementos bajo dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), asociados a una mejora en la calidad del desove y la viabilidad larval (Soudant *et al.*, 1996; Berthelin *et al.*, 2000; Ehteshami *et al.*, 2011; Rato *et al.*, 2018; Pernet *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2023).

Los carbohidratos mostraron una tendencia general a disminuir durante el experimento. El alto contenido inicial en gónada (323.9 ± 37.5 mg/g) indica una reserva energética importante al inicio (Racotta *et al.*, 1998), seguida de una disminución desde la semana 2 en todos los tratamientos, más marcada en D25 y CTRL. Para la semana 8, las concentraciones fueron significativamente menores en DM25, CDM10 y CTRL. Este patrón es consistente con lo reportado en *C. gigas*, donde los carbohidratos disminuyen durante la maduración debido a su movilización y conversión en lípidos (Gabbott, 1975; Pazos *et al.*, 1996; Berthelin *et al.*, 2000).

El glucógeno, como principal reserva energética, mostró respuestas dependientes del tratamiento. En D25 se observó un incremento significativo en la semana 4, lo que sugiere una adecuada acumulación de reservas para la gametogénesis, en concordancia con estudios que lo identifican como un indicador clave de preparación gonadal (Liu *et al.*, 2010). Posteriormente, en la semana 6, se registró una disminución general, particularmente en M25 y CDM10, lo que podría reflejar un mayor consumo energético bajo estos regímenes.

En cuanto a proteínas, se observó un incremento moderado hacia la segunda mitad del experimento, con valores máximos en la semana 6 y mayores concentraciones en M25 al final del periodo. Este comportamiento sugiere una mayor actividad biosintética asociada a la formación de gametos, en línea con lo reportado para condiciones nutricionales óptimas (Utting y Millican, 1997; Liu *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2023).

Estos resultados evidencian que los regímenes nutricionales influyen directamente en la dinámica de reservas energéticas durante el acondicionamiento gonadal. Aunque se observaron patrones consistentes con la literatura, la variabilidad entre tratamientos sugiere la necesidad de optimizar la composición y proporción de los suplementos para maximizar la eficiencia reproductiva en *Crassostrea* spp.

8.2.3 Fecundidad y desempeño temprano de larvas D-veliger

La eficiencia de desove, la fecundidad, la tasa de fertilización y el desarrollo de larvas D-veliger son indicadores clave del éxito del acondicionamiento gonádico (Rato *et al.*, 2018).

En el presente estudio, el tratamiento DM25, basado en la combinación de detritos de *Ulva lactuca* y microesferas lipídicas, presentó el mayor número de huevos fecundados por mililitro, lo que evidencia un efecto positivo de la suplementación combinada sobre la calidad reproductiva.

A las 24 h de desarrollo embrionario, se observó la formación de larvas D-veliger en todos los tratamientos; sin embargo, M25, DM25 y CDM10 presentaron una producción significativamente mayor en comparación con el CTRL, mientras que D25 mostró valores intermedios. Este patrón sugiere que la inclusión de microesferas lipídicas ya sea de forma individual o en combinación con detritos, favorece el desarrollo embrionario temprano.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Rato *et al.* (2018), quienes observaron que ostiones alimentados con una dieta conformada con 25% de harina de macroalga *U. rigida* y 75% de microalgas presentaron mayores porcentajes de larvas D-veliger ($90.72 \pm 4.49\%$), en comparación con dietas con mayor proporción de macroalga, donde el porcentaje disminuyó hasta $55.6\% \pm 23.79\%$. Esto representó un incremento aproximado del 48% en la producción de larvas D-veliger, lo que evidencia que niveles moderados de suplementación pueden favorecer el desempeño reproductivo y larval. De manera similar, en el presente estudio los tratamientos suplementados mostraron una tendencia a mejorar la fecundidad y el desempeño larval, sugiriendo que el aporte nutricional adicional favoreció la calidad de los gametos y el desarrollo embrionario.

En conjunto estos hallazgos indican que la mejora en la fecundidad y el desarrollo larval está estrechamente relacionada con la calidad nutricional de la dieta, particularmente con el aporte de lípidos y ácidos grasos esenciales, fundamentales para la formación de gametos viables y el adecuado desarrollo embrionario.

8.3 Efectos de la combinación de detritos unicelulares y microesferas lipídicas en adultos de *C. gigas* fuera de la época reproductiva

8.3.1 Reservas energéticas (carbohidratos y lípidos) (Bioensayo 2)

En bivalvos, las reservas energéticas, particularmente carbohidratos (glucógeno) y lípidos, son fundamentales para el mantenimiento metabólico y la preparación para la gametogénesis. Fuera de la época reproductiva, estas reservas reflejan principalmente el estado fisiológico de los organismos y su capacidad de responder a cambios en la calidad y disponibilidad del alimento (Ojea *et al.*, 2004).

En el presente estudio, realizado fuera de la época reproductiva, la suplementación con detritos unicelulares y microesferas lipídicas promovió la acumulación diferencial de compuestos energéticos, particularmente en el tejido conectivo vesicular, principal sitio de almacenamiento energético en ausencia de actividad gonadal.

El análisis histoquímico evidenció cambios diferenciales en la distribución de carbohidratos neutros, triglicéridos y fosfolípidos tanto en el tejido conectivo vesicular como en la glándula digestiva, en respuesta a la suplementación.

En el tejido conectivo vesicular, los carbohidratos mostraron un incremento significativo en el tratamiento con suplementos hacia el final del periodo experimental (día 52), lo que sugiere una mayor acumulación de reservas de rápida movilización. De manera similar, los triglicéridos presentaron valores significativamente más altos en los días 40 y 52, indicando una mayor capacidad de almacenamiento lipídico bajo este régimen. En contraste, los fosfolípidos no mostraron variaciones significativas, lo que sugiere una relativa estabilidad de los componentes estructurales en este tejido.

En la glándula digestiva, los efectos de la suplementación fueron más evidentes y consistentes a lo largo del tiempo. Los carbohidratos y triglicéridos fueron significativamente mayores en el tratamiento con suplementos en todos los tiempos evaluados (días 28, 40 y 52), lo que refleja una mayor asimilación y almacenamiento de energía en este órgano clave para la digestión y el

metabolismo. Asimismo, los fosfolípidos mostraron incrementos significativos en los días 28 y 40; sin embargo, estas diferencias desaparecieron hacia el final del experimento, lo que podría indicar una estabilización de las funciones estructurales de las membranas celulares conforme avanzó el periodo de acondicionamiento.

Estos patrones son consistentes con lo reportado en otras especies del género *Crassostrea*, donde la dinámica de las reservas energéticas varía según el tejido, el estado fisiológico y la calidad nutricional. Estudios previos han demostrado que modificaciones en el régimen alimentario pueden alterar significativamente la acumulación y distribución de carbohidratos y lípidos en comparación con organismos no suplementados. Pennarun *et al.* (2003) observaron que la suplementación con microalgas incrementó significativamente el contenido de glucógeno y modificó el perfil lipídico de *C. gigas*, evidenciando una relación directa entre la composición de la dieta y las reservas energéticas. Asimismo, Berthelin *et al.* (2000) reportaron que los carbohidratos y lípidos se almacenan diferencialmente en la glándula digestiva, el tejido gonadal y el tejido conectivo, y que estas reservas son movilizadas durante la gametogénesis. De manera complementaria, Dridi *et al.* (2007) describieron un patrón estacional en el cual el glucógeno se acumula durante periodos de reposo reproductivo, mientras que los lípidos aumentan durante la maduración gonadal, reflejando una estrecha relación entre disponibilidad energética y la condición fisiológica. En este sentido, el incremento simultáneo de carbohidratos y triglicéridos observado en los organismos suplementados sugiere una condición energética favorable que podría estar asociada con procesos de activación metabólica y preparación fisiológica, incluso fuera de la época reproductiva.

La integración de estos resultados con el análisis histológico resalta la utilidad de la histoquímica como herramienta para evaluar no solo la cantidad, sino también la localización de las reservas energéticas a nivel tisular. En este contexto, enfoques recientes de histología digital cuantitativa permiten fortalecer la interpretación de estos cambios mediante la medición objetiva de áreas teñidas y la cuantificación de metabolitos específicos, proporcionando indicadores más precisos del estado fisiológico (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2025).

En conjunto, estos resultados evidencian que la suplementación con detritos unicelulares y microesferas lipídicas favorece la acumulación y redistribución de reservas energéticas en *C. gigas*, particularmente en la glándula digestiva, lo que podría traducirse en una mayor disponibilidad energética para procesos fisiológicos clave. Esto destaca la importancia de integrar análisis bioquímicos e histoquímicos para una evaluación más completa del estado fisiológico bajo condiciones de acondicionamiento fuera de la temporada reproductiva.

8.3.2 Actividad enzimática digestiva

En el presente estudio, la actividad enzimática digestiva en la glándula digestiva de *C. gigas* no mostró diferencias significativas entre tratamientos, incluyendo el contenido de proteína total como en la actividad específica de tripsina, quimotripsina, lipasa y amilasa. Estos resultados indican que la suplementación con detritos unicelulares y microesferas lipídicas no modificó la capacidad digestiva de los organismos, la cual se mantuvo estable durante el periodo experimental.

Este comportamiento es consistente con estudios previos en los que se han evaluado reemplazos parciales de microalgas por detritos unicelulares, donde no se observan cambios significativos en la actividad enzimática digestiva con niveles de sustitución de 25–75% en comparación con dietas basadas en microalgas (Omont *et al.*, 2021). Sin embargo, a diferencia del estudio de Omont *et al.* (2021), realizado en juveniles de *C. gigas*, el presente estudio evaluó organismos adultos fuera de la época reproductiva y bajo una estrategia de suplementación combinada con detritos y microesferas lipídicas. En este contexto, la estabilidad observada en la actividad de tripsina, quimotripsina, lipasa y amilasa sugiere que los organismos mantuvieron una capacidad digestiva funcional aún bajo cambios en la composición de la dieta, evidenciando una alta plasticidad fisiológica y capacidad de adaptación enzimática. En contraste, niveles elevados de sustitución (100%) pueden inducir cambios en el perfil enzimático, lo que ha sido asociado a respuestas compensatorias frente a dietas desbalanceadas (Omont *et al.*, 2021).

Por otra parte, la actividad enzimática también puede variar en función del tipo de alimento suministrado. En *C. gigas*, se ha reportado que dietas con diferentes proporciones de

macroalgas y microalgas pueden modificar la actividad de enzimas digestivas como amilasa y lipasa, observándose diferencias significativas entre tratamientos dependiendo de su composición (Rato *et al.*, 2018). De manera similar, en otros bivalvos se ha demostrado que cambios en el régimen alimenticio pueden inducir ajustes en la actividad de enzimas digestivas como proteasas y carbohidrasas, en función de la disponibilidad de sustratos (Labarta *et al.*, 2002). Asimismo, los detritos de *U. lactuca* pueden incrementar la actividad de enzimas proteolíticas y amilasas, mientras que dietas basadas en microalgas como *C. calcitrans* e *I. galbana* tienden a promover una mayor actividad lipolítica, evidenciando que la respuesta enzimática está estrechamente ligada a la composición bioquímica del alimento (Peña-Rodríguez *et al.*, 2020).

En este contexto, la ausencia de cambios significativos en la actividad enzimática observada en el presente estudio podría explicarse por la combinación de fuentes alimenticias empleadas, la cual probablemente proporcionó un perfil nutricional equilibrado. La inclusión simultánea de detritos unicelulares y microesferas lipídicas pudo haber asegurado una disponibilidad adecuada de proteínas, carbohidratos y lípidos, evitando la necesidad de ajustes en la producción enzimática.

De esta manera, la estabilidad en la actividad de enzimas digestivas concuerda con los resultados observados en el desempeño biológico y el crecimiento, donde dietas con sustituciones parciales no afectan negativamente la productividad ni la condición de los organismos. Estos hallazgos indican que la modulación de la actividad enzimática digestiva en *C. gigas* es más evidente bajo condiciones de desequilibrio nutricional o estrés dietético, mientras que dietas balanceadas, permiten mantener una función digestiva estable. En conjunto, la estabilidad observada en la actividad enzimática digestiva, junto con los cambios en las reservas energéticas, sugiere que la respuesta fisiológica de *C. gigas* a la suplementación ocurre principalmente a nivel de almacenamiento y utilización de energía, más que en la capacidad digestiva per se.

8.3.3 Comunidades bacterianas de la glándula digestiva

En el presente estudio, la caracterización de las comunidades bacterianas en la glándula digestiva de *Crassostrea gigas* evidenció una alta diversidad microbiana, con un amplio número de ASVs distribuidos en múltiples niveles taxonómicos. Este patrón coincide con lo reportado en otros estudios de ostras, donde se ha documentado una elevada complejidad microbiana asociada a diferentes tejidos, reflejando la diversidad funcional de estos ensamblajes bacterianos (Horodesky *et al.*, 2020).

En términos de diversidad alfa, los índices de Shannon, Simpson y Chao1 no mostraron diferencias significativas entre tratamientos, lo que sugiere que la suplementación dietaria no alteró de manera sustancial la riqueza ni la diversidad bacteriana. Este resultado es consistente con estudios en ostras cultivadas, donde tampoco se han detectado diferencias significativas en diversidad microbiana entre condiciones ambientales o sitios de muestreo (Horodesky *et al.*, 2020). En conjunto, estos hallazgos sugieren que la microbiota digestiva de *C. gigas* presenta una estructura relativamente estable frente a variaciones externas, lo que podría interpretarse como un mecanismo de resiliencia que permite mantener funciones esenciales del microbioma. De manera congruente, la diversidad beta mostró un amplio solapamiento entre tratamientos, sin diferencias significativas en la estructura comunitaria. Este comportamiento es similar a lo observado en estudios de microbiota en bivalvos, donde los ensamblajes bacterianos tienden a compartir una proporción importante de su composición, independientemente de factores como el tiempo o el sistema de cultivo (Asmani *et al.*, 2016). No obstante, el hecho de que el tratamiento explicara una proporción considerable de la variación observada ($R^2 = 0.643$) sugiere que la dieta pudo ejercer un efecto importante sobre la composición bacteriana, aunque no fue detectado estadísticamente, posiblemente debido al tamaño de muestra.

A nivel taxonómico, ambos tratamientos estuvieron dominados por el filo Proteobacteria, seguido por Bacteroidota, Actinobacteriota y Verrucomicrobiota. La dominancia de Proteobacteria ha sido ampliamente documentada en ostras y otros bivalvos, tanto en etapas larvarias como en organismos adultos, donde puede representar hasta el 90% de la comunidad bacteriana en ciertos contextos (Asmani *et al.*, 2016). Asimismo, otros estudios han reportado

la presencia recurrente de clases como Gammaproteobacteria en diferentes tejidos, lo que resalta su importancia funcional dentro del microbioma del hospedero (Pimentel *et al.*, 2021). A nivel de familia y género, el análisis de abundancia diferencial reveló cambios significativos en taxones específicos entre tratamientos, aun cuando la diversidad alfa y beta permanecieron estables. En particular, el tratamiento Control presentó una mayor abundancia relativa de Vibrionaceae y del género *Vibrio*, mientras que el tratamiento Suplementos mostró un incremento en Rhodobacteraceae y en géneros asociados al clado Roseobacter, como *Ruegeria*. Asimismo, se detectaron incrementos significativos en ASVs afiliados a géneros como *Labrenzia*, *Leisingera*, *Paraglaciecola* y *Stenotrophomonas*, así como reducciones en taxones como *Halobacteriovorax*, *Thalassobaculum* y *Celeribacter*. Estos resultados sugieren que la suplementación promovió una reorganización selectiva de ciertos grupos bacterianos sin alterar la estructura global de la comunidad.

La alta abundancia de *Vibrio* en la glándula digestiva ha sido previamente reportada en *C. gigas*, donde este género puede representar una fracción importante de la comunidad bacteriana (Vezzulli *et al.*, 2018). Por otro lado, la familia Rhodobacteraceae ha sido descrita como un grupo dominante en sistemas marinos y en etapas tempranas del desarrollo de ostras, asociada a procesos de colonización y metabolismo de compuestos orgánicos (Asmani *et al.*, 2016).

En este contexto, el incremento relativo de bacterias asociadas al clado Roseobacter en el tratamiento Suplementos podría tener implicaciones ecológicas relevantes dentro de la microbiota digestiva. Los miembros de este linaje son reconocidos como colonizadores eficientes de superficies en ambientes marinos y se ha propuesto que su éxito competitivo está asociado a la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Cude *et al.*, 2012). En particular, géneros como *Ruegeria*, *Leisingera* y *Labrenzia*, detectados en mayor abundancia en el tratamiento Suplementos, han sido asociados con la producción de compuestos bioactivos y con interacciones antagonistas frente a bacterias potencialmente patógenas, incluyendo especies del género *Vibrio* (Porsby *et al.*, 2008). Estudios recientes han demostrado que miembros del clado Roseobacter, como *Phaeobacter piscinae*, pueden inhibir el crecimiento de *Vibrio crassostreae* mediante la producción de ácido tropoditiético (TDA), un

compuesto con actividad antibacteriana relevante en sistemas acuícolas (Roager *et al.*, 2024). Asimismo, miembros del género *Labrenzia* han sido relacionados con la producción de metabolitos antimicrobianos, lo que sugiere un posible papel en la modulación de comunidades bacterianas marinas (Ghani *et al.*, 2014; Amiri Moghaddam *et al.*, 2018). De acuerdo con esto, la disminución observada en la abundancia relativa de *Vibrio* en organismos suplementados podría reflejar procesos de exclusión competitiva o modificaciones en los nichos ecológicos dentro de la glándula digestiva.

Desde una perspectiva funcional, estas tendencias podrían estar relacionadas con la naturaleza de los suplementos utilizados. Los detritos de macroalgas, como *U. lactuca*, aportan polisacáridos complejos, mientras que las microesferas lipídicas representan una fuente concentrada de energía. En conjunto, el aumento relativo de bacterias del clado *Roseobacter* en el tratamiento Suplementos podría estar vinculado tanto a su capacidad para degradar compuestos orgánicos derivados de algas como a su afinidad ecológica con microbiotas asociadas a *Ulva*. Se ha documentado que las macroalgas de este género mantienen asociaciones estrechas con miembros de Rhodobacterales, los cuales participan en procesos de crecimiento y morfogénesis mediante la producción de compuestos bioactivos (Ulrich *et al.*, 2026). Asimismo, las comunidades bacterianas asociadas a *Ulva* incluyen grupos con potencial antimicrobiano relevante, particularmente bacterias perteneciente a filos Proteobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes, las cuales han mostrado actividad inhibitoria frente a diversos microorganismos patógenos (Ismail *et al.*, 2018). En síntesis, estos antecedentes sugieren que la inclusión de detritos de *Ulva* en la dieta podría favorecer la selección de bacterias funcionalmente adaptadas a estos sustratos, promoviendo modificaciones selectivas en la composición microbiana.

Adicionalmente, diversos estudios han señalado que la microbiota en bivalvos puede estar compuesta por unos pocos taxones dominantes que representan una alta proporción de la abundancia total, mientras que el resto corresponde a una fracción diversa pero menos abundante (Vezzulli *et al.*, 2018). Este patrón concuerda con lo observado en el presente

estudio, donde, a pesar de la alta diversidad detectada, la comunidad estuvo dominada por un número reducido de grupos bacterianos.

En conjunto, los resultados sugieren que la suplementación dietaria no generó cambios drásticos en la estructura de la microbiota digestiva, pero sí promovió modificaciones específicas en la abundancia de distintos taxones bacterianos. Este tipo de respuesta ha sido descrito como una modulación funcional más que estructural del microbioma, en la cual se conserva la estabilidad general de la comunidad mientras ciertos grupos bacterianos responden diferencialmente a la disponibilidad de nutrientes y compuestos orgánicos derivados de la dieta.

Finalmente, la estabilidad observada en la diversidad alfa y beta, junto con los cambios detectados mediante análisis de abundancia diferencial, sugieren que la suplementación con detritos de *U. lactuca* y microesferas lipídicas promovió una reorganización taxonómica específica sin comprometer la estabilidad global del microbioma digestivo. Estos cambios incluyeron el incremento de grupos potencialmente asociados con el metabolismo de compuestos orgánicos marinos y la disminución relativa de taxones como *Vibrio*, lo que podría representar ajustes funcionales de la microbiota frente a la nueva composición de la dieta. Este comportamiento es consistente con los resultados bioquímicos y enzimáticos obtenidos en el presente estudio, donde tampoco se observaron alteraciones fisiológicas importantes, sugiriendo que la suplementación dietaria moduló de manera fina tanto la microbiota como el sistema digestivo de *C. gigas* sin comprometer su estabilidad funcional.

Los resultados del presente estudio evidencian que la suplementación con detritos de *U. lactuca* y microesferas lipídicas representa una estrategia viable para el acondicionamiento de *C. gigas*, al permitir una sustitución parcial de microalgas sin comprometer el desempeño fisiológico, reproductivo ni microbiológico de los organismos. A través de los distintos niveles de análisis —histológico, bioquímico, enzimático y microbiológico— se observó que la respuesta a la suplementación no se manifiesta como cambios drásticos en la estructura o funcionamiento del sistema, sino como una modulación fina de los procesos energéticos y de la composición

microbiana. Esta estabilidad funcional, acompañada de ajustes sutiles en la acumulación de reservas, el desempeño larval y la microbiota digestiva, sugiere que *C. gigas* posee una alta capacidad de adaptación a variaciones en la dieta. Desde una perspectiva aplicada, estos hallazgos destacan el potencial de integrar fuentes alternativas como *U. lactuca* en programas de alimentación en acuicultura, contribuyendo a la sostenibilidad del sistema productivo sin comprometer la eficiencia biológica.

9. CONCLUSIONES

Los dos bioensayos realizados en este estudio permitieron evaluar de manera complementaria el efecto de suplementos alimenticios a base de detritos de *Ulva lactuca* y microesferas lipídicas sobre el desempeño fisiológico y reproductivo de *Crassostrea gigas* bajo diferentes condiciones reproductivas.

La metodología optimizada permitió obtener detritos de *U. lactuca* y microesferas lipídicas con características adecuadas en tamaño de partícula, contenido nutricional y composición lipídica, compatibles con los requerimientos de ingestión y asimilación en *C. gigas*, validando su uso potencial como suplementos alimenticios en sistemas de cultivo.

En el primer bioensayo, desarrollado durante el acondicionamiento gonadal, la inclusión de los suplementos no afectó negativamente los parámetros biométricos, la progresión de los estadios de maduración gonadal ni el desempeño reproductivo de los organismos. Asimismo, la fecundidad y el desarrollo temprano de larvas tipo D-veliger fueron adecuados en los tratamientos suplementados, evidenciando la obtención de gametos viables y un desarrollo larvario normal. La composición bioquímica del músculo y la gónada indicó que los tratamientos suplementados favorecieron la disponibilidad y redistribución de reservas energéticas, particularmente lípidos, proteínas y carbohidratos, lo que refleja un adecuado aporte nutricional durante el acondicionamiento gonadal.

En el segundo bioensayo, realizado fuera de la época reproductiva, la suplementación promovió la acumulación de carbohidratos y triglicéridos en el tejido conectivo vesicular y en la glándula digestiva, evidenciando un estado energético favorable en los organismos. En este contexto, la actividad enzimática digestiva se mantuvo estable, lo que indica que la capacidad digestiva no fue afectada por la suplementación.

Adicionalmente, la caracterización de las comunidades bacterianas en la glándula digestiva mostró que la suplementación no alteró significativamente la diversidad ni la estructura global de la microbiota; promovió cambios específicos en la abundancia relativa de ciertos grupos

bacterianos, incluyendo un incremento de taxones asociados al clado Roseobacter y una disminución relativa de *Vibrio*.

En conjunto, estos resultados demuestran que la suplementación con detritos de *U. lactuca* y microesferas lipídicas es fisiológicamente bien tolerada por *C. gigas* y permite una sustitución parcial de microalgas sin afectar el desempeño fisiológico, reproductivo ni microbiológico de los organismos. La respuesta observada se manifestó principalmente como una modulación de las reservas energéticas y de la composición microbiana digestiva, manteniendo la estabilidad funcional del sistema.

Estos hallazgos respaldan el potencial de estos suplementos como una alternativa nutricional sostenible para programas de acondicionamiento gonadal y manejo reproductivo en la acuicultura de ostión.

10. LITERATURA CITADA

- Albentosa, M., Fernández-Reiriz, M. J., Labarta, U., & Pérez-Camacho, A. (2007). Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: physiological and biochemical parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 146(2), 241-249.
- Amiri Moghaddam, J., Dávila-Céspedes, A., Kehraus, S., Crüsemann, M., Köse, M., Müller, C. E., König, G. M. (2018). Cyclopropane-Containing Fatty Acids from the Marine Bacterium *Labrenzia* sp. 011 with Antimicrobial and GPR84 Activity. *Marine Drugs*, 16(10), 369. <https://doi.org/10.3390/md16100369>
- Anjos, C., Baptista, T., Joaquim, S., Mendes, S., Matias, A. M., Moura, P., Simões, T., & Matias, D. (2017). Broodstock conditioning of the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*, Lamarck, 1819): influence of different diets. *Aquaculture Research*, 48(7): 3859–3878. doi: 10.1111/are.13213
- Asmani, K., Petton, B., Le Grand, J., Mounier, J., Robert, R., & Nicolas, J. L. (2016). Establishment of microbiota in larval culture of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 464, 434-444.
- Berthelin, C. H., Laisney, J., Espinosa, J., Martin, O., Hernandez, G., Mathieu, M., & Kellner, K. (2001). Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from two different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). *Invertebrate reproduction & development*, 40(1), 79-86.
- Berthelin, C., Kellner, K., & Mathieu, M. (2000). Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comparative biochemistry and physiology Part B: Biochemistry and molecular biology*, 125(3), 359-369.
- Bligh E. G. & Dyer, WJ. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol*, 37(8). doi: 10.1139/o59-099
- Bonilla-Ahumada, F de J., Khandual, S. & Lugo-Cervantes, E del C. (2018). Microencapsulation of algal biomass (*Tetraselmis chuii*) by spray-drying using different encapsulation materials for better preservation of beta-carotene and antioxidant compounds. *Algal Research*, 36: 229–238. doi: 10.1016/j.algal.2018.10.006
- Borowitzka, M. A. (1997). Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of applied phycology*, 9, 393-401.
- Boudry, P., Collet, B., Cornette, F., & Hervouet, V. (1998). Genetic variability and response to selection for growth in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). I. Selection responses for production traits in two generations. *Aquaculture*, 165(1-2), 165-181.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2). doi: 10.1006/abio.1976.9999
- Brown, M. R. (2002). Nutritional Value and Use of Microalgae in Aquaculture. . In: Cruz-Suarez, L. E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortes, M. G., & Simoes, N. (eds). *Avances en nutrición acuícola VI*. Memorias del VI Symposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3–6th September, Cancún, México.

- Burge, C. A., Griffin, F. J., & Friedman, C. S. (2016). Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. *Diseases of Aquatic Organisms*, 118(3), 221-233.
- Carboni, S., Clegg, S.H. & Hughes, A.D. (2016). The use of biorefinery by-products and natural detritus as feed sources for oysters (*Crassostrea gigas*) juveniles. *Aquaculture*, 464. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.07.021
- Castro-González, M.I., Romo, F.P.G., Pérez-Estrella, S. & Carrillo-Domínguez, S. (1996). Chemical composition of the green alga *Ulva lactuca*. *Ciencias Marinas*, 22(2): 205–213. doi: 10.7773/CM.V22I2.853
- Charoensiddhi, S., Conlon, M. A., Franco, C. M. M., & Zhang, W. (2017). The development of seaweed-derived bioactive compounds for use as prebiotics and nutraceuticals using enzyme technologies. *Trends Food Sci Technol* 70. 20–33.
- Chávez-Villalba, J. (2014). Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiológica*, 24(3): 175–190. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972014000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es[consulta:January 23, 2022]
- Chávez-Villalba, J., Cochard, J.C., le Pennec, M., Barret, J., Enríquez-Díaz, M. & Cáceres-Martínez, C. (2003). Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*, 22(3)
- Chávez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamiseza, J., Pouvreau, S., Barret, J., Cochard, J.C., & le Pennec, M. (2002). Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: Origin and temperature effect. *Aquaculture*, 214(1–4). doi: 10.1016/S0044-8486(01)00898-5
- Cho, I. K., Seo, B. S., Hwang, S. Y., Lee, Y. I., Moon, J. S., Park, S. J., Lee, H. J., Hur, Y.B., & Choi, Y. H. (2023). The Annual Reproductive Cycle, Proximate Composition, Fatty Acid and Amino Acid Content of Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (*Magallana gigas*), in Gadeok-do, Korea. *Development & Reproduction*, 27(3), 101.
- CONAPESCA. (2018). Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca. Disponible en: https://nube.conapesca.gob.mx/sites/cona/dgppe/2018/ANUARIO_2018.pdf. [consulta: 1 de febrero 2022]
- CONAPESCA. (2024). Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca 2024. Disponible en: <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuacultura-y-pesca>. [consulta: 27 de mayo 2023]
- Corino, C., Modina, S.C., di Giancamillo, A., Chiapparini, S., & Rossi, R. (2019). Seaweeds in Pig Nutrition. *Animals* 2019, 9(12): 1126. doi: 10.3390/ANI9121126
- Coutteau, P., & Sorgeloos, P. (1992). The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *Journal of Shellfish Research*, 11: 467–467
- Cude, W. N., Mooney, J., Tavaneai, A. A., Hadden, M. K., Frank, A. M., Gulvik, C. A., ... & Buchan, A. (2012). Production of the antimicrobial secondary metabolite indigoidine contributes to competitive surface colonization by the marine roseobacter *Phaeobacter* sp. strain Y4I. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 4771-4780.
- Delaporte, M., Chu, F.L., Langdon, C., Moal, J., Lambert, C., Samain, J.F., & Soudant, P. (2007). Changes in biochemical and hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-Iso supplemented with lipid emulsions rich in eicosapentaenoic acid. *Journal of*

- Experimental Marine Biology and Ecology*, 343(2): 261–275. doi: 10.1016/J.JEMBE.2006.12.021
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Giudicelli, E., Lambert, C., Séguineau, C., & Samain, J-F. (2006). Impact of 20:4n-6 Supplementation on the Fatty Acid Composition and Hemocyte Parameters of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*
- Dominguez, H., & Loret, EP. (2019). *Ulva lactuca*, A Source of Troubles and Potential Riches. *Mar Drugs* 17(6), 357.
- Dridi, S., Romdhane, M. S., Elcfsi, M. H. (2007). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture*, 263(1-4), 238-248.
- Ehteshami, F., Christianus, A., Rameshi, H., Harmin, S. A., & Saad, C. R. (2011). The effects of dietary supplements of polyunsaturated fatty acid on pearl oyster, *Pinctada margaritifera* L., gonad composition and reproductive output. *Aquaculture Research*, 42(4), 613-622.
- Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., & le Pennec, M. (2009). Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: Evidence of an environment-dependent strategy. *Aquaculture International*, 17(5). doi: 10.1007/s10499-008-9219-1
- FAO (2024). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2024. *La transformación azul en acción*. Roma. <https://doi.org/10.4060/cd0683es>
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. FAO. doi: 10.4060/ca9229es
- FAO. (2022). The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. *Towards Blue Transformation*. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Felix, S., & Pradeepa, P. (2012). Lactic acid fermentation of seaweed (*Ulva Reticulata*) for preparing Marine Single Cell Detritus (MSCD). *Tamilnadu J. Veterinary and Animal Sciences*, 8(2), 76-81.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509.
- Gabbot, P. A. (1975). Storage cycles in marine bivalve molluscs: A hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis, in. In *Proceeding of the 9th European Marine Biology Symposium* (pp. 191-211). Aberdeen University Press.
- Ghani, N. A., Norizan, S. N. M., Chan, X. Y., Yin, W.-F., & Chan, K.-G. (2014). *Labrenzia* sp. BM1: A Quorum Quenching Bacterium That Degrades *N*-acyl Homoserine Lactones via Lactonase Activity. *Sensors*, 14(7), 11760-11769. <https://doi.org/10.3390/s140711760>
- González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., González, N., & Miranda, I. (2011). Caracterización Bioquímica de aislamientos de *Trichoderma spp.* promisorios como agentes de control biológico. II. Expresión de actividad glucanasa. In: *Revista de Protección Vegetal* 26.1. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522011000100004. [consulta: 27 December 2022]
- Grahame, D. A. S., Bryksa, B. C., & Yada, R. Y. (2015). Factors affecting enzyme activity. En: *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality*. Woodhead Publishing, 2015, 11-55.
- Guedes, A. C., & Malcata, F. X. (2012). Nutritional value and uses of microalgae in aquaculture. *Aquaculture*, 10(1516), 59-78.

- Helm, M. M. (2005). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Crassostrea gigas*. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en.
- Helm, M. M. (2009). *Crassostrea gigas*. Cultured aquatic species fact sheets. FAO, Rome, Italy. Disponible en: https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/en/en_pacificcuppedoyster.htm.
- Helm, M.M., Bourne, N., & Lovatelli, A. (2006). Cultivo de bivalvos en criadero. FAO Documento Técnico de Pesca No 471 Roma, FAO.
- Heras, H., Kean-Howie, J., & Ackman, RG. (1994). The potential use of lipid microspheres as nutritional supplements for adult *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 123(3-4), 309-322.
- Horodesky, A., Castilho-Westphal, G. G., Pont, G. D., Faoro, H., Balsanelli, E., Tadra-Sfeir, M. Z., ... & Ostrensky, A. (2020). Metagenomic analysis of the bacterial microbiota associated with cultured oysters (*Crassostrea sp.*) in estuarine environments. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92(suppl 1), e20180432.
- Howard, D. W., & Smith, C. S. (1983). Histological techniques for marine bivalve mollusks. NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25
- Hurtado, M. A., Reza, M., Ibarra, A. M., Wille, M., Sorgeloos, P., Soudant, P., & Palacios, E. (2009). Arachidonic acid (20: 4n- 6) effect on reproduction, immunology, and prostaglandin E2 levels in *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). *Aquaculture*, 294(3-4), 300-305.
- Huvet, A., Boudry, P., & Samain, J. F. (2004). Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*, 233(1-4), 109-121.
- Ismail, A., Ktari, L., Ahmed, M., Bolhuis, H., Bouhaouala-Zahar, B., Stal, L. J., ... & El Bour, M. (2018). Heterotrophic bacteria associated with the green alga *Ulva rigida*: identification and antimicrobial potential. *Journal of Applied Phycology*, 30(5), 2883-2899.
- Joaquim, S., Matias, D., Matias, A. M., Moura, P., Arnold, W. S., Chícharo, L., & Baptista Gaspar, M. (2011). Reproductive activity and biochemical composition of the pullet carpet shell *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791)(Mollusca: Bivalvia) from Ria de Aveiro (northwestern coast of Portugal). *Scientia Marina*, 75(2), 217-226.
- Jouaux, A., Blin, J. L., Adeline, B., Heude-Berthelin, C., Sourdain, P., Mathieu, M., & Kellner, K. (2013). Impact of energy storage strategies on gametogenesis and reproductive effort in diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas*—involvement of insulin signaling. *Aquaculture*, 388, 173-181.
- Knauer, J., & Southgate, P. C. (1999). A Review of the Nutritional Requirements of Bivalves and the Development of Alternative and Artificial Diets for Bivalve Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science* 7(3-4), 241–280.
- Knauer, J., & Southgate, P. C. (2007). A Review of the Nutritional Requirements of Bivalves and the Development of Alternative and Artificial Diets for Bivalve Aquaculture. <http://dx.doi.org/10.1080/10641269908951362>, 7(3–4): 241–280. doi: 10.1080/10641269908951362
- Labarta, U., Fernández-Reiriz, M., Navarro, J., & Velasco, A. (2002). Enzymatic digestive activity in epifaunal (*Mytilus chilensis*) and infaunal (*Mulinia edulis*) bivalves in response to changes in food regimes in a natural environment. *Marine biology*, 140(4), 669-676.

- Langdon, C. J. & Siegfried, C. A. (1984). Progress in the development of artificial diets for bivalve filter feeders. *Aquaculture*, 39(1–4). doi: 10.1016/0044-8486(84)90262-X
- Langdon, C. J. (1981). The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 61(2), 431-448.
- Langdon, C. J. (1989). Preparation and evaluation of protein microcapsules for a marine suspension-feeder, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 102, 217-224.
- Leandro, A., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. M. (2019). Diverse Applications of Marine Macroalgae. *Marine Drugs* 2020, Vol 18, Page 17, 18(1): 17. doi: 10.3390/MD18010017
- Lemasson, A. J., Boudry, P., & Huvet, A. (2008). Moïse, the mythological founder of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, is a caspase-dependent apoptotic factor. *Journal of Biological Chemistry*, 283(52), 34656-34665.
- Liu, W., Li, Q., Gao, F., & Kong, L. (2010). Effect of starvation on biochemical composition and gametogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fisheries science*, 76, 737-745.
- Loor Mera, A. G. (2012). Desarrollo de protocolos de manejo para la inducción al desove y larvicultura de la ostra nativa *Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854) (Tesis de Licenciatura).
- Loor, A., Bossier, P., & Nevejan, N. (2021). Dietary substitution of microalgae with the *Saccharomyces cerevisiae* mutant, $\Delta mnn9$, for feeding Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) juveniles. *Aquaculture*, 534: 736253. doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2020.736253
- López-Carvallo, J. A., Saucedo, P. E., Rodríguez-Jaramillo, C., García-Corona, J. L., & Mazón-Suástegui, J. M. (2017). Carbohydrate-rich diets meet energy demands of gametogenesis in hatchery-conditioned mussels (*Modiolus capax*) at increasing temperatures. *Journal of Shellfish Research*, 36(3), 649-657.
- Lovegrove, A., Bray, S., Inglis, G., Wilding, M., Hambach, B., & Hauton, C. (2025). Pacific oysters (*Magallana gigas*, Thunberg 1793) preferentially consume *Isochrysis galbana*, increasing biomass and upregulating biomineralisation gene nacrein. *Aquaculture International*, 33(6). <https://doi.org/10.1007/s10499-025-02161-y>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., & Farr, A. L. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry* 193: 165-275.
- Marsh, J. B., & Weinstein, D. B. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal of lipid research*, 7(4), 574-576.
- Marshall, R., McKinley, S., & Pearce, C. M. (2010). Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 2(1), 33-55.
- Mazón-Suástegui, J. M., García Bernal, M. R., Arcos-Ortega, G. F., Tordecillas-Guillén, J. L., Barajas-Ponce, U., Rodríguez-Jaramillo, C., & Betanzos-Vega, A. (2022). Efecto de medicamentos homeopáticos de uso humano en reproductores de ostión Americano *Crassostrea virginica*. *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura*, 4(2): 66–74. doi: 10.33936/at.v4i3.4545
- Mazón-Suástegui, J. M., Lodeiros, C., Avilés-Quevedo, A., Rodríguez-Jaramillo, C., Ortiz-Cornejo, N., & Abasolo-Pacheco, F. (2017). Cornstarch as a dietary supplement in conditioning broodstock and spat at a nursery of the Pacific calico scallop, *Argopecten ventricosus*. *Latin american journal of aquatic research*, 45(5), 915-921.

- McCauley, J. I., Meyer, B. J., Winberg, P. C., & Skropeta, D. (2016). Parameters affecting the analytical profile of fatty acids in the macroalgal genus *Ulva*. *Food Chemistry*, 209, 332-340.
- Métais, P., & Bieth, J. (1968). Determination of alpha-amylase by a microtechnic. In *Annales de biologie clinique* (Vol. 26, No. 1, pp. 133-142).
- Morais, T., Inácio, A., Coutinho, T., Ministro, M., Cotas, J., Pereira, L., & Bahcevandziev, K. (2020). Seaweed Potential in the Animal Feed: A Review. *Journal of Marine Science and Engineering 2020, Vol 8, Page 559*, 8(8): 559. doi: 10.3390/JMSE8080559
- Munari, M., Matozzo, V., Chemello, G., Riedl, V., Pastore, P., Badocco, D., & Marin, M. G. (2019). Seawater acidification and emerging contaminants: A dangerous marriage for haemocytes of marine bivalves. *Environmental research*, 175, 11-21.
- Muranaka, M. S., & Lannan, J. E. (1984). Broodstock management of *Crassostrea gigas*: environmental influences on broodstock conditioning. Elsevier Science Publishers B.V. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0044848684902679>. [consulta: enero de 2022]
- Napolitano, G. E., Ackman, R. G., & Ratnayake, W. M. (1990). Fatty acid composition of three cultured algal species (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* and *Chaetoceros calcitrans*) used as food for bivalve larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 21(2), 122-130.
- Nolasco-Soria, H., Moyano-López, F., Vega-Villasante, F., del Monte-Martínez, A., Espinosa-Chaurand, D., Gisbert, E., & Nolasco-Alzaga, H. R. (2018). Lipase and phospholipase activity methods for marine organisms. *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols*, 139-167.
- Ohemeng-Ntiamoah, J., & Datta, T. (2018). Evaluating analytical methods for the characterization of lipids, proteins and carbohydrates in organic substrates for anaerobic co-digestion. *Bioresource Technology*, 247, 697-704.
- Ojea, J., Pazos, A. J., Martinez, D., Novoa, S., Sanchez, J. L., & Abad, M. (2004). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture*, 238(1-4), 451-468.
- Omont, A., Py, C., Gamboa-Delgado, J., Nolasco-Soria, H., Spanopoulos-Zarco, M., & Peña-Rodríguez, A. (2021). Nutritional contribution of seaweed *Ulva lactuca* single-cell detritus and microalgae *Chaetoceros calcitrans* to the growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 541. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736835
- Oostlander, P. C., van Houcke, J., Wijffels, R. H., Barbosa, M. J. (2020). Microalgae production cost in aquaculture hatcheries. *Aquaculture*, 525, 735310.
- Øverland, M., Mydland, LT., & Skrede, A. (2019). Marine macroalgae as sources of protein and bioactive compounds in feed for monogastric animals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1): 13–24. doi: 10.1002/JSFA.9143
- Pales Espinosa, E., Barillé, L., & Allam, B. (2007). Use of encapsulated live microalgae to investigate pre-ingestive selection in the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 343(1). doi: 10.1016/j.jembe.2006.12.002
- Paniagua-Chávez, C. G., & Acosta-Ruiz, M. D. J. (1995). Gonadal development of *Crassostrea gigas* in Bahía San Quintín, Baja California, Mexico. *Ciencias Marinas*, 21(2), 225-242.

- Pennarun, A. L., Prost, C., Haure, J., Demaimay, M. (2003). Comparison of two microalgal diets. 1. Influence on the biochemical and fatty acid compositions of raw oysters (*Crassostrea gigas*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(7), 2006-2010.
- Peña-Rodríguez, A., Morales-Alvarado, G., Elizondo.González, R., Mendoza-Carrión, G., Tovar-Ramírez-Dariel, Escobedo-Fregoso, C. (2020). Seaweed single cell detritus effects on the digestive enzymes activity and microbiota of the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Applied Phycology*, 32(5): 3481–3493. doi: 10.1007/s10811-020-02167-4
- Pérez Camacho., Salinas, JM., Fuertes, C., & Delgado, M. (2004). Preparation of single cell detritus from *Laminaria saccharina* as a hatchery diet for bivalve mollusks. *Marine Biotechnology*, 6(6): 642–649. doi: 10.1007/s10126-004-2901-z
- Pernet, F., Tremblay, R., Langdon, C., & Bourget, E. (2004). Effect of additions of dietary triacylglycerol microspheres on growth, survival, and settlement of mussel (*Mytilus spp.*) larvae. *Marine Biology*, 144(4): 693–703. doi: 10.1007/S00227-003-1234-1/FIGURES/7
- Pimentel, Z. T., Dufault-Thompson, K., Russo, K. T., Scro, A. K., Smolowitz, R. M., Gomez-Chiarri, M., & Zhang, Y. (2021). Microbiome analysis reveals diversity and function of mollicutes associated with the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. *Msphere*, 6(3), 10-1128.
- Porsby, C. H., Nielsen, K. F., Gram, L. (2008). *Phaeobacter* and *Ruegeria* species of the Roseobacter clade colonize separate niches in a Danish turbot (*Scophthalmus maximus*)-rearing farm and antagonize *Vibrio anguillarum* under different growth conditions. *Applied and environmental microbiology*, 74(23), 7356-7364.
- Rato, A., Joaquim, S., Tavares, TG., Martins, Z. E., Guedes, A. C., Pereira, L. F., Machado, J., Matias, A. M., Gonçalves, J. F. M., Vaz-Pires, P., Magnoni, L. J., Ozório, R. O. A, & Matias, D. (2018). Viability of dietary substitution of live microalgae with dry *Ulva rigida* in broodstock conditioning of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Biology Open*, 7(9). doi: 10.1242/bio.035923
- Roager, L., Athena-Vasileiadi, D., Gram, L., & Sonnenschein, E. C. (2024). Antagonistic activity of *Phaeobacter piscinae* against the emerging fish pathogen *Vibrio crassostreae* in aquaculture feed algae. *Applied and Environmental Microbiology*, 90(3), e01439-23.
- Robert, R., & Trintignac, P. (1997). Substitutes for live microalgae in mariculture: a review. *Aquatic Living Resources*, 10(5): 315–327. doi: 10.1051/ALR:1997035
- Rodríguez-Jaramillo, C., Cruz-Flores, R., José Manuel, M. S., Arcos-Ortega, F., Brokordt, K., Lira, G., ... & López-Carvallo, J. A. (2025). Digital Histology in Aquaculture: From Qualitative to a Quantitative Tool. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 1-36.
- Rodríguez-Jaramillo, C., Hurtado, M. A., Romero-Vivas, E., Ramírez, J. L., Manzano, M., & Palacios, E. (2008). Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. *Journal of Shellfish Research*, 27(5). doi: 10.2983/0730-8000-27.5.1129
- Roe, J. H., Bailey, J. M., Gray, R. R., Robinson, J. N. (1961). Complete removal of glycogen from tissues by extraction with cold trichloroacetic acid solution. *Journal of Biological Chemistry*, 236(5), 1244-1246.
- Samain, J. F., Degremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., ... & Boudry, P. (2007). Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*, 268(1-4), 227-243.

- Sato, N., & Murata, N. (1988). Membrane lipids. In *Methods in enzymology* 167: 251-259.
- Skelton, B. M., McKay, WJG., Yang, K., Wu, Z., & Jeffs, A. G. (2021). Investigation of the potential of liposome and microparticulate feeds to partially replace microalgae in the nursery rearing of green-lipped mussels (*Perna canaliculus*). *Aquaculture Nutrition*, 27(5): 1730–1737. doi: 10.1111/ANU.13310
- Smith, P. E., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., ... & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85.
- Soudant, P., Moal, J., Marty, Y., & Samain, J. F. (1996). Impact of the quality of dietary fatty acids on metabolism and the composition of polar lipid classes in female gonads of *Pecten maximus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 205(1-2), 149-163.
- Southgate, P. C., & Lou, D. C. (1995). Improving the n - 3 HUFA composition of Artemia using microcapsules containing marine oils. *Aquaculture*, 134(1–2). doi: 10.1016/0044-8486(95)00037-3
- Tanyaros, S., & Chuseingjaw, S. (2016). A partial substitution of microalgae with single cell detritus produced from seaweed (*Porphyra haitanensis*) for the nursery culture of tropical oyster (*Crassostrea belcheri*). *Aquaculture Research*, 47(7): 2080–2088. doi: 10.1111/are.12662
- Thunberg, C. P. (1793). Tekning och Beskrifning på en stor Ostronsort ifrån Japan. Kongliga Vetenskaps Academiens Nya Handlingar. 14(4-6): 140-142, 1, disponible en línea en <https://www.biodiversitylibrary.org/page/46957303>
- Toledo-Cuevas, E. M., Moyano López, F. J., Ramírez, D. T., Strüssmann, C. A., Álvarez-González, C. A., Martínez-Chávez, C. C., & Martínez-Palacios, C. A. (2011). Development of digestive biochemistry in the initial stages of three cultured Atherinopsids. *Aquaculture Research*, 42(6), 776-786.
- Uchida, M. (1996). Formation of Single Cell Detritus Densely Covered with Bacteria during Experimental Degradation of Laminaria japonica Thalli. *Fisheries science*, 62(5): 731-736.
- Uchida, M., & Murata, M. (2002). Fermentative preparation of single cell detritus from seaweed, *Undaria pinnatifida*, suitable as a replacement hatchery diet for unicellular algae. *Aquaculture*, 207(3–4): 345–357. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00792-X
- Uchida, M., & Murata, M. (2004). Isolation of a lactic acid bacterium and yeast consortium from a fermented material of *Ulva spp.* (Chlorophyta). *Journal of Applied Microbiology*, 97(6): 1297–1310. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02425.x
- Uchida, M., Numaguchi, K., & Murata, M. (2004). Mass preparation of marine silage from *Undaria pinnatifida* and its dietary effect for young pearl oysters. *Fisheries Science*, 70: 456–462. doi: 10.1046/j.1444-2906.2004.00825.x
- Ulrich, J. F., Redlich, S. B., Mohr, A., Vollmers, J., Petersen, J., & Wichard, T. (2026). Marine Rhodobacterales as Drivers of *Ulva* Growth: From macroalgal–bacterial Interactions to Bioactive Factor Isolation.
- Utting, S. D., & Millican, P. F. (1997). Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. In: *Aquaculture*. 155(1-4), 45-54.

- Valera-Mejias, A., & Barbosa Ortega, W. (2020). Captura, selección e ingestión de partículas en Ostreidae (Bivalvia): *Crassostrea* spp. *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura*, 2(3). doi: 10.33936/at.v2i3.3091
- Vezzulli, L., Stagnaro, L., Grande, C., Tassistro, G., Canesi, L., & Pruzzo, C. (2018). Comparative 16SrDNA gene-based microbiota profiles of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a shellfish farm (Ligurian Sea, Italy). *Microbial ecology*, 75(2), 495-504.
- Willer, DF., Furse, S., & Aldridge, D. C. (2020). Microencapsulated algal feeds as a sustainable replacement diet for broodstock in commercial bivalve aquaculture. *Scientific Reports*, 10(1). doi: 10.1038/s41598-020-69645-0
- Zhang, X., Li, Q., Kong, L., & Yu, H. (2018). DNA methylation frequency and epigenetic variability of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenesis. *Fisheries science*, 84, 789-797.

11. ANEXOS

Anexo A. Verificación de supuestos estadísticos

Tabla A1. Resultados de las pruebas de normalidad (Shapiro–Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene) aplicadas a las variables histoquímicas analizadas en el tejido conectivo vesicular de *Crassostrea gigas*.

Variable	Prueba	Estadístico	P	Interpretación
Fosfolípidos	Shapiro–Wilk	W = 0.94–0.98	< 0.05	No normal
	Levene	F = 7.91	< 0.001	Varianzas homogéneas
Triglicéridos	Shapiro–Wilk	W = 0.81–0.98	< 0.05 en algunos grupos	No normal
	Levene	F = 7.91	< 0.001	Varianzas heterogéneas
Carbohidratos	Shapiro–Wilk	W = 0.51–0.86	< 0.001	No normal
	Levene	F = 13.36	< 0.001	Varianzas heterogéneas

Nota: La normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro–Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene.

Tabla A2. Resultados de las pruebas de normalidad (Shapiro–Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene) aplicadas a las variables histoquímicas analizadas en la glándula digestiva de *Crassostrea gigas*.

Variable	Prueba	Estadístico	P	Interpretación
Fosfolípidos	Shapiro–Wilk (residuos)	W = 0.9757	< 0.001	No normal
	Levene	F = 1.1015	0.409	Varianzas homogéneas
Triglicéridos	Levene	F = 14.33	< 0.001	Varianzas heterogéneas
Carbohidratos	Levene	F = 7.47	< 0.001	Varianzas heterogéneas

Nota: La normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro–Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene.

Anexo B. Pruebas estadísticas aplicadas

Tabla B1. Resultados de la prueba de Mann–Whitney U aplicada para evaluar el efecto del tratamiento y del tiempo de muestreo sobre el contenido histoquímico en el tejido conectivo vesicular de *Crassostrea gigas*.

Variable	Comparación	W	P
Triglicéridos	Tratamientos	5842	$< 2.2 \times 10^{-16}$
	Día 28	653	1.77×10^{-9}
	Día 40	452	1.52×10^{-12}
	Día 52	578.5	$< 2.2 \times 10^{-16}$
Carbohidratos	Tratamientos	11433	$< 2.2 \times 10^{-16}$
	Día 28	875	1.22×10^{-6}
	Día 40	1297	0.008
	Día 52	1038	$< 2.2 \times 10^{-16}$
Fosfolípidos	Tratamientos	12619	3.41×10^{-14}
	Día 28	437	8.60×10^{-13}
	Día 40	961	1.08×10^{-5}
	Día 52	3502	0.117

Nota: Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

Tabla B2. Resultados de las pruebas estadísticas aplicadas para evaluar el efecto del tratamiento y del tiempo de muestreo sobre el contenido histoquímico en la glándula digestiva de *Crassostrea gigas*.

Variable	Comparación	Estadístico	Prueba	P
Triglicéridos	Tratamientos (total)	Mann–Whitney U	W = 5464.5	< 0.001
Triglicéridos	Día 28	Mann–Whitney U	W = 212	0.083
Triglicéridos	Día 40	Mann–Whitney U	W = 342	< 0.001
Triglicéridos	Día 52	Mann–Whitney U	W = 1473.5	< 0.001
Carbohidratos	Tratamientos (total)	Mann–Whitney U	W = 7872.5	< 0.001
Carbohidratos	Día 28	Mann–Whitney U	W = 214	0.078
Carbohidratos	Día 40	Mann–Whitney U	W = 1350	0.126
Carbohidratos	Día 52	Mann–Whitney U	W = 1097.5	< 0.001
Fosfolípidos	Tratamiento	ANOVA	F = 2.238	0.136
Fosfolípidos	Día	ANOVA	F = 2.918	0.056
Fosfolípidos	Tratamiento × Día	ANOVA	F = 2.040	0.132

Nota: La normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro–Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

Anexo C. Análisis de diversidad beta

Tabla C1. Resultados del análisis PERMANOVA de la estructura de la comunidad bacteriana basado en la distancia de Bray–Curtis.

Fuente de variación	Grados de libertad (Df)	Suma de cuadrados (SC)	R ² (variación explicada)	Estadístico F	p-valor
Modelo	1	0.355	0.643	7.196	0.100
Residual	4	0.197	0.357	–	–
Total	5	0.553	1.000	–	–

Nota: PERMANOVA = análisis de varianza permutacional multivariado. El valor de R² indica la proporción de variación explicada por el tratamiento.

Tabla C2. Análisis de homogeneidad de dispersión multivariada (betadisper) basado en la distancia de Bray–Curtis

Fuente de variación	Grados de libertad (Df)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	Estadístico F	p-valor
Grupos	1	0.051	0.051	3.278	0.144
Residuales	4	0.062	0.015	–	–

Nota: El análisis evalúa la homogeneidad de dispersión entre grupos, como supuesto del PERMANOVA.

Anexo D. Análisis de abundancia diferencial

Tabla D1. Filos bacterianos con abundancia diferencial significativa entre tratamientos determinados mediante DESeq2.

OTU	Filo	Base Mean	log2 FoldChange	lfcSE	stat	p-valor	p-valor ajustado
Otu15	Fusobacteriota	144.68	-2.29	0.29	-7.93	<0.001	<0.001
Otu146	Verrucomicrobiota	226.09	-2.29	0.63	-3.65	<0.001	0.002
Otu37	Bdellovibrionota	232.79	-2.22	0.50	-4.40	<0.001	<0.001
Otu2	Proteobacteria	129931.74	0.91	0.26	3.53	<0.001	0.003
Otu3	Bacteroidota	11499.56	1.07	0.25	4.27	<0.001	<0.001
Otu34	Actinobacteriota	1993.39	1.19	0.35	3.38	0.001	0.004

Nota: Valores positivos de log2FC indican mayor abundancia en el tratamiento Suplementos, mientras que valores negativos indican mayor abundancia en el tratamiento Control.

Tabla D2. Clases bacterianas con abundancia diferencial significativa entre tratamientos determinados mediante DESeq2.

OTU	Clase	Base Mean	log2 FoldChange	lfcSE	stat	p-valor	p-valor ajustado
Otu189	Moduliflexia	33.15	-8.12	2.51	- 3.23	0.001	0.005
Otu244	Acidimicrobiia	21.25	-7.48	1.80	- 4.14	<0.001	<0.001
Otu146	Chlamydiae	82.84	-5.69	1.43	- 3.97	<0.001	<0.001
Otu15	Fusobacteriia	1441.62	-2.37	0.26	- 9.22	<0.001	<0.001
Otu37	Bdellovibrionia	231.98	-2.29	0.43	- 5.28	<0.001	<0.001
Otu200	Verrucomicrobiae	142.38	-1.62	0.65	- 2.50	0.012	0.037
Otu11	Bacilli	6216.64	-0.89	0.36	- 2.44	0.015	0.040
Otu3	Bacteroidia	11183.43	0.99	0.25	4.05	<0.001	<0.001
Otu4	Alphaproteobacteria	34779.75	1.07	0.19	5.76	<0.001	<0.001
Otu34	Actinobacteria	1914.94	1.17	0.41	2.88	0.004	0.013
Otu71	Clostridia	423.43	1.73	0.55	3.13	0.002	0.007

Nota: Valores positivos de log2FC indican mayor abundancia en el tratamiento Suplementos, mientras que valores negativos indican mayor abundancia en el tratamiento Control.

Tabla D3. Familias bacterianas con abundancia diferencial significativa entre tratamientos determinadas mediante DESeq2.

OTU	Familia	Base Mean	log2 FoldChange	lfcSE	stat	p-valor	p-valor ajustado
Otu240	Chlamydiaceae	46.26	-8.78	2.32	-3.78	<0.001	0.001
Otu189	Moduliflexaceae	35.38	-8.39	2.73	-3.08	0.002	0.016
Otu209	Thalassobaculaceae	25.19	-7.90	2.88	-2.74	0.006	0.036
Otu366	Micrococcaceae	22.14	-7.72	2.67	-2.89	0.006	0.025
Otu244	Lamiaceae	19.35	-7.52	1.82	-4.13	0.004	0.001
Otu108	Saccharospirillaceae	181.18	-5.86	0.94	-6.23	<0.001	<0.001
Otu65	Terasakiellaceae	275.11	-3.12	0.68	-4.58	<0.001	<0.001
Otu15	Fusobacteriaceae	1672.11	-2.82	0.70	-4.01	<0.001	<0.001
Otu37	Bacteriovoracaceae	246.86	-2.69	0.69	-3.90	<0.001	0.001
Otu66	Moraxellaceae	246.56	-2.52	0.87	-2.89	0.004	0.025
Otu200	Rubritaleaceae	138.17	-2.31	0.80	-2.88	<0.001	0.025
Otu18	Oleiphilaceae	4161.02	2.26	0.59	3.83	0.001	0.001
Otu83	Parvibaculaceae	179.35	2.56	0.79	3.23	<0.001	0.010
Otu141	Anaerovoracaceae	71.00	3.64	0.85	4.28	<0.001	<0.001
Otu122	NA	96.85	3.89	1.04	3.74	<0.001	0.002
Otu63	Psychromonadaceae	407.17	5.08	0.72	7.03	<0.001	<0.001
Otu308	AB1	11.28	7.15	1.88	3.80	<0.001	0.001
Otu5	Xanthomonadaceae	15898.26	9.02	0.68	13.23	<0.001	<0.001
Otu116	Lentimicrobiaceae	79.62	9.97	1.66	6.02	<0.001	<0.001
Otu96	Stappiaceae	151.69	10.90	1.56	7.00	<0.001	<0.001

Nota: Valores positivos de log2FC indican mayor abundancia en el tratamiento Suplementos, mientras que valores negativos indican mayor abundancia en el tratamiento Control.

Tabla D4. Géneros bacterianos con abundancia diferencial significativa entre tratamientos determinadas mediante DESeq2.

OTU	Género	Base Mean	log2 FoldChange	lfcSE	stat	p-valor	p-valor ajustado
Otu5	<i>Stenotrophomonas</i>	15789.58	9.23	1.17	7.90	<0.001	<0.001
Otu37	<i>Halobacteriovorax</i>	196.12	-10.87	1.98	-5.48	<0.001	<0.001
Otu96	<i>Labrenzia</i>	150.70	10.85	1.98	5.47	<0.001	<0.001
Otu108	<i>Oleibacter</i>	136.37	-10.35	2.05	-5.05	<0.001	<0.001
Otu127	<i>Paraglaciecola</i>	86.22	10.04	2.00	5.03	<0.001	<0.001
Otu116	NA	78.79	9.91	2.03	4.89	<0.001	<0.001
Otu63	<i>Psychromonas</i>	405.63	5.05	1.19	4.23	<0.001	0.001
Otu252	<i>Aestuariicoccus</i>	22.06	8.07	2.11	3.82	<0.001	0.003
Otu284	<i>Haloferula</i>	28.47	-8.08	2.10	-3.84	<0.001	0.003
Otu240	NA	50.50	-8.91	2.43	-3.66	<0.001	0.004
Otu47	<i>Leisingera</i>	722.31	4.27	1.18	3.63	<0.001	0.005
Otu244	<i>Iamia</i>	19.02	-7.51	2.11	-3.56	<0.001	0.006
Otu176	<i>OM60(NOR5)_clade</i>	52.14	-7.04	2.09	-3.36	0.001	0.011
Otu308	NA	11.21	7.10	2.18	3.26	0.001	0.014
Otu157	NA	80.95	-5.92	1.84	-3.21	0.001	0.016
Otu189	NA	39.15	-8.55	2.72	-3.15	0.002	0.018
Otu119	<i>Litoribrevibacter</i>	55.76	-4.12	1.32	-3.12	0.002	0.019
Otu262	<i>Acinetobacter</i>	34.59	-4.85	1.59	-3.04	0.004	0.023
Otu278	NA	8.90	-6.41	2.21	-2.91	0.004	0.034
Otu141	NA	70.75	3.64	1.27	2.87	0.004	0.037
Otu200	<i>Persicirhabdus</i>	58.55	-4.59	1.61	-2.85	0.004	0.037
Otu61	<i>Pseudooceanicola</i>	102.76	-5.30	1.91	-2.78	0.005	0.041
Otu77	<i>Owenweeksia</i>	99.76	-5.47	1.96	-2.79	0.005	0.041
Otu209	<i>Thalassobaculum</i>	22.85	-7.77	2.79	-2.79	0.005	0.046
Otu122	NA	96.72	3.78	1.39	2.71	0.007	0.046
Otu285	<i>Aquamicrobium</i>	16.86	-7.33	2.70	-2.72	0.007	0.046
Otu65	NA	283.61	-3.19	1.18	-2.70	0.007	0.046
Otu234	<i>Celeribacter</i>	17.05	-7.35	2.75	-2.67	00.08	0.48

Nota: Valores positivos de log2FC indican mayor abundancia en el tratamiento Suplementos, mientras que valores negativos indican mayor abundancia en el tratamiento Control.