

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



VALIDACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE CÁMARAS
RESPIROMÉTRICAS PARA EVALUAR EL CONSUMO DE OXÍGENO Y
EXCRECIÓN DE AMONIO EN TILAPIA (*Oreochromis niloticus* var. *Spring*)
BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

FERNANDO BARRETO CURIEL

Ensenada, Baja California, México, Julio 2012

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

DISEÑO Y ESTANDARIZACION DE CÁMARAS RESPIROMÉTRICAS
PARA LA EVALUACION DEL CONSUMO DE OXÍGENO Y EXCRECIÓN DE
AMONIO EN TILAPIA (*Oreochromis niloticus* var. *Spring*) BAJO CONDICIONES
DE ESTRÉS

T E S I S

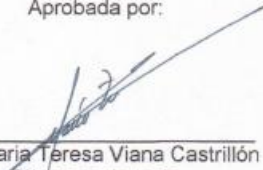
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

FERNANDO BARRETO CURIEL

Aprobada por:



Dra. Maria Teresa Viana Castrillón
Directora de tesis



Dr. Juan Gabriel Correa Reyes
Sinodal



Dr. Albert G. J. Tacon
Sinodal

RESUMEN de tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias que presenta **FERNANDO BARRETO CUIEL** como requisito para su titulación al posgrado de **ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**, con orientación en **NUTRICIÓN Y FISIOLOGÍA**. Ensenada, Baja California, México. Julio 2012

**VALIDACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE CÁMARAS
RESPIROMÉTRICAS PARA EVALUAR EL CONSUMO DE OXÍGENO Y
EXCRECIÓN DE AMONIO EN TILAPIA (*Oreochromis niloticus* var. *Spring*)
BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS**

Resumen aprobado por:

Dra. María Teresa Viana Castrillón

Las cámaras respirométricas son una herramienta utilizada para conocer el consumo de oxígeno y excreción de amonio en organismos acuáticos, variables que son llamadas tasas fisiológicas y contribuyen al presupuesto energético. A partir de modelos comerciales y no convencionales se reprodujeron cámaras para respirometría, las cuales contaron con flujo en recirculación de manera individual y filtros biológicos. Es así que en el presente trabajo se realizó el diseño, instalación y estandarización de seis cámaras respirométricas, con una capacidad de 141.0 ± 0.5 L. Se logró que las cámaras respirométricas contaran con un flujo constante y una eficiente homogeneización del agua necesaria para poder medir variaciones en el consumo de oxígeno de 0.40 ± 0.10 a 0.19 ± 0.01 $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} 100\text{g bh}^{-1}$ en distintas salinidades, de 0.36 ± 0.023 a 0.175 ± 0.042 $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} 100\text{g bh}^{-1}$ bajo estrés térmico y de 0.28 ± 0.03 a 0.25 ± 0.012 $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} 100\text{g bh}^{-1}$ al disminuir la saturación de oxígeno. Con el fin de validar y estandarizar las cámaras se llevó a cabo un experimento para medir el consumo de oxígeno y producción de amonio, utilizando a la tilapia *Oreochromis niloticus* var. *spring* a través de un diseño experimental en bloques por tiempos. Se midió el consumo de oxígeno y excreción de amonio en organismos aclimatados y no aclimatados a ambientes con distintas salinidades (0.6, 15 y 25‰) y en organismos no aclimatados a distintas temperaturas (20, 27 y 34 °C) y concentración de oxígeno (3, 5 y 7 mg/L). Con los datos obtenidos se estimó la relación atómica oxígeno: nitrógeno (O:N) en cada ambiente. El diseño de las cámaras que se propuso resultó eficiente para conocer las dos tasas fisiológicas antes mencionadas. Los organismos aclimatados presentaron una respuesta diferente a los no aclimatados. Se encontró efecto significativo con la variable de salinidad y temperatura. Sin embargo, no se observó un efecto en las 3 concentraciones de oxígeno para el consumo y

excreción de amonio. Las tilapias sometidas a 0 y 15‰ mostraron el mayor consumo de oxígeno (0.31 ± 0.11 y 0.40 ± 0.10 mg O_2 h^{-1} 100g bh^{-1} , respectivamente). La mayor excreción de amonio se presentó en las respirometrías realizadas a 27 y 34 °C (0.30 ± 0.19 y 0.36 ± 0.02 mg NH_4 h^{-1} 100g bh^{-1}). Los resultados de la relación atómica O:N para organismos aclimatados a ambientes con diferentes salinidades sugieren la utilización de proteína como sustrato para la obtención de energía, en tanto que en organismos no aclimatados se presentó un mayor consumo de carbohidratos y lípidos. En los organismos expuestos a las diferentes temperaturas la relación O:N obedeció a un consumo de proteínas y lípidos, mientras que en organismos expuestos a diferentes concentraciones de oxígeno presentaron un mayor consumo de lípidos y carbohidratos. Se concluye que las cámaras respirométricas funcionan adecuadamente y mediante su utilización fue posible detectar cambios metabólicos en las tilapias, los cuales fueron en respuesta a la exposición a diferentes condiciones de cultivo y estrés.

ABSTRACT of thesis for the degree of Master of Science presents **FERNANDO BARRETO CURIEL** as a prerequisite for the graduate degree **MOLECULAR ECOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**, with specialization in **NUTRITION** and **PHYSIOLOGY**. Ensenada, Baja California, México. July 2012.

VALIDATION AND STANDARIZATION OF RESPIROMETRIC CHAMBERS FOR THE EVALUATION OF OXYGEN CONSUMPTION AND AMMONIA EXCRETION OF THE TILAPIA (*Oreochromis niloticus* var. *Spring*) UNDER STRESS CONDITONS

The respirometric chambers are an important tool in nutrition research used to calculate the physiological rates to study the energetic budget through the measurement of oxygen uptake and ammonia excretion. In the present work, commercial and non-conventional models chambers for respirometry in aquatic organisms were reproduced and adapted to be used in recirculation flow-through independent systems with biological filters. Thus, six respirometric chambers with a capacity of 141.0 ± 0.5 L were design, installed and standardized, with a constant flow and water homogenization needed to detect the variations in the oxygen uptake from 0.40 ± 0.10 to 0.19 ± 0.01 $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} 100\text{g bh}^{-1}$ in different salinities, from 0.36 ± 0.023 to 0.175 ± 0.042 $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} 100\text{g bh}^{-1}$ under thermal stress and from 0.28 ± 0.03 to 0.25 ± 0.012 $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} 100\text{g bh}^{-1}$ when the oxygen concentrations were diminished. To validate and standardize the chambers, an experiment was carried out to measure the oxygen uptake and ammonia production, using tilapia *Oreochromis niloticus* var. *Spring* in a block design by times. The oxygen uptake and ammonia excretion were measured in organism acclimated and without acclimatization to environments with different salinities in the water (0.6, 15 y 25‰) and/or different temperatures (20, 27 y 34 °C) and oxygen concentrations (3, 5 y 7 mg/L). The obtained data were used to calculate the atomic relation oxygen:nitrogen (O:N) in every environment. The designed chambers were able to show an efficient measurement of the oxygen uptake and ammonia production. The acclimated organisms showed a different response respect to the no-acclimated organisms. Temperature and salinity significantly affected the oxygen uptake and ammonia excretion, whereas oxygen concentration had no effect. Organisms under 0 y 15‰ showed the highest oxygen uptake (0.31 ± 0.11 and 0.40 ± 0.10 $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} 100\text{g bh}^{-1}$, respectively). The higher ammonia excretion was found in respirometries performed at 27 y 34 °C (0.30 ± 0.19 and 0.36 ± 0.02 $\text{mg NH}_4 \text{ h}^{-1} 100\text{g bh}^{-1}$), respectively. The atomic rate of O:N for acclimated organisms to environments with different salinities suggest the utilization of proteins as energy source whereas the no-acclimated organisms used carbohydrates and lipids as the main nutrients. However, the organisms exposed to different temperatures the O:N rate showed that lipids and proteins consumption in so far the main energy

sources. However, when exposed to different oxygen concentration a higher lipids and carbohydrates are used. It was conclude that the respirometric chambers adapted here, where able to function correctly and their use made possible to detect metabolic changes in fish exposed to different stress conditions.

Dedicatorias

A Dios, por ser mi principal guía, por darme la fuerza necesaria para salir adelante y lograr alcanzar esta meta.

*A mis padres: José Barreto y Rosalba Curiel
por enseñarme a luchar hacia delante, por su
gran corazón y capacidad de entrega, pero
sobre todo por enseñarme a ser responsable,
gracias a ustedes he llegado a esta meta.*

*A mis hermanos: José, Francisco y Zaira: por
su gran cariño y apoyo me que ofrecieron
durante todo este tiempo.*

*A mi isla Ceres Anabel, por el gran apoyo brindado durante este tiempo así como
también por ese gran amor, mil gracias.*

Agradecimientos

Al **CONACYT** por otorgarme una beca durante mi estancia en la ciudad de Ensenada B.C. para realizar mis estudios de maestría.

Muy especialmente a mi directora de tesis, la **Dra. María Teresa Viana Castrillón** por aceptar ser la directora de esta tesis y ser mi guía en esta etapa de mi desarrollo profesional. Gracias por tenerme una gran confianza y así como también por corregir mi léxico durante mi estancia de maestría, mil gracias.....

A mis sinodales, el **Dr. Juan Gabriel Correa Reyes** y el **Dr. Albet Tacon**, por su tiempo brindado, sus recomendaciones y correcciones realizadas para llevar a buen término este trabajo de tesis.

A mi familia **Barreto** y **Curiel** en todo su esplendor, mil gracias, especialmente a mi tía **Mako**, por su gran apoyo constante, gracias.

A todos aquellos compañeros y amigos que hemos trabajado en el **Laboratorio de Nutrición y Fisiología Digestiva de Organismos Acuáticos**, en especial a Ariana Román, Daniel Badillo, Emanuel Martínez, Edith , Griselda Parés, Ivette Carrillo, Jaime García, Jorge Hernández, Marco Antonio Ponce, Martha Martínez, Moisés Marcial, Selene Herrera, Servando Rueda y Victoria. Les

agradezco su amistad y su constante retroalimentación científica, así como también todos los momentos gratos que hemos vivido juntos.

CONTENIDO

I.INTRODUCCIÓN	1
II.ANTECEDENTES	10
III.HIPÓTESIS	17
IV.OBJETIVO GENERAL	18
IV.1 OBJETIVOS PARTICULARES	18
V.MATERIALES Y MÉTODOS	19
v.2 Calibración del oxímetro	23
V.3 Obtención de organismos	25
V.4 Consumo de oxígeno	29
V.5 Excreción de amonio	30
V.6 Razón atómica Oxígeno-Nitrógeno (O:N)	30
V.7 Análisis Estadístico	32
VI.RESULTADOS	33
VI.1 Consumo de oxígeno	33
VI.2 Excreción de amonio	36
VI.3 Relación atómica O:N	39
VII.DISCUSIÓN	43
VII.1 Consumo de oxígeno	47
VII.2 Excreción de amonio	50
VII.3 Relación atómica O:N	52

VIII.CONCLUSIONES	55
IX.RECOMENDACIONES	57
X.BIBLIOGRAFÍA CITADA	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Cámara respirométrica instalada en el laboratorio.....	19
Figura 2.- Diseño del sistema de recirculación en las cámaras respirométricas...	21
Figura 3.- Sistema de platinación para electrodos de oxígeno1302.....	22
Figura 4.- Unidades experimentales en recirculación con una capacidad de 500L.	27
Figura 5.- Cámara respirométrica para determinar el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada de organismos acuáticos	29
Figura 6.- Valores promedios y desviación estándar del consumo de oxígeno de la tilapia <i>Oreochromis nilotica</i> var. Spring a 0, 15 y 25 ‰ de salinidad sin aclimatación (●) y después de haber sido aclimatada durante 3 días (▲). Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$).	34
Figura 7.- Valores promedios y desviación estándar del consumo de oxígeno de la tilapia <i>Oreochromis nilotica</i> var. Spring a 20, 27 y 34 °C de temperatura. Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$).	35
Figura 8.- Valores promedios y desviación estándar del consumo de oxígeno de la tilapia <i>Oreochromis nilotica</i> var. Spring sometida a diferentes concentraciones de oxígeno (3, 5 y 7 mg/L). Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$).	36

Código de campo cambiado

Figura 9.- Valores promedios y desviación estándar de excreción de amonio de la tilapia <i>Oreochromis nilotica</i> var. Spring sometidas a diferentes salinidades (0, 15 y 25 ‰) sin aclimatación (●) y con aclimatación (▲). Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$).	37
Figura 10.- Valores promedios y desviación estándar de la excreción de amonio de tilapias <i>Oreochromis nilotica</i> var. Spring sometidas a diferentes temperaturas (20, 27 y 34 °C) . Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$).	38
Figura 11.- Valores promedios y desviación estándar de excreción de amonio de la tilapia <i>Oreochromis nilotica</i> var. Spring al ser sometidas a diferentes concentraciones de oxígeno (3, 5 y 7 mg/L). Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$).	39
Figura 12.- Valor promedio de la relación atómica O:N de tilapias <i>Oreochromis nilotica</i> var. Spring sometidas a distintas concentraciones de salinidad (0, 15 y 25 ‰) sin aclimatar y después de haber sido aclimatados durante 3 días. Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$).	40
Figura 13.- Valor promedio de la relación atómica O:N de la tilapia <i>Oreochromis nilotica</i> var. Spring a 20, 27 y 34 °C de temperatura. Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$).	41

Figura 14.- Valor promedio de la relación atómica O:N de tilapias *Oreochromis nilotica* var. Spring sometidas a diferentes concentraciones de oxígeno (3, 5 y 7 mg/L). Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$). 42

LISTA DE CUADROS

Cuadro1.- Análisis proximal del alimento balanceado, utilizado para la alimentación de las tilapias proporcionado por la empresa Malta Clayton.	26
Cuadro 2.- Diseño experimental para la calibración de cámaras respirométricas a distintas temperaturas.	28
cuadro 3.- Valores estimados por Mayzaud y Conover (1988), para describir la fuente energética utilizada para su crecimiento.	31

I. INTRODUCCIÓN

Los organismos acuáticos, han sido muy importantes como proveedores de alimentos desde tiempos remotos debido a que representan el 70% del total de las especies animales del planeta (McKinney, 1998). Sin embargo, las pesquerías han disminuido drásticamente, por lo que se ha visto la necesidad de incrementar su cultivo para resolver el problema de la falta de alimentos. Es así que la acuicultura ha tomado importancia a nivel mundial y actualmente el 36.9% del consumo de organismos acuáticos proviene de la acuicultura (FAO, 2010).

En México, de igual manera se han venido implementado programas para incrementar la producción acuícola. Entre las especies consideradas dentro de programas de fomento, están las de nuevo desarrollo que prometen cultivos exitosos, o bien, aquellas especies que ya son comerciales pero que requieren potencializar su eficiencia y así mejorar las condiciones de cultivo.

Uno de los aspectos más importantes para hacer más eficiente su crecimiento y producción de las especies, es el conocer, aparte de su digestibilidad, el presupuesto energético, en donde se establece el gasto energético de cada una de las especies bajo ciertas condiciones de temperatura, salinidad y calidad del agua con relación a un alimento determinado. Para llevar a cabo este tipo de estudios es necesario contar con un sistema de respirometría, en donde se puedan simular las condiciones requeridas en un sistema cerrado o abierto que nos permita medir el consumo de oxígeno por gramo de pez.

La tilapia es una especie que no es endémica de México, sin embargo su cultivo se ha propagado con buenos resultados por todo el país desde hace ya más de 47 años (FAO, 1989), al grado que ya forma parte de las estadísticas nacionales en cuanto a acuacultura y pesquería.. Con la finalidad de incrementar el valor de esta especie en condiciones de cultivo, se han desarrollado diferentes variedades con mejores rendimientos de producción de carne (Garduño-Lugo *et al.*, 2003; Eknath *et al.*, 2007), crecimientos más acelerados, y variedades resistentes al frío, entre otras características deseables para su producción y comercialización. En México, uno de los problemas que se presenta para intensificar aún más su cultivo, es el hecho de que no haya cuerpos de agua dulce disponibles, sobre todo en las áreas del Centro-Norte y Norte del país en donde hay grandes extensiones territoriales pero con recursos de agua escasos.

El Centro de investigación de Noruega (NOFIMA, por sus siglas en inglés) desarrollo una variedad de tilapia con una aparente resistencia al frío y a la salinidad. Esta característica convierte a esta variedad en una especie atractiva para su cultivo en la zona de Baja California, una zona en la que hay una gran extensión de litoral con poca disponibilidad de agua dulce y salobre. Aunado a la poca disponibilidad, la elevada concentración de sales en los cuerpos de agua existentes en esta región ha provocado inclusive, que otras actividades económicas como la agricultura se vean afectadas debido a esta razón.

Si bien existen registros que demuestran que la tilapia es capaz de habitar en un medio ambiente marino (Riedel *et al.*, 2002), se ha visto que éstos organismos no necesariamente presentan un crecimiento semejante a los que se desarrollan en agua dulce.

La tilapia es un pez teleósteo y relativamente herbívoro, de aguas cálidas, con requerimientos bajos de proteína. Su carne es muy apreciada, ya que presenta un buen mercado además presentar un rápido crecimiento y facilidad para la reproducción (Fiess *et al.*, 2007), haciendo estas características su cultivo rentable comparado con especies carnívoras (Trucha y Lobina).

La tolerancia a la salinidad se define como la capacidad de los organismos para adaptarse en un tiempo relativamente corto, a los cambios de salinidad del medio ambiente. A los organismos con una amplia tolerancia a la salinidad se les denomina como osmoconformadores y se clasifican como eurihalinos. Entre este tipo de organismos se encuentran todas aquellas especies que viven en zonas estuarinas, las cuales están expuestas a cambios de salinidad y temperatura entre el verano e invierno. Por lo general, estas zonas están expuestas a una época de lluvia determinada, seguida por calores intensos durante periodos considerables (Rico, 2000).

Para llevar a cabo la adaptación a medios salinos, los organismos realizan la función de osmoregulación, la cual se define como el proceso que regula la presión osmótica que se ejerce a través de una membrana con el fin de mantener un equilibrio (homeostasis) de electrolitos y fluidos (Greenwell *et al.*, 2003). En los seres vivos se realiza de varias maneras y a distintos niveles. Una de las maneras

y la más simple, es a través de la membrana celular con la participación de la Na^+ y la K^+ -ATPasa. Esta última, es una proteína transmembranal que actúa como un transportador de intercambio de iones, en donde la transferencia es simultánea en ambas direcciones, utiliza ATP como fuente de energía y presenta una relación lineal con respecto a la salinidad ambiental, regulando así la concentración de sales (Arjona *et al.*, 2005). En este tipo de proceso al ser utilizado el ATP, los organismos expuestos a distintas concentraciones salinas tienen un gasto energético diferencial, aunado a un posible gasto ocasionado por un estrés fisiológico (Kidder *et al.*, 2006; Martínez-Porchas *et al.*, 2009). Esto repercute en una serie de inconvenientes tales como una disminución de la tasa digestiva, (al verse afectada la actividad de enzimas digestivas), una absorción de nutrientes vía intestinal, entre otros., y por consiguiente esto se traduce en una eficiencia alimenticia menor.

Al igual que la salinidad, la temperatura juega un papel muy importante, ya que afecta la fisiología y el metabolismo, acarreando problemas en el crecimiento y la reproducción en cualquier especie acuática (Sayed y Kawanna, 2008). La tilapia se clasifica dentro de los organismos euritermos, ya que soporta variaciones de temperatura. Por ello, esta especie se cultiva en aguas tropicales, subtropicales y templadas obteniéndose una tolerancia de 25 a 32 °C, dependiendo de la variedad de especie y talla (Chervinski, 1982; Hofer y Watts, 2002). Sin embargo, aún cuando esta especie tolera una amplia variación de temperatura, ésta, de alguna manera, podrá afectar la tasa de crecimiento al aumentar o disminuir la tasa metabólica (Via *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 2008).

Cualquier gasto de energía dentro de un organismo puede ser medido realizando estudios de bioenergética. Estos estudios nos permiten describir, explicar y predecir la condición fisiológica del organismo en un medio de cultivo mediante el cálculo de la energía consumida, gastada y/o asimilada dentro del organismo (balance energético). La medición de estas variables en un estudio donde grupos de organismos se sometan a condiciones distintas comparadas con un grupo bajo condiciones ideales nos permitirá evaluar el gasto extra de energía que ocasione dicho factor. Es así que el presupuesto o balance energético sirve para comparar el consumo de energía de las diferentes rutas metabólicas bajo condiciones controladas (Lucas, 1996). Este tipo de experimentación, al medir el crecimiento y gasto de energía en ayuno, nos permite determinar el gasto asociado a la digestión y metabolismo con respecto a la eficiencia de asimilación, así como para explicar y predecir su condición fisiológica (Bayne *et al.*, 1976).

La investigación sobre el balance energético en peces se inició con los trabajos de Ivlev (1939) y Winberg (1956). Sin embargo más tarde Klekowski y Duncan (1975) propusieron un modelo de balance energético, el cual es aceptado por la comunidad científica. El modelo, que se describe en la Ec. 1, integra las tasas fisiológicas de los peces, expresado en unidades de energía:

$$I = P + R + U + F \quad (1)$$

Donde **I** es la energía contenida en el alimento ingerido, **P** es la energía destinada a la producción (crecimiento) o energía como biomasa, **R** es la energía

por respiración como resultado de lo que se invierte en los procesos de mantenimiento metabólico; **U** es la energía que se encuentra en los desechos metabólicos nitrogenados y **F** corresponde a la energía que se encuentra dentro de las heces fecales (la cual no fue asimilada por el organismo).

Posteriormente, Beamish y Trippel (1990) añadieron un nuevo término a la Ec. (1), el cual es conocido como incremento de calor (IC). Este término se refiere a la energía metabólica que se gasta durante los procesos siguientes a la absorción de los componentes del alimento ingerido. Sin embargo, la obtención de este término es complicado en organismos acuáticos, ya que no se puede establecer un límite entre el requerimiento de energía para los aspectos mecánicos de la alimentación y el comienzo de la liberación de energía para sus diferentes rutas metabólicas. Por ello se optó por llamarlo el incremento aparente de calor (ICA), por lo que la ecuación (1) fue modificada y se expresó de la siguiente manera:

$$P = I - (R + H + U + ICA) \quad (2)$$

Para poder obtener los resultados en términos de energía, se necesita realizar una conversión del oxígeno consumido y el amonio excretado. A esto se le conoce como índice oxicalórico y nitrocalórico. Para el oxígeno, el equivalente oxicalórico es de 3.36 Kcal mg⁻¹ O₂ y fue propuesto por Beamish *et al.* (1975), y el equivalente nitrocalórico emplea un valor de 5.7 Kcal mg⁻¹ NH₄ (Niimi y Beamish,

1974). Para obtener los valores energéticos de ingestión y heces, se utiliza una bomba calorimétrica, la cual nos da el contenido calórico en las muestras.

Como parte complementaria al consumo de energía, el calcular la relación atómica entre oxígeno y nitrógeno a partir del gasto en respiración (O) y producción de amonio (N), dentro del agua bajo condiciones controladas, (O:N), nos permite conocer qué tipo de sustrato (carbohidratos, proteínas o lípidos) está siendo utilizado para la obtención de energía en un ambiente adverso. Esta relación también puede ser utilizada como indicador de estrés (Zheng *et al.*, 2008).

Si la relación O:N refleja valores de 1 a 16, se estima que el organismo está accediendo a obtener su energía del sustrato proteico,, lo cual da lugar a que el organismo se encuentre bajo estrés. Si se encuentra una relación de 50 a 60 la energía se obtiene de un consumo de lípidos y proteína en el mismo porcentaje, y para obtener energía neta de carbohidratos se necesita tener una relación mayor a 60. El uso preferente de carbohidratos como sustrato energético representa que el organismo no se encuentra estresado y la proteína está siendo destinada hacia crecimiento. Mediante la revisión de diferentes trabajos, Mayzaud y Conover (1988) realizaron una estimación teórica para la relación O:N, considerando las suposiciones y cálculos teóricos utilizados por la mayoría de los autores y relacionando los procesos metabólicos con el ambiente en que se realizaron.

Para realizar este tipo de estudios de metabolismo energético es necesario contar con cámaras respirométricas o metabólicas, en las cuales es posible medir en un tiempo determinado la concentración de oxígeno y la excreción de amonio situados en un ambiente controlado, ya sea en un sistema o abierto o cerrado.

Dichas cámaras fueron desarrolladas a partir de estudios en nutrición animal para especies domésticas, en donde a través del aislamiento, organismos en reposo eran evaluados para medir la liberación de CO₂, y se calculaba el calor generado y cantidad de excretas producidas.

Estas cámaras se han ido desarrollando a tal grado que, actualmente, cuentan con sensores capaces de medir el desprendimiento de calor, la tasa respiratoria, la tasa cardíaca, entre otros., inclusive se han podido registrar pequeños cambios de respiración entre tratamientos al existir una variación en el alimento proporcionado y la temperatura medio ambiental.

Las cámaras respirométricas son costosas y por consecuencia, es difícil tener acceso a este tipo de equipos. Para especies acuáticas las cámaras respirométricas han evolucionado en términos de diseño, tamaño y modificaciones para la inserción de los electrodos de medición de oxígeno y producción de amonio en la columna de agua. En cuanto al diseño, Blazka *et al.*,(1960); Espina *et al.*, (1986); Díaz *et al.*, (1989); Valbuena *et al.*, (2006) y Díaz *et al* (2007), proponen sistemas respirométricos con diferentes capacidades, que van desde 500mL a 172 L. En el diseño de Valbuena *et al.*, (2006), las cámaras se acoplaron a dos depósitos de agua (400 y 250 L.), lo cual lo hace poco práctico.

Debido a la ausencia de un sistema que resulte práctico y eficiente , se decidió desarrollar una serie de cámaras de respirometría independientes, con flujo cerrado o abierto y control de temperatura individual, que permitieran realizar mediciones de parámetros como respiración y producción de amonio dentro del

laboratorio del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California.

Para fines de estandarización de las cámaras respirométricas se utilizó a la tilapia como un organismo modelo, al ser sometida a estrés por salinidad, temperatura y concentración de oxígeno. Esto con el fin de poder obtener el consumo de oxígeno, la tasa de excreción de amonio y la obtención de la relación atómica O:N; y a su vez poder estimar la fuente de energía utilizada para compensar el efecto del estrés bajo estas diversas condiciones.

II. ANTECEDENTES

Estudios de este tipo se han venido desarrollando desde hace muchos años, en dónde se ha tratado de contar con sistemas estáticos en donde después de determinado tiempo se pueda calcular el consumo de oxígeno, proceso que al utilizar un sensor continuo puede estar acoplado a un sistema de medición.

Sukumaran y Kutty (1977) utilizaron un sistema respirométrico modificado el cual mantuvo el mismo principio como el propuesto por Blazka (1960). Dicha modificación se basa en el contenido volumétrico, el cual varió de 7.5 a 1L. La cámara respirométrica propuesta por estos autores fue un contenedor cónico, el cual contaba con una bomba peristáltica para obtener un sistema en recirculación y un sensor de oxígeno YSI modelo 54 para la medición continua, sin embargo se tomaron alícuotas de 25 ml para determinar el consumo de oxígeno por el método de Winkler para corroborar sus datos de consumo de oxígeno.

Valbuena *et al.* (2006) construyeron un respirómetro de vidrio con dos extremos en forma cónica y dos lados rectos. Esta cámara cuenta con una capacidad de 172 L., una bomba sumergible para mantener el agua en continuo movimiento, un termostato y un sensor de oxígeno en la parte superior de la cámara. Para su llenado se utilizó un depósito de agua de 400 L, mismo que contaba con un filtro de grava, carbón activado y algodón sintético, comúnmente llamado guata. El agua filtrada fue almacenada en un contenedor de 250 L para después ser utilizada para llenar la cámara respirométrica por gravedad.

Posteriormente Díaz *et al.* (2007) propusieron un sistema respirométrico con capacidad para 20 organismos. Las cámaras en este sistema fueron matraces de 3 litros, colocados dentro de un baño María para establecer la temperatura en el interior de cada matraz. Los matraces estaban sellados con un tapón de caucho, el cual tenía una válvula en donde se permitía la entrada de agua aireada y la salida de agua con baja concentración de oxígeno. Además se tenía una entrada para permitir inflar un globo que desplazaba el agua interior del matraz, así, el agua podía salir por una válvula para leer la concentración de oxígeno en la muestra con un oxímetro YSI 52.

Larios-Toledo (2011) utilizó una cámara respirométrica estática similar a la descrita por Lingen (1995). Esta cámara estaba compuesta por 2 contenedores circulares de una capacidad de 160 L, uno de ellos esta designado para tanque de compensación y otro como cámara respirométrica, la cual se encontraba herméticamente sellada y sumergida en un recipiente de mayores dimensiones para establecer el principio de Baño María, el cual se encargaba de mantener una temperatura constante. En la tapa de acrílico se encontraba ubicado el sensor de oxígeno y una válvula de salida de agua.

Díaz-Herrera *et al.* (1992) evaluaron el consumo de oxígeno, excreción de amonio y osmoregulación en juveniles del cangrejo *Callinectes similis* al ser expuestos a salinidades fluctuantes, y encontraron que si bien, la salinidad no tuvo efecto significativo en el consumo de oxígeno y la relación atómica O:N, la excreción de amonio si varió significativamente al disminuir la salinidad de 35 ‰ a

26 ‰. Además encontraron que el patrón de osmoregulación en este organismo correspondió al de un organismo conformador. Variables similares fueron estudiadas para *Litopenaeus stylirostris* (Díaz-Herrera *et al.*, 2004) quienes encontraron tendencias similares en el consumo de oxígeno y excreción de amonio, misma que estuvo relacionada con la capacidad osmoreguladora del organismo.

Debido a la facilidad de su cultivo, existen diversos estudios realizados con tilapia, en donde se ha visto que el incremento en salinidad y temperatura afecta la reproducción y disminuye el crecimiento (Payne *et al.*, 1988). Para dar solución a esta problemática, se han obtenido híbridos de tilapia con resistencia a altas salinidades y cambios ambientales sin disminuir drásticamente su crecimiento (Mostofa y Mair, 2005). Adicionalmente, algunos trabajos de aclimatación han encontrado que la mejor resistencia a altas salinidades se logra cuando la tilapia llega a alcanzar 52 mm de longitud (Stickney, 1986).

Woo *et al.* (1997) evaluaron el crecimiento en la tilapia *Oreochromis niloticus* cultivada a 0, 15 y 30‰ y midieron distintos índices productivos como la concentración de enzimas digestivas (α -amilasa y tripsina), así como la hormona del crecimiento (GH) y la tirosina. Encontraron que a salinidad de 15‰ se obtuvo la mejor conversión alimenticia y por lo tanto un mejor crecimiento en comparación al obtenido bajo un ambiente de agua dulce ($p < 0.05$). De igual manera, la actividad de las enzimas digestivas fue mayor en esta misma salinidad, mientras que la hormona de crecimiento (GH) fue mayor en las tilapias expuestas a 30‰ de salinidad.

Iwama *et al.* (1997) midieron la tasa de consumo de oxígeno para la tilapia (*O. mossambicus* Peters) en agua dulce, de mar e hipersalina (1.6 x agua de mar), en donde encontraron que el menor consumo de oxígeno se observó en el agua de mar, ($78.6 \text{ mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) con respecto al agua dulce y al agua hipersalina. Estos autores concluyen que los resultados encontrados se relacionan con su fisiología adaptativa, ya que fueron capturados en un estuario al norte de Okinawa, Japón, donde se presentan grandes variaciones de salinidad y temperatura.

Mena-Herrera *et al.* (2002) evaluaron el efecto de la salinidad (0, 15, 25, 35‰) en el crecimiento de la tilapia roja híbrida (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*) en donde concluyen que conforme aumenta la salinidad, el crecimiento disminuye. Registraron hasta un 37% en decremento del crecimiento en salinidades de 35‰, comparada con los organismos cultivados en agua dulce, aún cuando esta variedad de tilapia puede ser cultivada hasta una salinidad de 15‰, al no presentar diferencias significativas ($p < 0.05$) en crecimiento comparada con las cultivadas en agua dulce.

Fiess *et al.* (2007) evaluaron los efectos ambientales de la salinidad y temperatura sobre la capacidad de osmoregulación, a través de la cuantificación de los osmolitos orgánicos y las hormonas presentes en el plasma de la tilapia mozambique (*O. mossambicus*). Estos autores concluyen que la tilapia presenta una cierta sensibilidad a la aclimatación tanto en salinidad (0, 35, 70‰) como en temperatura (20, 28, 35 °C), debido a que se encontraron alteraciones en la concentración de Na^+ , K^+ -ATPasa en branquias, en el metabolismo de la glucosa, y en la concentración de algunos osmolitos orgánicos (creatina, mio-

inositol, taurina y otros aminoácidos) en algunos órganos, así como diferencias en los perfiles de hormonas osmoreguladoras en el plasma.

Sayed y Kawanna (2008) realizaron un experimento para obtener la temperatura óptima de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) en sistemas de recirculación a diferentes temperaturas (24, 26, 28, 30 y 32 °C). En este estudio se observó que a 28 °C se obtuvo el mejor crecimiento ($p<0.05$) con relación al resto de los tratamientos.

Si bien el efecto de la salinidad y temperaturas con relación al crecimiento es conocido, al igual que algunos indicadores metabólicos, es un hecho que el consumo de oxígeno y excreción de amonio han sido muy poco estudiados en los peces, aunque existen trabajos realizados para diferentes crustáceos. En este sentido, Chen y Kou, (1996) evaluaron el efecto de la temperatura en el consumo de oxígeno y excreción de amonio en juveniles de langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) a diversas temperaturas (17, 22, 27 y 32 °C). Encontraron un aumento en el consumo de oxígeno y excreción de amonio conforme se incrementó la temperatura, así como diferencias significativas en cada una de ellas.

Zheng *et al.* (2008) estudiaron el efecto de la temperatura y la salinidad en el consumo de oxígeno y excreción de amonio de juveniles de un pez de la familia de los Sciaenidae, *Miichthys miiuy*, en donde se observaron marcadas diferencias entre los tratamientos conforme se incrementaron las temperaturas de 6 a 25 °C. Sin embargo, la excreción de amonio incrementó hasta los 20 °C, y disminuyó a los 25 °C en donde la relación atómica oxígeno nitrógeno (O:N) disminuyó y

evidenció un mayor consumo de carbohidratos sobre proteína. Con respecto a la salinidad, los mismos autores midieron la respuesta a tres diferentes salinidades (16, 26 y 31 ‰) en donde se observó que el consumo de oxígeno y excreción de amonio se mantuvo similar a 26 y 31 ‰ de salinidad, sin embargo presentó un mayor consumo de oxígeno y excreción de amonio con los organismos aclimatados a 16‰ ($p>0.05$).

La producción de tilapia se ha intensificado y tecnificado durante los últimos 10 años, utilizando estanques o jaulas, e incluso creciendo bajo ambientes marinos (Tayamen *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; Barrington, 2006; Sayed y Mamdouh, 2008). Sin embargo, hasta la fecha no hay estudios detallados que indiquen con precisión los diferentes flujos de energía que se presentan así como determinar el tipo de nutrientes mayormente consumidos en ambientes adversos o extremos.

Los estudios para medir la respiración y gasto energético son comunes en animales terrestres como puercos (Fahlman *et al.*, 2000), rumiantes (Fernández *et al.*, 2012), ratas (Koban y Swinson *et al.*, 2005) e incluso humanos (Scott 2008). Estos estudios se centran en el uso de sistemas conocidos como cámaras metabólicas, las cuales permiten mantener a los organismos en ambientes aislados y con condiciones controladas, en los cuales es posible determinar el consumo de oxígeno, excreción de CO₂, el calor desprendido e incluso el efecto de ciertos gases sobre un organismo en particular. En este sentido, las cámaras respirométricas utilizadas en experimentos con organismos acuícolas mantienen el mismo principio para medir el consumo de oxígeno en organismos confinados, ya

sea en flujo abierto o cerrado. Sin embargo para organismos marinos es poca la información que se tiene.

III. HIPÓTESIS

Si se logra obtener una cámara sellada herméticamente y que cuente con una adecuada homogenización de la columna de agua a través de un flujo cerrado, se podrá medir el consumo de oxígeno y producción de amonio de peces contenidos dentro de ella.

El cultivo de tilapias tiene condiciones de temperatura, salinidad y oxígeno óptimas para su desarrollo; si estas condiciones presentan variaciones entonces algunas respuestas fisiológicas, como el consumo de oxígeno y la excreción de amonio, serán modificadas como una medida de compensación al cultivo bajo condiciones de estrés.

IV. OBJETIVO GENERAL

Diseñar, validar y estandarizar cámaras respirométricas para evaluar el consumo de oxígeno y excreción de amonio de la tilapia (*Oreochromis niloticus* var. *Spring*) sometida a diferentes tipos de estrés.

IV.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Desarrollo de un sistema de cámaras respirométricas conectado a un sistema de recirculación de agua, en donde podamos mantener condiciones y calidad de agua adecuados para poder realizar ensayos.
- b) Determinar el consumo de oxígeno de la tilapia bajo condiciones de estrés por salinidad, temperatura y oxígeno.
- c) Medir la excreción de amonio de los organismos bajo condiciones de estrés por salinidad, temperatura y oxígeno.
- d) Conocer la razón atómica O:N en las diferentes condiciones experimentales.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

v.1 Desarrollo de cámaras respirométricas

Para el desarrollo de las cámaras respirométricas se tomó en consideración modelos comerciales de catálogos y experiencias previas después de varios años de estar utilizando un sistema con sensores de oxígeno. Anteriormente se utilizaban cámaras cilíndricas de acrílico, selladas herméticamente, en donde se colocaba un magneto en la parte inferior de la cámara, la cual se encontraba separada por una rejilla, cuya función era la mezcla del agua sin lastimar a los organismos. En esta ocasión, se pensó en generar una cámara estándar para introducir organismos de diferentes tamaños y poder mantener peces por un largo tiempo dentro de ella. La forma que se estableció para el desarrollo de esta cámara fue de un óvalo. Para la fabricación, se empleó un molde de madera con dicha forma, con la idea de generar una menor fricción del agua en el interior de las cámaras. Estas cámaras fueron fabricadas en fibra de vidrio; con tapa de policarbonato y con una capacidad volumétrica de 141.5 ± 0.5 L. El diseño de estas cámaras se basó en diferentes modelos comerciales y experimentales ya existentes en el mercado o reportadas en bibliografía. En la figura 1, se muestra una de las cámaras respirométricas desarrollada en nuestro laboratorio, la cual cuenta con una bomba sumergible con una capacidad de flujo de hasta 6,500 L/h. El mover el agua bajo estas condiciones genera una homogeneización apropiada en la columna de agua. Con el propósito de mejorar la dispersión de flujo en la

sección donde se encuentra el organismo, se desarrollaron dentro de la misma cámara capas concéntricas para dar lugar a dos direccionales de flujo a cada uno de sus extremos, estos direccionales fueron realizados con tubo de pvc cédula 40 de 30.5 cm de diámetro.

En la parte superior se colocó una tapa compuesta de policarbonato, en donde hay un orificio para introducir el electrodo Strathkelvin 1302, así como una válvula bola de PVC cedula 80 de 0.63 cm, esto con el fin de poder obtener muestras de agua para la determinación de amonio. En esta misma tapa se encuentra una ventana rectangular (30 x 15 cm) para introducir al organismo en el sistema respirométrico. Para el cierre hermético de estas cámaras se colocaron tornillos de acero inoxidable de 2.54 cm por 0.63 cm (largo-ancho); cada uno con sus respectivas rondanas y tuerca tipo mariposa, estas se encuentran al rededor da cada una de estas tapas y a una distancia de 5.0 cm de separación.

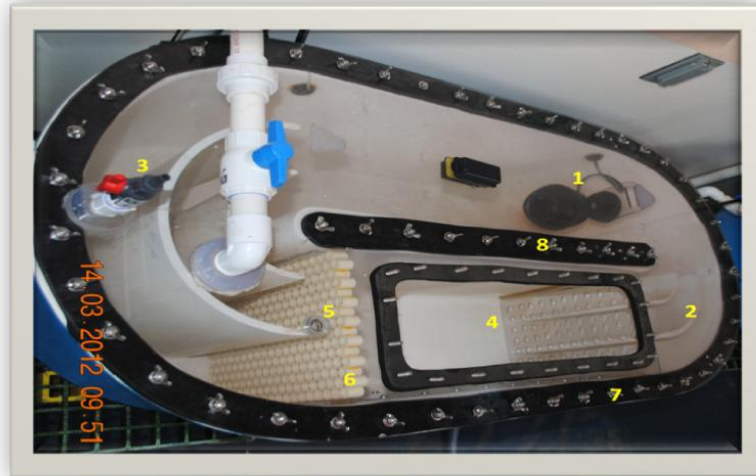


Figura 1.- Diseño de cámara respirométrica instalada en el laboratorio.

- 1.- Motor sumergible (Hydor Koralia 5) con una capacidad de mover un flujo de 6500 L/h, sujetado magnéticamente y conectado a 120 volts.
- 2.- Direccionales de flujo interior.
- 3.- Válvula bola de pvc cedula 40 de 0.63 cm
- 4.- Ventana de policarbonato
- 5.- Orificio para introducir el electrodo del oxímetro.
- 6.- Laminillas concéntricas.
- 7.- Tornillos de 2.54 cm por 0.63, con rondanas y tuercas tipo mariposa de acero inoxidable.
- 8.- Empaques de neopreno.

A estas mismas cámaras se les agregó un sistema para la recirculación del agua, con el fin de poder mantener las condiciones de temperatura y salinidad constantes. Este sistema de recirculación está compuesto por un tanque reservorio (1) con una capacidad de 40 L, una bomba de agua (Quiet One, modelo

4000) con una velocidad de flujo de 1,400 L/h (2) además de un biofiltro de Beads de 3 litros de medio (3) (Fig. 2). El agua es impulsada desde el reservorio por la bomba de agua a través de una tubería de PVC cedula 40 de 2.54 cm de diámetro hacia el biofiltro. La salida del biofiltro es conectada a la entrada de la cámara respirométrica (4), misma que tiene una salida en la tapa de policarbonato (5) y el agua es colectada en el reservorio. Es este mismo sistema se encuentran dos válvulas (2.54 y 1.27 cm) de retorno para el desfogue de la presión (6), así como una válvula de drenado de la cámara (7) para eliminar el agua del sistema al término de las mediciones respirométricas.



Figura 2.- Diseño del sistema de recirculación conectado a las cámaras respirométricas.

v.2 Calibración del oxímetro

El oxímetro que se utilizó para las mediciones fue de la marca Strathkelvin modelo 928 con 6 canales de medición, cada uno de ellos conectado a un electrodo marca Strathkelvin modelo 1302 y el cual a su vez era insertado en las cámaras respirométricas.

Para su correcto funcionamiento, se recomienda que los electrodos estén recién platinados; método que se realizó de la siguiente manera: El ánodo es limpiado con papel abrasivo del número 400, posteriormente este es enjuagado con agua destilada y secado con papel secante. Posteriormente, el electrodo es colocado durante 15 s dentro de una solución de ácido clorhídrico al 0.1 N; el electrodo es conectado a una batería de 1.5 V haciendo un puente con un cable de plata de 5-6 cm sostenido con la ayuda de una pinza tipo caimán (Fig. 1).

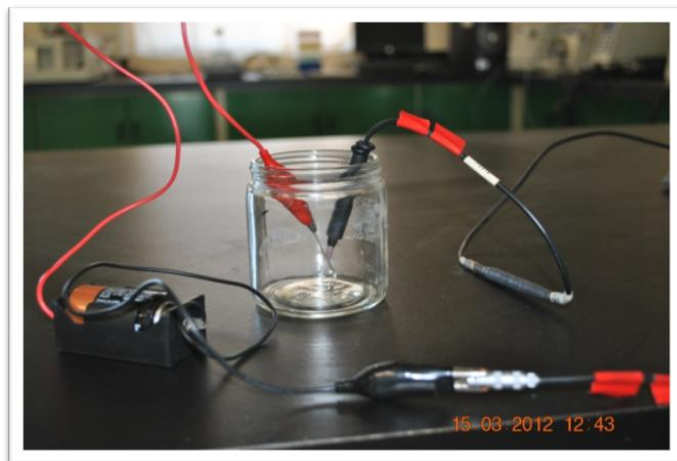


Figura 3.- Sistema de platinación para electrodos de oxígeno Strathkelvin modelo 1302.

De esta manera se forma el sistema de electrólisis, para la polarización del ánodo. Por último, el electrodo se enjuaga y se coloca dentro de una solución pobre de oxígeno (proporcionada por el fabricante), asegurándose que no se formen burbujas dentro de esta solución.

Una vez platinados los electrodos, se continuó con la calibración del equipo para cada uno de los experimentos, con ayuda de los valores establecidos por Benson y Krause (1984) en una tabla de solubilidad de oxígeno (mg/L) de agua dulce a agua de mar, así como también para cada temperatura, ya que por cada grado centígrado que aumente o disminuya en la cámara respirométrica cambiará la señal en un 2 o 3 % de su valor real. Estos valores son propuestos por el manual del Instruments Strathkelvin 928.

V.3 Obtención de organismos

La especie de tilapia híbrida que se utilizó es la *Oreochromis niloticus* variedad *Spring*, debido a que es una especie mejorada genéticamente la cual se comercializa ampliamente en diversos países. Dicho mejoramiento consiste en presentar genética aditiva para el crecimiento y una mayor tolerancia a temperaturas frías. Con base a esta última característica se piensa en obtener diferentes respuestas fisiológicas, así como beneficiar a la zona en la que nos encontramos, ya que las temperaturas son frías durante todo el año. Esta población de tilapia se originó a partir del material desarrollado por el proyecto GIFT (Genetic Improvement of Farmed Tilapia) de 1988-1997 en el Instituto Noruego de Investigación Acuática (AKVAFORSK) en Bergen, Noruega. Los alevines se adquirieron a través de la empresa TECNOPEZ S.P.R DE R.L. ubicada en el Rancho Biopotrerrillos en Medellín de Bravo, Veracruz los cuales son distribuidores autorizados en México.

A su llegada a nuestra institución , los alevines se aclimataron a una temperatura de 28°C y se colocaron en 3 estanques de 600 L a una razón de 1,000 organismos por unidad. Para mantener esta temperatura se utilizó un calentador sumergible de titanio marca viaAqua de 250 W para cada estanque.

Los organismos fueron alimentados con una dieta comercial (Malta Clayton, SA de CV). Su contenido proximal se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1.- Análisis proximal del alimento balanceado, utilizado para la alimentación de las tilapias proporcionado por la empresa Malta Clayton.

Análisis proximal* (%)	
Proteína cruda*	35.0
Grasa cruda*	6.0
ELN*	31.0
Cenizas**	13.0
Fibra**	3.0
Humedad**	12.0

* Garantizado a un mínimo contenido

** Garantizado a un máximo obtenido

Para la experimentación, los organismos fueron trasladados a 5 estanques de fibra de vidrio de 500 L de capacidad de agua y a una densidad de 20 peces por tanque, (1.2 m de diámetro y fondo cónico; Fig. 4). Las unidades experimentales, se encontraba en recirculación, con un filtro biológico de Beads con capacidad de 3 pies cúbicos, espumador, y a una bomba de agua marca Sweetwater modelo SHE2.4. La temperatura de cada sistema se mantuvo a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ por medio de un

calentador de titanio tipo bayoneta marca Process Technologies de 6,500 watts



Figura 1.- Unidades experimentales en recirculación con una capacidad de 500L.

Los peces se mantuvieron en las unidades experimentales hasta alcanzar un peso aproximado de 250 g para poder iniciar las respirometrías. Antes de cada inmersión en las cámaras, los organismos se llevaron al laboratorio de respirometría en recipientes de 20 L, para ser colocados en un estanque de 200 L con aireación para disminuir el estrés.

El consumo de oxígeno y la excreción de amonio se evaluaron bajo condiciones experimentales, es decir, sin previa aclimatación y bajo estrés. Se utilizó un diseño experimental bloqueado con el tiempo en donde cada día se corrieron los tres tratamientos distintos cuyas repeticiones eran los días de experimentación y con un cuarto tratamiento como control (Cuadro 2).

Cuadro 2.- Diseño experimental para la calibración de cámaras respirométricas a distintas temperaturas.

Experimento	Variablen	Tratamiento	Tipo de Agua	Tem. Exp.
1	Temperatura	20 °C	Agua dulce	Variante
		25°C		
		34°C		
2	Salinidad	0.6 ‰	Agua dulce + Agua de mar	27 ± 2 °C
		15 ‰		
		25 ‰		
3	Oxígeno	3 mg/l	Agua dulce	27 ± 2 °C
		5mg/l		
		7 mg/l		

Para alcanzar y mantener las temperaturas deseadas, se utilizaron calentadores sumergibles, hielo y agua caliente según el caso, durante la medición. Con respecto a los experimentos de salinidad se realizaron mezclas entre agua de mar y dulce, mientras que para disminuir el oxígeno en las cámaras se utilizó sulfito de sodio para secuestrar parte del oxígeno disuelto en el agua hasta llegar a la concentración deseada. Cabe mencionar que también se utilizó un calentador de gas externo para controlar la temperatura ambiental en el laboratorio para amortizar la temperatura de las cámaras.

Con el fin de comparar los parámetros de estrés y aclimatación, se realizó un segundo experimento con organismos aclimatados previamente a los distintos factores de estrés. Esta aclimatación se realizó a una razón de 5‰ día⁻¹ hasta alcanzar 15‰ y 25‰ (Mena-Herrera *et al.*, 2002), una vez establecida la salinidad,

los organismos se mantuvieron por 3 días para su estabilización fisiológica. Posteriormente estos organismos fueron trasladados al laboratorio de respirometría para determinar su consumo de oxígeno y excreción de amonio de igual manera que como se llevó a cabo en el Experimento I.

V.4 Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se midió dentro de las cámaras respirométricas (Fig. 2), en donde es insertado un electrodo de oxígeno conectado al oxímetro (Stranthkelvin 928) y éste a su vez a una computadora. La medición se realizó durante 1 hora tomando la lectura cada 30 s, o hasta que la concentración de oxígeno alcanzara el 30% de su concentración inicial para evitar un mayor estrés de los organismos (Stern *et al.*, 1984). Las unidades se expresaron en miligramos de oxígeno consumido por hora por 100 gramos de peso húmedo del organismo ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} 100\text{g ph}^{-1}$).



Figura 2.- Cámara respirométrica para determinar el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada de organismos acuáticos

V.5 Excreción de amonio

La excreción de amonio se midió simultáneamente a la determinación del consumo de oxígeno. Para ello se tomaron alícuotas de 10 mL de cada cámara respirométrica, al inicio y al término de la medición del consumo de oxígeno, y el amonio se determinó con un colorímetro portátil marca Hach modelo DR/890 siguiendo la metodología que marca el aparato y el cual tiene una precisión de ± 0.02 mg/L $\text{NH}_3\text{-N}$.

La técnica de medición se realizó a partir de la toma de 2 mL de muestra problema, agregando como primer reactivo Ammonia Salicylate y posteriormente Ammonia Cyanurate (contenidos en el kit), posteriormente se colocaron a temperatura ambiente por 20 minutos, para llevar a cabo la reacción (tiempo establecido por el método). Como blanco, se utilizó agua destilada en vez de muestra para cada una de las mediciones y los resultados fueron expresados como mg/L de $\text{NH}_3\text{-N}$.

V.6 Razón atómica Oxígeno-Nitrógeno (O:N)

Este índice de oxígeno:nitrógeno (O:N) fue calculado utilizando los valores obtenidos en el consumo de oxígeno y la excreción de amonio en las diferentes condiciones experimentales. Se calculó por medio de la siguiente ecuación, la cual fue descrita por Flores *et al.* (2008):

$$\text{O:N} = \text{peso atómico (NH}_3^+) / \text{peso atómico (O}_2) * [\text{QO}_2] / [\text{NH}_3^+]$$

Dónde;

$[\text{QO}_2]$, es el consumo de oxígeno.

$[\text{NH}_3^+]$, es el amonio excretado.

Con respecto al valor obtenido de la relación atómica O:N, representa la relación de proteínas, lípidos y carbohidratos que fueron utilizados como fuente de energía por los organismos en las diferentes condiciones experimentales, de acuerdo a Mayzaud y Conover (1988) (CuadroIII).

Tabla 3.- Valores estimados por Mayzaud y Conover (1988), para describir la fuente energética utilizada para su crecimiento.

Relación O:N	Fuente energética utilizada
3 a 16	Catabolismo netamente de proteína
50 a 60	Catabolismo 50% lípidos y 50% proteínas
> 60	Catabolismo de carbohidratos

V.7 Análisis Estadístico

Después de comprobar los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los datos de consumo de oxígeno y excreción de amonio en los diferentes tratamientos se realizó una prueba de análisis de varianza de una vía (ANDEVA) para determinar si existe efecto de la salinidad, la temperatura o la concentración de oxígeno disuelto en las variables de respuesta. Las diferencias existentes se evaluaron con una prueba *a posteriori* de Tukey. En todos los análisis se manejó un nivel de significancia de 0.05 y se utilizó el software de Statistica 8.0. para Windows.

VI. RESULTADOS

Se logró contar con 6 cámaras respirométricas funcionales. Es decir, todas pudieron estar debidamente selladas sin rebasar el límite de presión dentro de ellas y sin la formación de burbujas. La inclinación de las cámaras y la instalación de una válvula de salida de aire en uno de los extremos permitió el poder desalojar eficientemente todas las burbujas formadas en la tapa de acrílico. Por otro lado, los biofiltros pudieron mantener durante varios días las condiciones de calidad de agua dentro de las cámaras, lo cual permitió mantener a peces durante 5 días en recirculación sin requerir la introducción de agua nueva en el sistema.

El contar con los depósitos o reservorios individuales en cada sistema dio lugar a poder mantener la temperatura constante e individual en cada una de las cámaras, aún cuando cada una de ellas tuviera distintas temperaturas.

La homogenización de la columna de agua logró ser similar entre las distintas cámaras como se demostró al registrar la concentración de oxígeno entre ellas al realizar cambios de saturación de oxígeno al agregar sulfato de amonio; así como al observar visualmente la disolución de un colorante introducido a través de la válvula de entrada a las cámaras.

VI.1 Consumo de oxígeno

Las tilapias sometidas a 0 y 15‰ (Fig. 6) mostraron un mayor consumo de oxígeno (0.31 ± 0.11 y 0.40 ± 0.10 mg O₂ h⁻¹ 100g bh⁻¹, respectivamente) que aquellas expuestas a 25 ‰ de salinidad (0.19 ± 0.01 mg O₂ h⁻¹ 100g bh⁻¹) ($p < 0.05$). En la figura 6 adicionalmente se muestran los consumos de oxígeno con organismos aclimatados a las diferentes salinidades (color rojo), observándose

una disminución en la respiración a 15 ‰ de salinidad. En la mayor salinidad (25‰) no se presentaron diferencias en consumo de oxígeno.

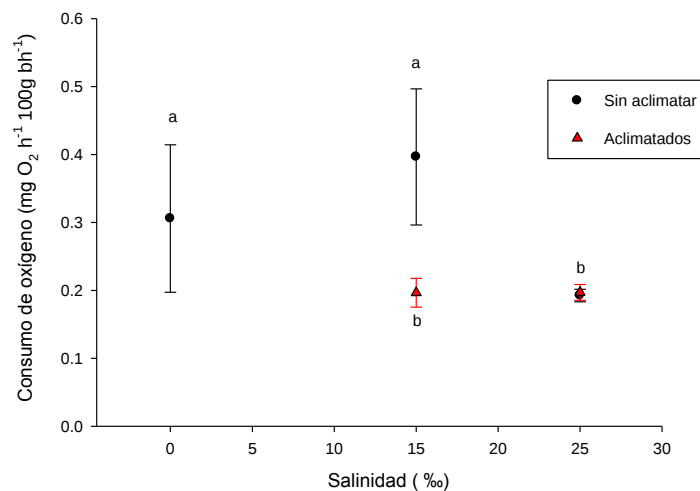


Figura 3.- Valores promedios y desviación estándar del consumo de oxígeno de la tilapia *Oreochromis nilotica* var. Spring a 0, 15 y 25 ‰ de salinidad sin aclimatación (●) y después de haber sido aclimatada durante 3 días (▲). Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, α=0.05).

En la figura 7, se representa el consumo de oxígeno de las tilapias sometidas a diferentes temperaturas (20, 27 y 34 °C), en donde se observa que conforme aumenta la temperatura se incrementa el consumo de oxígeno, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el consumo a 20 y 34°C

(0.175 ± 0.042 y 0.36 ± 0.023 mg O₂ h⁻¹ 100g bh⁻¹, respectivamente), mientras que a los 27 °C (0.31 ± 0.108 mg O₂ h⁻¹ 100g bh⁻¹) no mostró diferencias con los otros grupos.

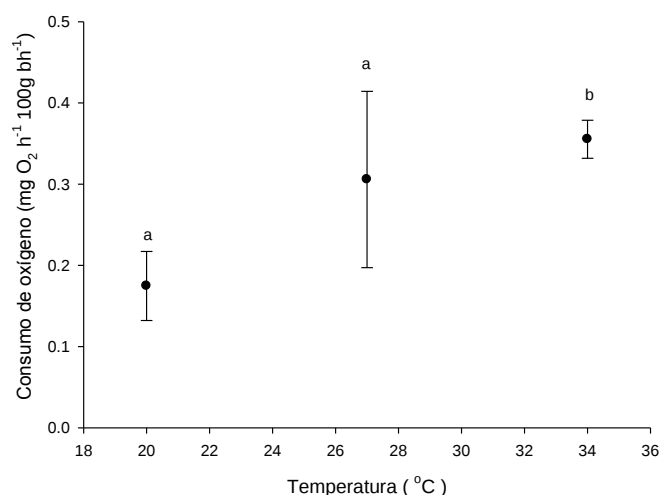


Figura 4.- Valores promedios y desviación estándar del consumo de oxígeno de la tilapia *Oreochromis nilotica* var. Spring a 20, 27 y 34 °C de temperatura. Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$).

En el experimento que se realizó a diferentes concentraciones de oxígeno (3, 5 y 7 mg/l) (Figura 8) no se observaron diferencias significativas en el consumo de oxígeno. Sin embargo se nota, que, a una mayor concentración de oxígeno disuelto, crece la variabilidad de respuesta, con un rango entre 0.28 ± 0.03 hasta 0.25 ± 0.012 mg O₂ h⁻¹ 100g bh⁻¹.

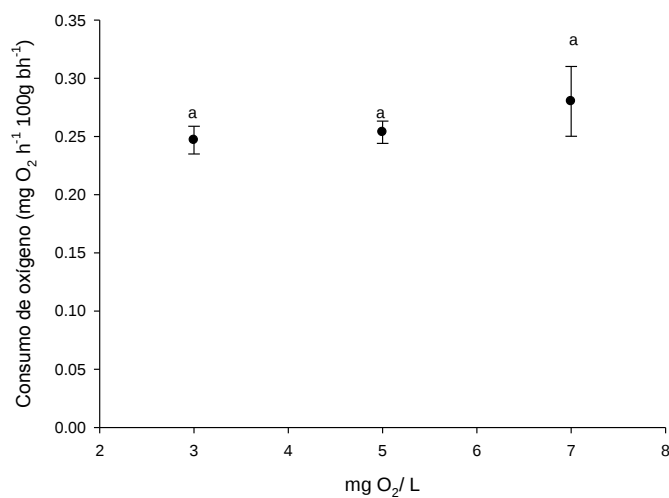


Figura 5.- Valores promedios y desviación estándar del consumo de oxígeno de la tilapia *Oreochromis nilotica* var. Spring sometida a diferentes concentraciones de oxígeno (3, 5 y 7 mg/L). Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$).

VI.2 Excreción de amonio

La excreción de amonio que se cuantificó a diferentes salinidades (Figura 9), muestra que con el aumento de la salinidad, la excreción de amonio es menor. No se observaron diferencias entre los 25 y 15 ‰ de salinidad (0.006 ± 0.003 y 0.007 ± 0.002 mg NH₄ h⁻¹ 100g bh⁻¹, respectivamente) en comparación a las expuestas a 0 ‰ (0.020 ± 0.0033 mg NH₄ h⁻¹ 100g bh⁻¹). En color rojo se muestra la excreción de amonio obtenida con organismos previamente aclimatados a su

ambiente, en donde se observó una excreción similar entre 0 y 25 ‰ de salinidad y mayor con respecto a lo obtenido a 15‰.

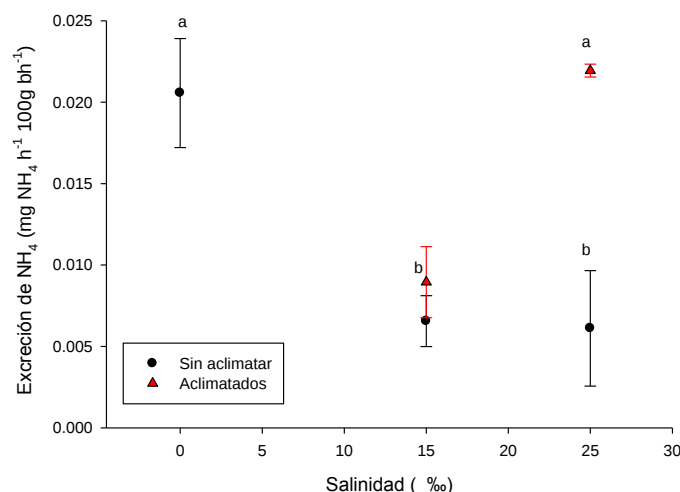


Figura 6.- Valores promedios y desviación estándar de excreción de amonio de la tilapia *Oreochromis nilotica* var. Spring sometidas a diferentes salinidades (0, 15 y 25 ‰) sin aclimatación (●) y con aclimatación (▲). Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$).

La excreción de amonio obtenida con tilapias sometidas a diferentes temperaturas (Fig. 10) muestra que la mayor excreción de amonio se presentó en las respirometrías realizadas a 27 y 34 °C (0.30 ± 0.19 y 0.36 ± 0.02 mg NH₄ h⁻¹ 100g bh⁻¹, respectivamente), mientras que a 20 °C la excreción de amonio fue significativamente menor (0.18 ± 0.04 mg NH₄ h⁻¹ 100g bh⁻¹).

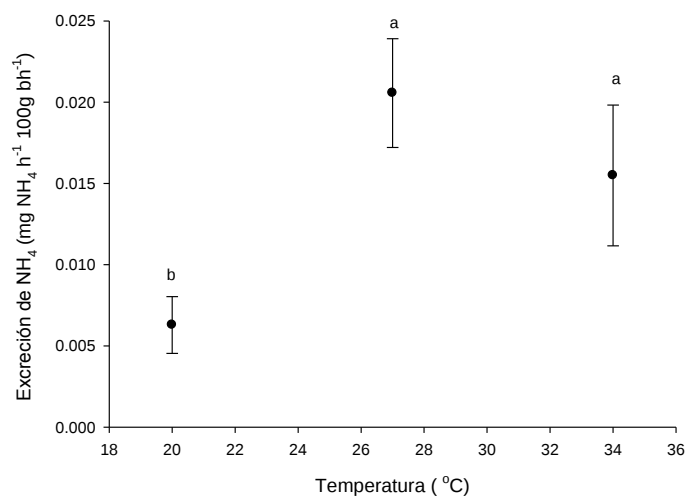


Figura 7.- Valores promedios y desviación estándar de la excreción de amonio de tilapias *Oreochromis nilotica* var. Spring sometidas a diferentes temperaturas (20, 27 y 34 °C) . Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$).

La concentración de oxígeno en el agua no tuvo efecto sobre la excreción de amonio (Fig. 11) al no encontrar diferencias significativas con valores desde 0.02 ± 0.01 a 0.01 ± 0.004 mg NH₄ h⁻¹ 100g bh⁻¹.

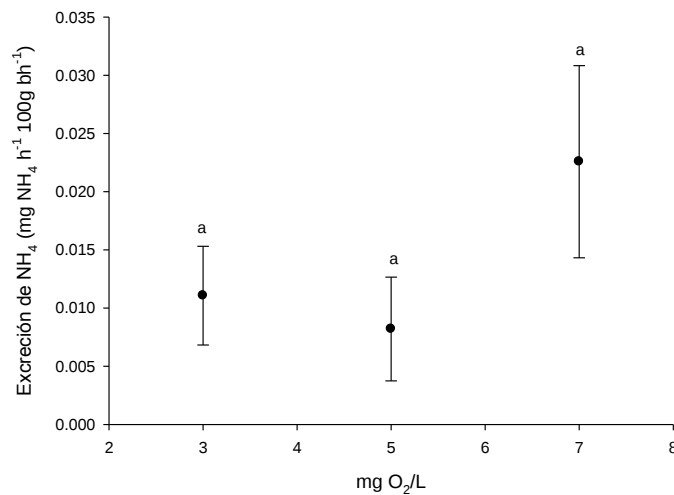


Figura 8- Valores promedios y desviación estándar de excreción de amonio de la tilapia *Oreochromis nilotica* var. Spring al ser sometidas a diferentes concentraciones de oxígeno (3, 5 y 7 mg/L). Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$).

VI.3 Relación atómica O:N

Los valores obtenidos de la relación atómica O:N a partir de la respiración y excreción de amonio de las tilapias sometidas a diferentes salinidades se muestran en la figura 12, donde a 15‰ de salinidad existe un incremento significativo ($p<0.05$) alcanzando una máximo de 64.2 con relación a 0 y 25‰ (15.7 y 33.4, respectivamente), mientras que después de haber sido aclimatadas esta

relación se mantuvo con valores bajos, presentando únicamente diferencias significativas con los organismo expuestos 25 ‰, donde su relación O:N fue menor con respecto a 0 y 15 ‰ de salinidad.

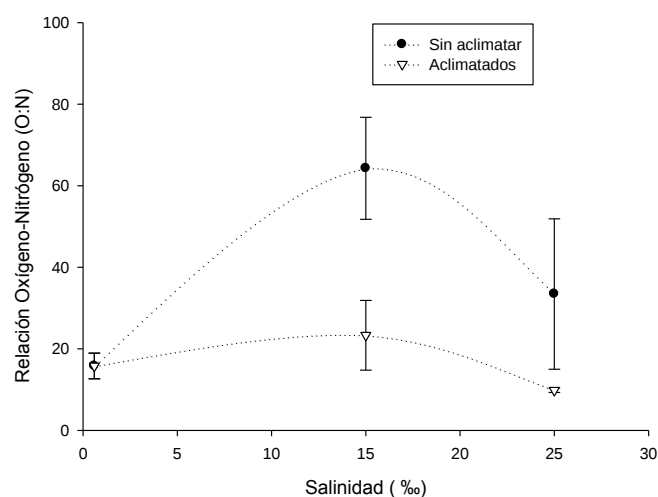


Figura 9.- Valor promedio de la relación atómica O:N de tilapias *Oreochromis nilotica* var. Spring sometidas a distintas concentraciones de salinidad (0, 15 y 25 ‰) sin aclimatar y después de haber sido aclimatados durante 3 días. Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$).

La relación atómica O:N (Fig. 13) obtenida de los organismos sometidos a distintas temperaturas, muestra niveles de 29.5, 15.7 y 24.3 para las temperaturas 20, 27 y 34 °C, respectivamente. Se presentó una disminución de relación O:N a 27 °C, y mantuvo diferencias significativas con 20 y 34 °C.

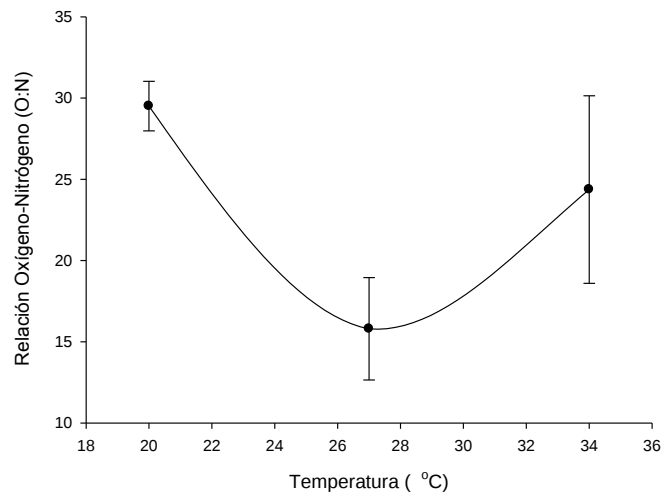


Figura 10.- Valor promedio de la relación atómica O:N de la tilapia *Oreochromis nilotica* var. Spring a 20, 27 y 34 °C de temperatura. Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$).

La relación atómica que se generó mediante un estrés provocado por diferentes concentraciones de oxígeno en el agua (Fig. 14) muestra una tendencia a distribución normal con valores de 23.7, 32.8, 13.1 para 3, 5 y 7 mg/L, respectivamente. Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

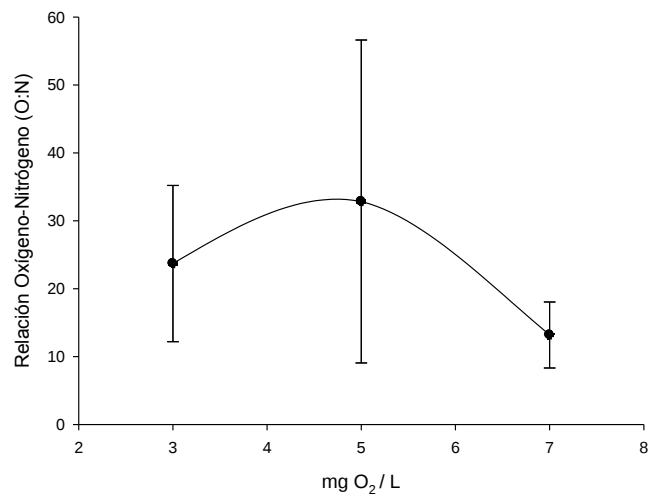


Figura 11.- Valor promedio de la relación atómica O:N de tilapias *Oreochromis nilotica* var. Spring sometidas a diferentes concentraciones de oxígeno (3, 5 y 7 mg/L). Letras distintas indican diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $\alpha=0.05$).

VII. DISCUSIÓN

Las cámaras respirométricas fueron eficientemente desarrolladas, no sólo logrando obtener cámaras como las que se encuentran comercialmente disponibles, sino también el haberlas integrado dentro de un sistema de recirculación con biofiltros y reservorios, para poder modificar las condiciones del agua y/o controlarlas (temperatura y/o salinidad). Este sistema supera las expectativas y se piensa que pueda ser patentado, en forma de modificación del sistema.

El haber desarrollado un sistema de esta naturaleza es un logro, no sólo desde el punto de vista económico, sino también desde el punto de vista funcional. Estas cámaras fueron desarrolladas y modificadas gracias a la intervención de un equipo de investigadores y las aportaciones de ésta tesis en donde se hicieron las modificaciones para estandarizarlas en cuanto a mezclado de la columna de agua con el ajuste de las bombas. La inserción de los separadores de agua, así como los ajustes pertinentes en los biofiltros.

Este desarrollo fue parte del planteamiento de un proyecto de SAGARPA/CONACYT (proyecto no. 109150) para poder contar con cámaras respirométricas que pudieran medir eficientemente el metabolismo de peces para evaluar el presupuesto energético.

Con el fin de demostrar el buen funcionamiento de las cámaras, se realizaron unas pruebas fisiológicas utilizando a la tilapia *Oreochromis nilotica*, en distintas

condiciones de estrés. Es importante resaltar que el objetivo principal de éste trabajo no era el estudio fisiológico de esta especie. Sin embargo, los resultados aquí mostrados pueden ser discutidos y analizados de forma particular.

Todo organismo por naturaleza tiende a la homeostasis, que es la capacidad a adaptarse a los cambios del medio ambiente para mantener el equilibrio y así lograr un mínimo de gasto energético. Con esto, se puede asumir que cambios abruptos del medio ambiente provocarán cambios que conlleven a diferencias metabólicas con un consecuente gasto energético y tener como consecuencia, en su caso, la disminución de crecimiento. Es así que el estrés, en general, se denomina como la suma de todas las respuestas fisiológicas que ocurren cuando el pez trata de lograr su homeostasis (Wedemeyer y McLeal, 1981). El estrés es tipificado de acuerdo al grado de afectación que podrá estar caracterizado de acuerdo a la letalidad o al efecto en el retardo de crecimiento. El primero consiste en medir el nivel de letalidad a un porcentaje determinado de mortalidad, ya sea 50 o 25% de mortalidad del grupo de organismos sometidos a dicho cambio, denominándose efecto letal del 50 o 25% como LC50 o LC25, respectivamente. En cambio, el efecto que pudiera llevar a un retardo en el crecimiento se mide de manera similar pero se toma como respuesta principal al crecimiento y se identifica con las siglas EC50 o EC25, respectivamente. Su obtención requiere de un tiempo más prolongado de mediciones. Un factor menos utilizado es la respuesta respiratoria y también puede ser un indicativo de estrés sin necesidad de medir el retraso de crecimiento y así constituye una medida importante en la determinación de un cambio medioambiental que pueda traer como consecuencia

un cambio fisiológico a corto plazo o en consecuencia después de un periodo corto de aclimatación.

Los estudios de respuesta respiratoria en peces son complicados pues requieren el poder contar con cámaras respirométricas con electrodos conectados a un sensor de oxígeno. Si bien estos equipos de respirometría son costosos, las cámaras respirométricas son también complejas y por ende, onerosas. En este trabajo se reprodujeron las cámaras respirométricas utilizando estanques circulares ovalados en fibra de vidrio y con ventanas y tapas de policarbonato para la observación de los peces. Si bien parece un problema trivial, el contar con un flujo constante y homogéneo dentro de la cámara y mantener una presión constante que no cause la deformación de la cámara a consecuencia del movimiento del agua sin espacios de oxígeno y que asegure un perfecto mezclado para obtener una señal constante, no lo es. La experiencia aquí obtenida al instalar el equipo hizo necesarias una serie de adaptaciones, desde la amortización de las tapas para soportar los cambios ligeros de presión así como modificaciones internas que promuevan el movimiento de la columna de agua. En primer lugar, al hacer pruebas de flujo utilizando azul de metileno para ver el patrón de circulación de éste dentro de la cámara, se observó que el azul de metileno tardaba varias vueltas para asegurar su mezcla, por lo que este problema se solucionó poniendo dos láminas concéntricas en los dos extremos (Fig. 2), además de contar con las paredes de separación de la zona donde están los organismos. Otro inconveniente que se solucionó, fue el tamaño del motor, si bien el proveedor aseguraba una capacidad de flujo determinada, al medir el flujo

interno en el agua dentro de un sistema cerrado y con filtros para asegurar el mezclado del agua, no fue suficiente, por lo que los motores se tuvieron que cambiar por otros que tuvieran una capacidad mayor (6500 L/h). Por otro lado, el asegurarse de que la cámara permanezca perfectamente sellada y sin burbujas es de gran relevancia. Esto se solucionó colocando las cámaras respirométricas en un ángulo de 10° con respecto al plano horizontal además de agregar una válvula en la parte más alta que nos permitiera sacar las burbujas al abrirla para que quedara totalmente hermética, y para arrastrar las microburbujas se empleó un limpiador de acuario con imán haciendo presión por ambos lados entre la tapa por dentro y por fuera, presentando una superficie rugosa en la parte interna para poder arrastrar dichas burbujas.

Así mismo, se realizaron las pruebas para establecer el óptimo sellado de las cámaras. Para esto, se probaron distintos empaques entre el nivel del estanque y la tapa de acrílico con el fin de sellar herméticamente la cámara. Como primera opción se seleccionó un empaque de neopreno comercial con un calibre de 0.63 cm de pulgada (espesor), sin embargo con este material no se logró el sellado perfecto e incluso se rompió la cubierta de acrílico al ejercer presión entre dos materiales distintos, como lo es la fibra de vidrio y el acrílico. El segundo material fue el neopreno el cual se utiliza para la elaboración de traje de buceo, de 3/8" de espesor y se procedió a realizar los empaques, los cuales se cortaron de una sola pieza. Con éstos, se obtuvo una respuesta satisfactoria y a su vez benéfica, ya que el mismo espesor nos ayudaría a extraer las burbujas de aire que se quedaban encerradas con la ayuda de una espátula.

Una vez después de contar y cumplir con las pruebas requeridas de las cámaras como lo es flujo homogéneo, sellado apropiado, válvulas y eliminación de burbujas en la cámara, se diseñó el experimento aquí propuesto con el fin de calibrar y estandarizar simultáneamente las cámaras respirométricas. Es así que se hicieron las mediciones de consumo de oxígeno en tilapias bajo condiciones de estrés por salinidad, temperatura y concentración de oxígeno disuelto en el agua tanto en un cambio abrupto como después de haber sido aclimatadas durante 3 días.

VII.1 Consumo de oxígeno

Los resultados de consumo de oxígeno a distintas salinidades reflejan una menor cantidad de oxígeno requerida cuando los organismos son aclimatados por 3 días a las salinidades experimentales, sin encontrar diferencias en los tratamientos. Un comportamiento similar ha sido descrito en especies como la tilapia *O. mossambicus*, y *Miichthys miiuy* (Iwama *et al.*, 1997 y Zheng *et al.*, 2008), en donde después de un periodo de aclimatación los organismos no presentan diferencias significativas en su consumo de oxígeno. Se ha visto que después de un periodo de adaptación, las especies eurihalinas tienen la capacidad de regular su tasa metabólica cuando son expuestas a salinidades diferentes a las de su hábitat y alcanzan tasas de consumo de oxígeno similares a las que

presentan bajo condiciones normales de salinidad (Von Qertzen, 1984; Dalla Via *et al.*, 1998). Sin embargo, en el presente trabajo fue posible observar un mayor consumo de oxígeno a 15 ‰ en organismos no aclimatados y una disminución abrupta en la tasa de consumo de oxígeno a 25 ‰. Para esta última salinidad fue similar tanto en organismos aclimatados y como en aquellos donde no se realiza un proceso de aclimatación previo a la medición. Estos resultados son similares a los encontrados por Kim *et al.* (1998 y 2006), quienes al medir el consumo de oxígeno en las especies *Lateolabrax sp.* y *Anguilla japonica*, reportan un menor consumo de oxígeno al someter a los organismos a un ambiente con menor salinidad sin aclimatación previa. Los autores atribuyen esta respuesta a que probablemente exista una fase de adaptación en los organismos, misma que puede variar desde 5 a 12 horas o inclusive, algunos días. Durante esta etapa de adaptación, es posible que la tasa metabólica disminuya por factores de estrés, lo cual podría explicar las bajas tasas de consumo de oxígeno en salinidades próximas a 25 ‰ (Kim *et al.*, 1998).

Los resultados que se obtuvieron en el consumo de oxígeno con un factor de estrés por temperatura mostraron una relación directamente proporcional, lo cual quiere decir que conforme aumenta la temperatura, el consumo de oxígeno también aumenta. En numerosos estudios se han presentado los mismos resultados, en los cuales se ha trabajado con especies como *Macrobrachium rosenbergii*, *Dicentrarchus labrax*, *Litopenaeus stylirostris*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Oreochromis sp* y *Miichthys miiuy* (Chen y Kou, 1996; Dalla *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2004; Re *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2004; Villareal y Casallas, 2006;

Zheng *et al.*, 2008). Existen evidencias que muestran que la temperatura juega un papel preponderante en el medio acuático y controla las funciones de los organismos y su distribución, además de que ésta acelera las reacciones químicas y el metabolismo, lo cual explica los incrementos en el consumo de oxígeno conforme la temperatura aumenta (Villareal, 1990; Bailey *et al.*, 1991; Hopkins y Cech, 1994; Clarke y Johnston, 1999; Gilooly *et al.*, 2001; Villareal y Casallas, 2006).

En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en el consumo de oxígeno a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto. Estos resultados coinciden con los encontrados por Sukumaran y Kutty (1977) en *Mystus armatus* donde el consumo de oxígeno en esta especie no presentó diferencias en un rango entre 5.5 a 2.5 mg/L. Sin embargo ellos encontraron que por debajo de 2.5 mg/L, el consumo de oxígeno es diferente. La concentración mínima de oxígeno que se utilizó en este trabajo fue de 3 mg/L, concentración que no es limitante para la tilapia *Oreochromis niloticus*, puesto que hay estudios en los que se ha observado que esta especie es capaz de sobrevivir a concentraciones tan bajas como 0.7, 0.1 e inclusive a 0 mg/L, aunque a esta última concentración solo sobreviven por un periodo de 6 horas (Coche, 1982; Chervinski, 1982; Teichert y Green, 1993). Lo anterior puede explicar porque en el presente trabajo no fue posible observar una disminución en el consumo de oxígeno. Sin embargo, a pesar de no encontrarse diferencias significativas en el consumo de oxígeno a diferentes concentraciones de oxígeno, si es posible observar que los organismos tienden a disminuir su consumo de oxígeno

conforme la cantidad de oxígeno disuelto en el agua disminuye. Esta tendencia ha sido reportada en *Leiopotherapon unicolor* y en *Mystus armatus* (Sukumaran y Kutty, 1977; Gehrke y Fielder , 1988).

No obstante los resultados aquí encontrados en cuanto a coincidencias con otros autores, un aspecto importante que vale la pena rescatar, es la reproducibilidad entre las repeticiones que se realizaron a través del bloqueo por el tiempo. Esto indica que fue posible calibrar las cámaras entre ellas y que la reproducibilidad en cuanto al funcionamiento de las mismas es alto, aspecto importante para cubrir uno de los objetivos de este trabajo.

VII.2 Excreción de amonio

La excreción de amonio en organismos que no tuvieron una previa aclimatación presentó una tendencia a disminuir con respecto a un aumento en la salinidad. Se observó una variabilidad significativa entre los organismos colocados en agua dulce y aquellos expuestos a 15 y 25‰ de salinidad, sin observarse diferencia en la excreción de amonio en estos dos últimos tratamientos.

Los organismo aclimatados y sin aclimatar a 15‰ de salinidad presentaron una excreción de amonio similar. En un estudio realizado por Woo *et al.* (1997) muestran que el punto isosmótico para la tilapia *Oreochromis niloticus* corresponde a una salinidad de 15‰ y afirman que bajo estas condiciones de salinidad se obtuvo una mejor respuesta en el crecimiento de los organismos. Por ende, la excreción de amonio no cambia significativamente. Sin embargo, cuando los

organismos son aclimatados y colocados fuera de este punto isosmótico, ya sea con la disminución o aumento de salinidad, se obtiene un incremento en la excreción de amonio. Esta misma respuesta se obtuvo en camarones *Litopenaeus Vannamei* descrito por Valdez *et al.* (2008), así como también al disminuir la salinidad en experimentos con *L. stylirostris* (Re *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2004) la excreción de amonio es inversamente proporcional, lo que significa que al disminuir la salinidad la excreción aumenta considerablemente.

Los organismos expuestos a salinidades de 25‰ sin previa aclimatación presentaron una excreción menor comparada con los organismos aclimatados, y se encontraron diferencias significativas entre ellos. Para los peces que fueron colocados a 25‰ de salinidad, la excreción obtuvo una considerable disminución, respuesta que está dada por la disminución del metabolismo por estrés salino en el ambiente (Kim *et al.* 1998; Kim *et al.* 2006). Así mismo, fue posible observar esta respuesta en el consumo de oxígeno en las tilapias mantenidas a 25‰.

La temperatura ejerció un efecto directo sobre la excreción de amonio, ya que conforme aumentó la temperatura, la excreción de amonio también aumentó. Esta respuesta se ha observado en diferentes organismos acuáticos (Sukumaran y Kutty, 1977; Chen y Kou, 1996; Kaushik, 2000; Díaz *et al.*, 2004; Re *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2008), sin embargo para organismos colocados a 34‰ se observó una ligera disminución comparados con los organismos colocados a 27‰, sin encontrarse diferencias significativas. Este comportamiento en el metabolismo de la tilapia se le puede atribuir a la etapa de adaptación, la cual puede finalizar de 5 horas en adelante, dependiendo del organismo (Kim *et al.*, 1998). Aunado a esto

existen evidencias en que la temperatura juega un papel importante, ya que es un factor que acelera las reacciones químicas y el metabolismo, lo cual explica los incrementos en la excreción amonio así como también se corrobora con los resultados del consumo de oxígeno ya que conforme la temperatura aumenta el consumo también aumenta (Villareal, 1990; Bailey *et al.*, 1991; Hopkins y Cech, 1994; Klarke y Johnston, 1999; Gilooly *et al.*, 2001; Villareal y Casallas, 2006).

Respecto a la excreción de amonio en las diferentes concentraciones de oxígeno disuelto no se observaron diferencias significativas y presentaron una tendencia similar al consumo de oxígeno. Este mismo patrón se observó en los resultados encontrados por Sukumaran y Kutty (1977) en *Mystus armatus*, en donde la excreción de amonio permanece sin cambios en ambientes con concentraciones de 2 a 6 mg O₂/mL.

VII.3 Relación atómica O:N

La relación atómica O:N es un indicador de la naturaleza del sustrato metabólico que está siendo utilizado por el organismo para satisfacer sus requerimientos energéticos (Mayzaud y Conover 1988; Díaz-Iglesias *et al.*, 2010). En el presente trabajo se observó que los organismos sin previa aclimatación utilizaron preferentemente una mezcla de lípidos y carbohidratos entre 15 y 25 %, en tanto que aquellos que fueron colocados a 0 % presentaron una mayor utilización de proteínas. Esta utilización de diferentes sustratos para la obtención

de energía en los diferentes ambientes salinos sin previa aclimatación, pudiera estar reaccionada con una fase de regulación. De acuerdo con Soo *et al.* (2006) en esta fase la tasa metabólica puede ser aumentada o disminuida por un tiempo determinado hasta recobrar la homeostasis en el organismo. Sin embargo, para los peces con aclimatación previa, se muestran diferencias significativas en los sustratos utilizados para su requerimiento energético. La mayor relación O:N obtenida en este experimento fue a 15 ‰ de salinidad, la cual indicó un uso de una mezcla de lípidos y proteínas como sustrato. Para los organismos que fueron colocados a 25‰ de salinidad se obtuvo la menor relación atómica, lo cual reflejó un uso de proteínas como el sustrato predilecto para la generación de energía en el organismo. Resultados como este se han encontrado en los trabajos realizados por Díaz-Herrera *et al.* (1992), Valdez *et al.* (2008), Zheng *et al.* (2008) y Pérez-Robles *et al.* (2011) en especies como *Callinectes similis*, *Litopenaeus vannamei*, *Miichthys miiuy* y *Sphaeroides annulatus*, respectivamente. En estos trabajos se ha observado que al colocar a los organismos en ambientes diferentes a su punto isosmótico, ya sea hacia condiciones hiper o hiposalinos, la relación O:N es menor y se utiliza a las proteínas como principal sustrato energético. Esta respuesta indica que el organismo se encuentra en un ambiente estresante.

Se sabe que la temperatura juega un papel determinante en las respuestas fisiológicas de los organismos. En este trabajo, la temperatura influyó en el consumo de oxígeno y excreción de amonio, por lo cual también se observó un efecto en la relación O:N. Los organismos expuestos a 27 °C mostraron una relación O:N menor que aquellas registradas en los organismos mantenidos a 20 y

34 °C, lo cual indicó que los peces colocados a 27° C prefirieron a las proteínas como sustrato energético, en tanto que a 20 y 34 °C se utilizó una mezcla de proteínas y lípidos como fuente de energía. Una tendencia similar a la observada aquí ha sido descrita por Zheng *et al.* (2008), quienes encontraron que la relación O:N en *M. miiuy* aumenta si se presentan incrementos o decrementos en la temperatura. Adicionalmente, se sabe que bioenergéticamente es más barato catabolizar 1g de grasa, del cual se obtendrán 9.5 kcal de energía, que 1 g de proteína, del cual solo se obtendrán 4.5 kcal (Cook *et al.*, 2000).

La información disponible sobre la relación O:N en diferentes concentraciones de oxígeno es escasa. En este trabajo no se presentaron diferencias significativas en este índice fisiológico. La concentración más baja utilizada en este trabajo fue de 3 mg/L y se sabe que la tilapia es capaz de sobrevivir en ambientes aun más anóxicos, inclusive en ambientes con menos de 0.5 mg/L de oxígeno. Es probable que las concentraciones de oxígeno utilizadas no hayan sido lo suficientemente estresantes para los organismos, lo cual permite corroborar la tolerancia de los organismos a diferentes ambientes de oxígeno. Sukumaran y Kutty (1977) realizaron un experimento de consumo y excreción de amonio a diferentes concentraciones de oxígeno y no encontraron diferencias significativas en ambas tasas fisiológicas. Con estos resultados se puede inferir que la relación O:N no presentó diferencias en los diferentes ambientes de oxígeno, tendencia similar a la que se obtuvo en la presente investigación.

VIII. CONCLUSIONES

- El diseño de las cámaras respirométricas permitió realizar las mediciones del consumo de oxígeno y excreción de amonio de manera eficiente.
- El efecto de la salinidad en el consumo de oxígeno, excreción de amonio y la relación O:N de la tilapia (*Oreochromis niloticus* var. *Spring*) fue diferente en organismos aclimatados y sin aclimatar.
- El consumo de oxígeno es menor en organismos aclimatados a 15‰ que en organismos sin aclimatar. Sin embargo, a 25‰ el consumo de oxígeno en ambas condiciones de experimentación no presenta diferencias.
- La excreción de amonio a 15‰ fue similar en organismos aclimatados y sin aclimatar. De manera general, en organismos aclimatados a 15 y 25‰ presentaron un aumento en la excreción de amonio, en tanto que en organismos no aclimatados un incremento en la salinidad tendió a disminuir su excreción.
- La relación atómica O:N en organismos sin aclimatación fue mayor que en organismos aclimatados. En organismos no aclimatados, a 0 y 25‰ se tuvo un mayor uso de lípidos y proteínas, mientras que a 15‰ se prefirió a los carbohidratos como sustrato energético. En organismos aclimatados se encontró un mayor uso de proteínas y se obtuvo la menor relación O:N en organismos aclimatados a 25‰.
- El efecto de la temperatura en el consumo de oxígeno y excreción de amonio fue directamente proporcional al aumento de esta variable.

- La menor relación atómica O:N se presentó a 27 °C, en la cual se infirió un uso preferente de proteínas. A temperaturas superiores o inferiores a 27 °C la relación O:N aumentó, y se utilizó como sustrato energético una mezcla de proteínas y lípidos.
- No se observó un efecto significativo de los diferentes niveles de oxígeno (3, 5 y 7 mg/L) que se emplearon en este trabajo sobre el consumo de oxígeno, excreción de amonio y relación atómica O:N.

IX. RECOMENDACIONES

Realizar un experimento el cual se tome en cuenta el desarrollo de los organismos y así como también el presupuesto energético del mismo. Todo esto para corroborar que los datos obtenidos dentro de la respirometría sean ratificados con estos términos.

Realizar una estandarización de las diferentes técnicas para medir el amonio (NH_4) y así seleccionar la más apta para el sistema respirométrico, ya que la técnica que se utilizó en el este trabajo mostró una gran variabilidad en su detección.

X. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Arjona, F. J., Vargas-Chacoff, L., del Río, M. y Mancera, J. M. 2005. Estudio preliminar sobre la adaptación del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1958 a ambientes de diferente salinidad. Instituto Español de Oceanografía. 21(1-4):137-146.
- Bailey, J., Sephton, D. and Driedzie, W. R. 1991. Impact of an acute temperature change on performance and metabolism of pickerel (*esox niger*) and eel (*Anguilla rostrata*) hearts. Physiological Zoology, 64: 697-716.
- Barrington, E. O. 2006. Growing Tilapia in Atlantic seawater in St. Kitts. The St. Kitts and Nevis aquaculture pilot project and environmental research. [En línea].<http://ourworld.worldlearning.org/site/News2?page=NewsArticle&id=7909>. 06/ 06/2012.
- Bayne, B. L., Windows, J. and Thompson, R. J. 1976. Physiological integrations. In: B.L. Bayne (Ed.) Animal Physiology: Principles and Adaptations. MacMillan Company, New York. pp. 261-291.
- Blazka P., Volf M. and Capela M. 1960. A new type of respirometer for the determination of metabolism of fish in an activate state. Physiology Bohemoslov. 9:553-558.
- Beamish, F., Niimi A. J., and Lett P. 1975. Bioenergetics of teleost fishes: environmental influences. In: L. Bolis, H.P. Mandrell and K. Schmidt-Nielsen

- (Eds.) Comparative Physiology. Functional aspects of structural materials. North Holland, Publ. Co. pp. 189-209
- Beamish, F. W. H. and Trippel E. A.. 1990. Heat increment: a static or dynamic dimension in bioenergetics models?. Transaction of the American Fish Society. 119:649-661.
- Coche A. G. 1982. Cage cultura of tilapias. In: R.S.V. Pullin and R.H Lowe-McConnell (editors), the biology and culture of tilapias. ICLARM conference proceedings 7. Manila, Philippines, pp. 205-246.
- Cook J. T., Sutterlin A. M. and Mc Nieven M. A. 2000. Effect of food depredation consumption and body composition of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*salmo solar*). Aquaculture. 188: 47-63.
- Chen J. C. and Kou T. T. 1996. Effects of temperature on oxygen consumption and nitrogenous excretion of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 145:295-303.
- Chervinski J. 1982. Environmental physiology of tilapias. In the biology and culture of tilapia. ICLARM Manila, Philippines. pp.119-128.
- Clarke A. and Johnston N. M. 1999. Scaling of metabolic rate whit body mass and temperature in teleost fish. Journal of Animal Ecology. 68:893-905.
- Dalla V. J., Villani P., Gasteiger E., and Niederstätter (1998) Oxygen consumption in the sea bass Wngering *Docentrachus labrox* exposed to acute salinity and temperature changes; metabolic basis for maximum stocking density estimations. Aquaculture. 169:303–313.

- Díaz F., Espina S., Rosas C., Sánchez A., Venegas C. y Díaz-Iglesias E. 1989. Ritmo respiratorio y amplitud metabólica del camarón café *Penaeus aztecus* con ablación en pedúnculos oculares. Revista Investigación Marina. X:27-39
- Díaz-Herrera F., Pérez-Cruz E., Luna-Figueroa J., Tapia-Gamas A. y Rosas-Vasquez C. 1992. Consumo de oxígeno, excreción de amonio y osmoregulación de juveniles de *Callinectes similis* Williams expuestos a salinidades fluctuantes. Ciencias Marinas 18(3):93-104.
- Díaz F., Re D., Sierra E. y Díaz E. 2004. Effects of temperature and salinity fluctuation on the oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulation of the blue shrimp. *Litopenaeus stillostris* (Stimpson). Journal of Shellfish Research. 23(3):903-910.
- Díaz F., Re D., González A., Sánchez N., Leyva G. and Valenzuela F. 2007. Temperature preference and oxygen consumption of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede) acclimated to different temperatures. Aquaculture Research. 38:1387-1394.
- Díaz-Iglesias E., Galicia G. F., Buckle R. L. F., Báez-Hidalgo M. y Perera-Bravet E. 2010. Respiración, excreción y relación oxígeno: nitrógeno de filosomas de langosta roja *Panulirus interruptus*. Hidrobiológica. 20(2): 135-146.
- Ek Nath A. E., Bentsen B. H., Ponzoni W. R., Rye M., Nguyen H. N., Thodesen J. and Gjerde B. 2007. Genetic improvement of farmed tilapias: Composition and genetic parameters of a synthetic base population of *Oreochromis niloticus* for selective breeding. Aquaculture. 273:1-14.

- Espina S., Díaz F., Rosas C. y Rosas I. 1986. Influencia del detergente sobre el balance energético de *Ctenopharyngodon idella* a través de un bioensayo crónico. *Contaminación Ambiental*. 2:25-37.
- Fahlman A., Kveeshwar J. A., Tikuisis P. and Kayar S. R. 2000. Calorimetry and respirometry in guinea pigs in hydrox. *European Journal Physiology* .40:843-851
- FAO. 1989. La nutrición y alimentación en la acuicultura de América Latina. Italia, FAO 1989. 189p.
- FAO. 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010. Roma, FAO. 2010. 219p.
- Fernandez C., Lopez M. C. and Lachica M. 2012. Description and function of mobile open-circuit respirometry system to measure gas Exchange in small ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 172:242-246.
- Fiess C. J., Kunkel-Patterson A., Mathias L., Riley G. L., Yancey H. P., Hirano T and Grau G. E. 2007. Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, part A*. 146: 252-264.
- Flores M., Díaz F., Medina R., Re A. D. and Licea A., 2008. The effect of dietary astaxanthin on physiological responses of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* acclimated to low-salinity water. *Journal of Fisheries International*.

3(3):75-82 p.

Garduño-Lugo M., Granados-Alvarez I., Olvera-Novoa. M. A. and Muñoz-Córdova.

G. 2003. Comparison of growth, fillet yield and proximate composition between Stirling Nile tilapia (wild type) (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus) and red hybrid tilapia (Florida red tilapia×Stirling red *O. niloticus*) males. *Aquaculture Research*. 34:1023-1028.

Gillooly F. J., Brown H. J., West B. G., Savage M. V. and Charnov L. E. 2001.

Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science* 293: 2248.

Gehrke P. C. and Fielder D. R. 1988. Effects of temperature and dissolved oxygen

heart rate, ventilation rate and oxygen consumption of spangled perch, *Leiopotherapon unicolor*. *Journal Comparative Physiology B*. 157: 771-782.

Hofer S. C. and Watts S. A. 2002. Cold tolerance in genetically male tilapia

Oreochromis niloticus. *Aquaculture*. 33:19-21.

Hopkins T. E. and Cech J. J. 1994. Effect of temperature on oxygen consumption

of the bat ray, *Myliobatis californica* (Chondrichthyes, Myliobatidae). *Copeia* 1994: 529-532.

Iwama G. K., Takemura A. and Takano K. 1997. Oxygen consumption rate of

tilapia in fresh water, sea water, and hypersaline sea water. *Journal of Fish Biology*. 51:886-894.

Ivlev V. S. 1939. Energy balance in the carp. *Zoologichesky Zhurnal* 18: 303-318.

- Kaushik S. J. 2000. Factores que afectan la excreción nitrogenada en telosteos y crustaceos. Avances de Nutrición Acuícola IV. pp. 237-250.
- Kidder, G. W., Petersen, C. W. and Preston R.L. 2006. Energetics of osmoregulation: II. Water flux and osmoregulatory work in the euryhaline fish, *Fundulus heteroclitus*. Journal of Experimental Zoology. 305:318-27.
- Kim W. S., Yoon S. J., Kim J. W., Lee J. A. and Lee T. W. 2006. Metabolic response under different salinity and temperature conditions for glass eel *Anguilla japonica* Marine Biology. 149: 1209–1215.
- Kim W. S., Kim J. M., Kim M. S., Park C. W and Huh H. T. 1998. Effects of sudden changes in salinity on endogenous rhythms of the spotted sea bass *Lateolabrax sp.* Marine Biology .131: 219 – 225.
- Koban M. and Swinson K. L.. 2004. Chronic REM-sleep deprivation of rats elevates metabolic rate and increases UCP1 gene expression in brown adipose tissue. Journal of Physiology Endocrinology Metabolism. 289:E68-E74.
- Klekowski K. R. and Duncan A. 1975. Physiological approach to ecological energetic *In*: W. R. Z. Grodzinski, K.R. Klekowski and A. Duncan (Eds.) Methods for Ecological Bioenergetics. Blackwell Science, Oxford. pp. 15-64.
- Larios-Toledo A. 2011. Efecto de la temperatura de aclimatación y del tamaño de alimento en el metabolismo, el cortisol y en los tejido hepático y renal de la sardina de la corriente de California (*Sardinops caeruleus*). Tesis para

obtener el título de Maestra en Ciencias. CICESE. Ensenada Baja California. pp 94

Lee, A. C., Lin C. R. and Chen S. M. 2005. Acclimation of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to salinity changes alters protein content of the larvae and their liver and kidney. *Aquaculture Research*. 36:963-939.

Lucas A. 1996. Bioenergetics of aquatic animals. (Eds.)Taylor and Francis. London. 169 pp.

Martínez-Porchas, Martínez-Córdova, Marcel, Luis Rafael, Ramos-Enríquez, Rogelio. 2009. Dinámica del crecimiento de peces y crustáceos. REDVETISSN: 1695-7504 2009 Vol. 10.

Mayzaud P. and Conover R. J. 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Marine Ecology- Progress Series*. 45: 289-302.

McKinney M. L. 1998. Is marine biodiversity at less risk? Evidence and implications. *Diversity and Distributions* (4):3-8.

Mena-Herrera A., Sumano-Lopez H., Macias-Zamora R. 2002. Efecto de la salinidad en el crecimiento de tilapia híbrida *Oreochromis mossambicus* (peters) x *Oreochromis niloticus* (lineus), cultivadas bajo condiciones de laboratorio. *Veterinaria México*. 33(1):39-48.

- Mostofa K. A. H. and Mair G. C. 2005. Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia. *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids. *Aquaculture*. 247: 189-201.
- Niimi, A. J. and Beamish F. W. H. 1974. Bioenergetics and growth of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in relation to body weight and temperature. *Canadian Journal of Zoology* 52: 447-456.
- Payne A. R., Hamer C. J. 1988. The influence of salt (NaCl) concentration and temperature on the growth of *Oreochromis spilurus*, *O. mossambicus* and a Red Tilapia Hybrid. In: Pullin R. S. V., Bhukaswan T., Tonguthai K. and Maclean J. L. (Eds) Proceeding of the second international symposium on Tilapia in aquaculture. ICLARM conference proceeding. No 15. Department of fisheries. Thailand and ICLARM, Manila, Philippines. Pp. 481-487.
- Perez-Robles J., Re A. D., Giffard-mena I and Diaz F. 2011. Interactive effects of salinity on oxygen consumption, ammonium excretion, osmoregulation and Na^+/K^+ -ATPase expression in the bullseye puffer (*sphoeroides annulatus*). *Aquaculture Research*. 1-12.
- Re A. D., Diaz F., Sierra E. y Gomez J. S. 2004. Consumo de oxígeno, excreción de amonio y capacidad osmorreguladora de *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) expuestos a diferentes combinaciones de temperatura y salinidad. *Ciencias marinas* 30: 443-453

- Riedel R., Caskey L. and Costa-Pierce B. A. 2002. Fish biology and fisheries ecology of the Salton Sea, California. *Hydrobiología* 161: 229-244.
- Rico, M. R. 2000. La salinidad y la distribución espacial de la ictiofauna en el estuario del Río de la Plata. [en línea] <http://hdl.handle.net/1834/2603> . Fecha de consulta 31 de agosto 2011.
- Sayed, M. F. A. y Kkawanna, M. 2008. Optimum water temperature boosts the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) free reared in a recycling system. *Aquaculture research*. 1-3.
- Scott, C.B. 2008. Metabolic Energy Expenditure at Rest. En: A primer of the exercise and nutrition sciences. Humana Press. 123-135 pp.
- Greenwell M. G., Sherrill J. and Clayton L. A. 2003. Osmoregulation in fish mechanisms and clinical implication. *Veterinary Clinics Exotic Animal* 6:169-189.
- Shouqi X., Yibo C., Yunxia Y. and Jiankang L. 1997. Effect of body size on growth and energy budget of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. 157:25-243.
- Shouqi X., Yibo C., Yunxia Y. and Jiankang L. 1997. Energy budget of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in relation to ration size. *Aquaculture*. 154:57-68.
- Soo W. K., Jin S. Y., Wook J. K., Ah J. L. and Won T. L. 2006. Metabolic response under different salinity and temperature conditions for glass eel *Anguilla japonica*. *Marine biology*. 149: 1209-1215.

Stickney, R. 1986. Tilapia tolerance of saline waters: A Review. *Progressive Fish-Culturist* 48:161-167.

Sukumara N. and Kutty M. N. 1997. Oxygen consumption and ammonia excretion in the catfish *Mystus armatus*, with special reference to swimming and ambient oxygen. *Proceeding Indian Academy of Sciences.* 86-B (3):195-206.

Tayamen M. M., Reyes R. A. Danting J. Ma., Mendoza A. M., Marquez E. B., Salguet A. C., Gonzales R. C., Abella T. A. and Vera-cruz E. M. 2002. Editor note. Tilapia broodstock development for saline waters in the Philippines. *The World Fish Center Quarterly.* 25:1

Teichert-Coddington D. and Green W. B. 1993. Tilapia yield improvement through maintenance of minimal oxygen concentrations in experimental grow-out ponds in Honduras. *Aquaculture.* 118: 63-71.

Tian X., Dong S., Wang F., Wu L. 2004. The effects of temperature changes on the oxygen consumption of juvenile Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* Osbeck. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 310: 59–72.

Valbuena M., Cruz-Casallas P. y Velasco-santamaría Y. 2006. Efecto del peso corporal sobre el consumo de oxígeno en yamú (*Brycon amazonicus* Spix and Agassiz 1989): Reporte preliminar, *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 19:175-179.

- Valdez G., Díaz F., Re D. y E. Sierra. 2008. Efecto de la salinidad sobre la fisiología energética del camarón blanco *Lotipenaeus vannamei* (Boone). Hidrobiológica. 18 (2): 105-115.
- Via J. D., Villani P., Gasteiger E., Niederstatter H. 1998. Oxygen consumption in sea bass fingerling *Dicentrarchus labrax* exposed to acute salinity and temperature changes: metabolic basis for maximum stocking density estimations. Aquaculture. 169: 303-313.
- Villareal H. 1990. Effect of temperature on oxygen consumption and heart rate of the Australian crayfish *Cherax tenuimanus*. Comparative Chemical Physiology. A. 95:189-193.
- Villareal V. R. D. y Casallas C. P. E. 2006. Efecto del peso corporal y temperatura del agua sobre el consumo de oxígeno de la tilapia roja (*Oreochromis* sp.). Orinoquia. 57-63.
- Von Oertzen J. A. 1984. Influence of steady-state and fluctuating salinities on the oxygen consumption and activity of some brackish water shrimps and Wishes. Experimental Marine Biology and Ecology. 80:29–46
- Woo S. Y. N. B., NG B. T., Leung, C. T. and Chow, Y. C. 1997. Enhancement of growth of tilapia *Oreochromis niloticus* in iso-osmotic medium. Journal of Applied Ichthyology.13:67-71
- Winberg G. G. 1956. The rate of metabolism and food requirements of fishes. Belarusian University. Minsk. In Russian. Engl. Transl. Fisheries Research Board of Canada Translation Series. pp 194 .

Zheng Z., Jin C., Li M., Bai P. and Dong S. 2008. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia excretion of juvenile miiuy croaker, *miichthys miiuy*. Aquacult Int. 16: 581-589.