



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DEL ABULÓN AZUL  
(*Haliotis fulgens*, Philippi 1845) POR EFECTO  
COMBINADO DE HIPOXIA Y ESTRÉS TÉRMICO

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación Biología Marina)

Presenta

**Samuel Calderón Liévanos**

La Paz, Baja California Sur, Febrero de 2015

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 20 del Mes de Febrero del 2015, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Respuestas fisiológicas del abulón azul (*Haliotis fulgens*) por efecto combinado de hipoxia y estrés térmico"**

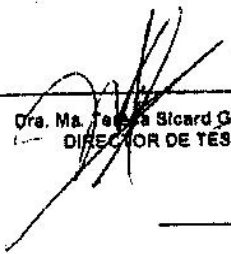
Presentada por el alumno:

**Samuel Calderón Liévanos**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **BIOLOGÍA MARINA**

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

### LA COMISION REVISORA

  
Dra. Ma. Teresa Stuard González  
DIRECTOR DE TESIS

  
Dr. Salvador E. Lluich Cote  
CO-TUTOR

  
Dr. Pedro Cruz Hernández  
CO-TUTOR

  
DRA. ELSIE SERRIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## **CONFORMACION DE COMITÉS**

### **Comité tutorial**

#### **Directora de Tesis:**

Dra. Ma. Teresa Sicard González (CIBNOR)

#### **Co-tutores:**

Dr. Pedro Cruz Hernández (CIBNOR)

Dr. Salvador Lluch Cota (CIBNOR)

### **Comité revisor de Tesis**

Dra. Ma. Teresa Sicard González

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dr. Salvador Lluch Cota

### **Jurado de Examen de Grado**

Dra. Ma. Teresa Sicard González

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dr. Salvador Lluch Cota

Dr. Teodoro Reynoso Granados (Suplente)

## RESUMEN

En el presente estudio se buscó comprender las respuestas que tiene el abulón azul (*Haliotis fulgens*) ante el efecto combinado de la temperatura (T°C) y oxígeno disuelto (OD). Lotes de organismos de  $3.1 \pm 0.35$  cm, se sometieron a condiciones extremas de hipoxia para estimar sus límites de tolerancia a diferentes temperaturas y se expusieron a condiciones extremas (1.0 mgO<sub>2</sub>/L) para evaluar las respuestas fisiológicas y supervivencia. Se estimó la tasa respiratoria (TR) por medio de un oxímetro Microx XT, y cambios en la composición de hemolinfa: paquete celular (CC) cuantificado con ayuda de un contador de células Multisizer 3, contenido de hemocianina (HC) por espectrofotometría directa (275 nm), proteínas totales (PT) usando el método de BCA, glucosa (GLU) con el método GOD-PAP y lactato (LAC) con el Kit comercial Sigma de Randox. Además, los organismos se expusieron a diferentes combinaciones de OD-T°C para ajustar modelos de superficie de respuesta a diferentes tiempos y se evaluó también la capacidad de los organismos para recuperarse de las condiciones extremas al ser regresados a condiciones normales. Los resultados indican que el abulón azul a 17°C reduce su TR en un 40%, mientras que en 23 y 26°C se disminuye en un 75% (P<0.05). En la hemolinfa los abulones presentaron reducciones en el número de células de entre 67-72% (P<0.05), mientras que se presentaron incrementos significativos en la HC y las PT entre el 18-21% y 30-37%, respectivamente. La GC tuvo aumentos del 20% a 17°C, mientras que a 23 y 26°C este fue arriba del 100% (P<0.05). En el caso del LAC los incrementos no fueron significativos (10-20%) (P>0.05). Cuando los organismos fueron expuestos a hipoxia extrema sostenida a 17°C la supervivencia fue del 100%, mientras que a 23 y 26°C el 50% de la mortalidad se presentó alrededor de las 30 y 40 h respectivamente, presentando capacidades de recuperación arriba del 80% cuando son regresados a condiciones de normoxia. El modelo predictivo a las 24 h indica supervivencias mayores de 75% debajo de los 25°C, situación que se mantuvo hasta las 48 h, cuando la supervivencia de 75% se presenta debajo de los 20°C. La pruebas t realizadas para los diferentes tiempos muestran que el OD por sí sólo no es responsable de la mortalidad causada hasta las 96 h (P<0.05), mientras que la temperatura desde las 24 h muestran una significancia (P>0.05). A partir de las 36 h se observa un efecto sinérgico O<sub>2</sub>-T°C que se va incrementando con el tiempo (P>0.05). Estos resultados son una base para lograr asociar los eventos de mortalidades que se observan en el campo, sin embargo, es necesario hacer un monitoreo continuo las variables ambientales.

Palabras claves: hipoxia, temperatura, cambios metabólicos, metabolitos, supervivencia, superficies de respuesta.

## ABSTRACT

The present study was aimed at understanding the responses of the green abalone (*Haliotis fulgens*) to the combined effects of temperature (T°C) and dissolved oxygen (DO). Groups of organisms  $3.1 \pm 0.35$  cm, were exposed to extreme conditions of hypoxia to estimate their tolerance to different temperatures, and also to extreme conditions ( $1.0 \text{ mgO}_2/\text{L}$ ) to evaluate the physiological and survival responses. The respiration rate (RR) was estimated using an oximeter Microx XT, and changes in the composition of hemolymph: Cells count (CC) quantified using a Multisizer 3 cell counter, hemocyanine content (HC) by direct spectrophotometry (275 nm), total protein (TP) using the BCA method, glucose (GLU) with the GOD-PAP method and lactate (LAC) with a commercial Sigma Radox kit. In addition, organisms were exposed to different combinations of OD-T°C to fit response surface models at different times, and the abalones capacity to recover from extreme conditions once returned to normality. The results indicate that at 17°C the TR decreases by 40%, while at 23 and 26°C the decrease reaches 75% ( $P < 0.05$ ). In the hemolymph, abalone showed reductions in the number of cells between 67-72% ( $P < 0.05$ ), whereas significant increases occurred in the HC and PT between 18-21% and 30-37% respectively. The GC had increases of 20% at 17°C, while at 23 and 26°C it increased over 100% ( $P < 0.05$ ). In the case of LAC increases were not significant (10-20%) ( $P > 0.05$ ). When the organisms were exposed to sustained extreme hypoxia levels, survival was 100% at 17°C, while at 23 and 26°C 50% of the mortality occurred around 30 and 40 h, respectively. Recovery capacity was above 80% for all treatments. The predictive model at 24 h indicates over 75% survival below 25°C, conditions that remained until 48 h, when 75% survival was present only below 20°C. The t tests for different times show that the OD alone does not cause mortality until 96 h ( $P < 0.05$ ), while the temperature showed strong effects since the 24 h ( $P > 0.05$ ). After 36 hours the synergistic effect OD-T°C became significant ( $P > 0.05$ ). These results, if accompanied by continuous environmental records, can be used for ecological analyses of massive mortalities occurring in the field.

Keywords: hypoxia, temperature, metabolic changes, metabolites, survival, response surfaces.

## DEDICATORIA

*A mi madre, Rebeca.*

*A mi padre, Samuel,*

*Mis dos pilares.*

*Por ser mis cimientos y siempre apoyarme en todas mis aventuras.*

*A mis hermanos,*

*Alejandro y Artemio.*

*Por ser mis fuentes de inspiración, consejeros y por siempre levantarme.*

*A Iveett,*

*mi futura esposa.*

*Gracias por regalarme los dos mejores años de mi vida, que aunque parecen poco, para mi es como una vida entera.*

*“La capacidad consiste en lo que usted es capaz de hacer, la motivación determina lo que usted hace, la actitud determina que tan bien lo hace”*

*Lou Holtz*

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi agradecimiento al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. por darme la oportunidad de realizar mis Estudios de Posgrado, a través del Programa de Estudios de Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales y a su Directora la Dra. Elisa Serviere Zaragoza, por tomarse el tiempo de revisar el presente documento.

A la beca de Maestría otorgada por CONACYT con el número 486634, la cual me permitió realizar mis estudios de posgrado y la presente tesis.

Al proyecto “Diagnóstico sobre la disminución de las poblaciones de abulón en la costa occidental de la Península de Baja California y estrategias para atenuar los impactos negativos” SAGARPA 126574, por los fondos otorgados que permitieron realizar este y otros trabajos.

Al Sr. Daniel Aguilar de la Cooperativa Pesquera de Bahía Tortugas por el apoyo con el material biológico para realizar este y otros trabajos.

Mi eterna gratitud para a la Dra. María Teresa Sicard González, mi directora de tesis y amiga incondicional, de quien recibí el mejor apoyo, consejos, ayuda, ánimos y las mejores llamadas de atención que lejos de ser regaños, para mí, fueron enseñanzas de vida, de corazón muchas gracias por ser la mejor maestra que he tenido en mi vida.

A los Doctores Pedro Cruz Hernández, y Salvador Emilio Lluch Cota, por ser parte de mi Comité Tutorial, gracias por el apoyo, consejos, asesorías, aportaciones y correcciones de la tesis.

Al Dr. Teodoro Reynoso Granados, gracias por aceptar estar en mi Comité Tutorial, por revisar mi escrito y por sus sugerencias.

A todo el personal del Laboratorio de Ecofisiología de Organismos acuáticos, por la ayuda brindada, M. en I. Gilberto González Soriano, por la capacitación para el

manejo del ECOSIM y el montaje del sistema experimental, los consejos y apoyo brindado, por enseñarme los conocimientos básicos para manejar el área húmeda del laboratorio; Al Ing. Julio Félix Domínguez, por capacitarme en el uso y manejo de todos los sistemas de cómputo.

Mi agradecimiento a la M. en C. Rosalinda Salgado García por la capacitación técnica para el uso de equipos, apoyo en la extracción de muestras durante los bioensayos, muchas gracias por acompañarme en esos desvelos y por los tantos invaluable consejos recibidos.

Al personal del Laboratorio de Respiración, Dra. Lucía Ocampo Victoria y la M. en C. Mónica Aurora Reza Sánchez, por el apoyo y consejos brindados.

Al M. en C. Roberto Hernández Herrera del Laboratorio de Bioquímica Fisiológica por el entrenamiento técnico para hacer los análisis de muestras de tejido y ayuda en el procesamiento de las muestras.

Al Ing. Jorge Cobos Anaya del Taller de Maquinados por la elaboración de las cámaras de incubación.

Mil gracias a la Maestra Diana Leticia Dorantes Salas de Traducción y Edición, por el apoyo brindado, consejos y ayuda con las clases de inglés y por su apoyo en la revisión del resumen traducido, muchas gracias!

Un especial agradecimiento a mis compañeros de laboratorio Biól. Jesús Donaldo Quiñonez Buitimea, Ing. Pesq. Jorge Ocampo Cebrero y al M. en C. Sergio Alan Ulaje Fernández, por todo el apoyo brindado durante los bioensayos, por su compañía, desvelos y los buenos momentos que me hicieron pasar, mientras vivíamos en el encierro.

A la M. en C. Himilce Velasco Echavarría, por darme la oportunidad de trabajar con ella y apoyarla en su tesis, así como también su apoyo brindado en la mía y proporcionarme la información necesaria para completar este trabajo.



A todo el personal de la Dirección de Estudios de Posgrado, Laboratorio de Cómputo y Biblioteca por todo el apoyo durante mi estancia en el CIB.

A el Biól. Mar. Julio Alberto Ayala Aguilar y el Biól. Mar. Jorge Alfredo Apodaca García, gracias por ser los mejores amigos y hermanos, por acompañarme en las buenas y en las malas, de no haber existido en mi vida y sacarme ese día de mi casa, nunca hubiera conocido al amor de mi vida.

A mi familia: Rebeca y Samuel, mis papás, gracias por apoyarme y siempre impulsarme a seguir estudiando, si hace diez años no me hubieran apoyado, no sé dónde estaría y papás muchas gracias por dejarme la mejor herencia que hay en la vida, mis estudios.

A mis hermanos Alejandro y Artemio, gracias por ser los mejores amigos del mundo, por siempre darme consejos y brindarme su apoyo y lo que es mejor por darme el regalo más hermoso del mundo que son mis sobrinos, Samuel, Leonardo y Enrique.

A mi futura esposa Iveett, el amor de mi vida, desde el día que te conocí supe que tu cambiarías mi vida por completo, muchas gracias por acompañarme con todo tu apoyo, regaños, consejos y cariño en este último año y por querer formar parte importante de mi vida.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>DEDICATORIA</b>	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iv
<b>CONTENIDO</b>	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>LISTA DE TABLAS</b>	xii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xiii
<b>GLOSARIO</b>	xiv
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>ANTECEDENTES</b>	5
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	8
<b>HIPÓTESIS</b>	9
<b>OBJETIVOS</b>	9
General	9
Específicos	9
<b>METODOLOGÍA</b>	10
Diseño experimental	10
Organismos experimentales	11
Origen	11
Aclimatación	12
Experimentación	13
Control de temperatura y oxígeno disuelto	15
Indicadores fisiológicos	16

Tasa respiratoria	16
Composición de hemolinfa	17
<u>Conteo de paquete celular</u>	18
<u>Determinación de hemocianina</u>	18
<u>Composición bioquímica</u>	18
<i>Proteínas Totales</i>	18
<i>Glucosa</i>	20
<i>Lactato</i>	20
Límite de tolerancia al oxígeno en relación a la temperatura	21
Capacidad de recuperación	21
Análisis de datos	21
Superficie de respuesta	22
<b>RESULTADOS</b>	23
Indicadores Fisiológicos	23
Tasa respiratoria	23
Composición de hemolinfa	25
Paquete celular	25
Contenido de hemocianina	26
Composición bioquímica	27
Proteínas Totales	27
Glucosa	28
Lactato	29
Tolerancia a hipoxia en relación a la temperatura	30
Capacidad de recuperación a hipoxia en función de la temperatura	31
Superficie de respuesta oxígeno-temperatura	31

<b>DISCUSIÓN</b>	37
<b>CONCLUSIONES</b>	45
<b>RECOMENDACIONES</b>	47
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	48

## LISTA DE FIGURAS

	Descripción	Página
Figura 1	Diseño experimental al que fueron sometidos juveniles de <i>H. fulgens</i> . Las ↑ indican los puntos en los que fue evaluada la tasa respiratoria y en el último punto (flecha dentro de un círculo) se evaluaron cambios en los metabolitos de la hemolinfa.	10
Figura 2	La figura a) muestra la forma en que se realizó el transporte de juveniles de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ) y b) se observa cómo fueron mantenidos a su llegada.	11
Figura 3	Cambios térmicos para realizar la aclimatación de organismos juveniles de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ). Las temperaturas experimentales se señalan con óvalos.	12
Figura 4	Mantenimiento de organismos de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ) durante el proceso de aclimatación dentro de los tanques del controlador térmico automatizado.	13
Figura 5	Sistema de cámaras selladas herméticamente con flujo continuo, utilizadas para incubar a los organismos de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ) y observar los cambios metabólicos de acuerdo al sistema experimental.	14
Figura 6	Esquema general que muestra la distribución de agua hacia el sistema de cámaras donde se incubaron organismos de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ) de diferentes lotes experimentales.	15
Figura 7	Procedimiento para extraer y procesar la hemolinfa de juveniles de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ), para realizar la cuenta del paquete celular y obtener muestra para análisis bioquímicos.	17
Figura 8	Procedimiento para estimar la cantidad de proteínas totales por el método de ácido bicinconínico en hemolinfa de juveniles de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ).	19
Figura 9	Tasa respiratoria ( $\bar{x} \pm ds$ ) de juveniles de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ) sometidos a hipoxia de 1.0 mgO <sub>2</sub> /L en tres diferentes temperaturas de aclimatación.	24
Figura 10	Tasa respiratoria ( $\bar{x} \pm ds$ ) de juveniles de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ) sometidos a hipoxia (1.0 mgO <sub>2</sub> /L) en tres diferentes temperaturas	25

de aclimatación.

Figura 11	Número de células en hemolinfa ( $\bar{x} \pm ds$ ) de juveniles de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ) sometidos a hipoxia (1.0 mgO <sub>2</sub> /L) en tres tratamientos térmicos.	26
Figura 12	Concentración de hemocianina ( $\bar{x} \pm ds$ ) en hemolinfa de juveniles de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ) sometidos a hipoxia (1.0 mgO <sub>2</sub> /L) en tres tratamientos térmicos.	27
Figura 13	Concentración de proteínas totales ( $\bar{x} \pm ds$ ) en hemolinfa de juveniles de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ) sometidos a hipoxia (1.0 mgO <sub>2</sub> /L) en tres tratamientos térmicos.	28
Figura 14	Concentración de glucosa ( $\bar{x} \pm ds$ ) en hemolinfa de juveniles de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ) sometidos a hipoxia (1.0 mgO <sub>2</sub> /L) en tres tratamientos térmicos.	29
Figura 15	Concentración de lactato ( $\bar{x} \pm ds$ ) en hemolinfa de juveniles de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ) sometidos a hipoxia (1.0 mgO <sub>2</sub> /L) en tres tratamientos térmicos.	30
Figura 16	Superficies de respuesta obtenidas a partir de los datos de supervivencia en juveniles de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ) sometidos a diferentes combinaciones de oxígeno disuelto y temperatura, a diferentes tiempos de exposición.	33
Figura 17	Pruebas t realizadas a los datos de supervivencia de juveniles de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ) por efecto de oxígeno disuelto y temperatura a diferentes tiempos de exposición.	35
Figura 18	Mortalidad global de los organismos juveniles de abulón ( <i>H. fulgens</i> ) expuestos a diferentes valores de oxígeno disuelto y temperatura en relación al tiempo.	36

## LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I Bioensayos realizados con organismos de abulón ( <i>H. fulgens</i> ), para cada una de las temperaturas experimentales.	14
Tabla II Tiempos (h) en los que se estimó la tasa respiratoria de juveniles abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ), en cada una de las temperaturas experimentales. Al tiempo final en cada temperatura, se extrajo la hemolinfa de los organismos para obtener otros indicadores fisiológicos.	16
Tabla III Tiempo letal medio (tLM) y mortalidad total (MT) de juveniles de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ) expuestos a dos diferentes concentraciones de oxígeno disuelto.	31
Tabla IV Capacidad de recuperación (%) de juveniles de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ) después de ser expuestos a hipoxia de 1.0 mgO <sub>2</sub> /L.	31
Tabla V Ecuaciones de la regresión correspondientes a las superficie de respuesta oxígeno-temperatura de juveniles de abulón azul ( <i>H. fulgens</i> ) a diferentes tiempos de exposición.	34

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido bicinconínico	BCA
El niño oscilación del sur	ENSO
Glucosa	GLU
Hemocianina	HC
Lactato	LAC
Mortalidad total	MT
Oxígeno	O <sub>2</sub>
Proteínas totales	PT
Tasa respiratoria	TR
Temperatura	T°C
Tiempo letal medio de mortalidad durante 96 horas de exposición	tLM



## GLOSARIO

Aclimatación	Capacidad de los organismos para compensar sus tasas fisiológicas ante un cambio ambiental establecido bajo condiciones controladas de laboratorio.
Anoxia	Situación en la que se registra ausencia de oxígeno en algún sistema.
Aguas corrosivas	Masas de agua del fondo oceánico introducidas a las zonas costeras por medio de una intensificación de las corrientes. Se caracteriza por carecer de oxígeno y pH ácido que provocan las llamadas zonas muertas.
Cambio climático	Variación de los parámetros ambientales del clima con respecto al historial climático a una escala global o regional. Pueden ser por consecuencia de una alteración en los factores físicos que controlan el clima o por causas intrínsecas del planeta.
Compensar	Capacidad de los organismos para restablecer la homeostasis ante cambios en su entorno, modificando sus tasas fisiológicas.
Condición	Cantidad de reservas de energía disponibles en un organismo.
Efecto sinérgico	Influencia de dos o más factores que actúan juntos, para producir un efecto mayor, a los efectos que tendrían por separado.
Factor	Elementos internos y externos, que afectan la fisiología de los organismos.
Hemocianina	Pigmento respiratorio presente en la hemolinfa de algunos invertebrados, compuesto por una proteína con dos átomos de cobre en su centro activo, encargado del transporte de oxígeno.
Hemolinfa	Sustancia circulatoria en invertebrados como artrópodos, arácnidos y moluscos, análoga a la sangre de los vertebrados.
Hipoxia	Disminución en la concentración promedio de oxígeno

	disuelto en algún sistema.
Homeostasis	Capacidad de los organismos para mantener estables las condiciones internas.
Límite de tolerancia	Condicionantes del medio donde los organismos pierden la capacidad de compensar, se rompe la homeostasis y eventualmente mueren.
Magnitud	Medida de la intensidad, la extensión o escala de un impacto.
Metabolismo	Conjunto de reacciones químicas que ocurren en las células de los organismos para obtener energía.
Mortalidad masiva (Mortandad)	Mortalidad que se presenta en una comunidad o en una región no asociada a la pesca.
Demersal	Organismo que vive próximo al fondo marino.
Bentónico	Organismo que vive asociado a los fondos marinos, fijados o no al sustrato.
Oxí-conformador	Organismo capaz de mantener su tasa respiratoria independiente de la concentración de oxígeno disuelto
Oxí-regulador	Organismo que pierde la capacidad de mantener su tasa respiratoria debido a la concentración de oxígeno disuelto.
Parámetro	Valor de referencia establecido para un factor en relación a un sistema.
Pigmento respiratorio	Proteína que contiene un centro activo (hierro o cobre), que transporta el oxígeno desde las superficies respiratorias hasta las células.
Poiquilotermo	Organismo cuya temperatura corporal varía con la del medio que lo rodea.
Punto crítico	Nivel de oxígeno en el cual un organismo pasa de ser oxí-conformador a ser oxí-regulador. Matemáticamente se establece como la derivada del cambio de la tasa respiratoria ante cambios en la concentración de oxígeno disuelto.

Resiliencia (elasticidad)	Capacidad de un organismo para restablecer su estado original después de haber sido perturbado.
Superficie de respuesta	Modelo estadístico que representa la respuesta de una especie ante el efecto combinado de al menos dos variables.
Tasa respiratoria	Oxígeno consumido por un organismo por unidad de tiempo.
Termotolerancia	Capacidad de los organismos para sobrevivir dentro de un intervalo térmico.
Tiempo letal medio	Tiempo en el que se registra el 50% de mortalidad de organismos bajo el efecto de un factor.
Variable	Factor externo o interno que es susceptible de cambiar.
Zona de resistencia	Intervalo de un factor que se establece a partir de los límites de tolerancia, en el cual los organismos pierden la homeostasis y eventualmente mueren.
Zona de tolerancia	Intervalo de un factor donde los organismos tienen la capacidad de compensar, desarrollarse adecuadamente y sobrevivir.

## INTRODUCCIÓN

El abulón constituye uno de los recursos pesqueros más importantes de México. El comercio de estos organismos en el país se inició desde 1940, pero fue a partir de 1950 cuando se tuvieron las mayores producciones (3,300 t), permitiendo a México llegar a ser uno de los principales productores del mundo, junto con Australia y Japón, aportando el 37% de la captura total y generando divisas y desarrollo social en los estados de Baja California y Baja California Sur (Casas-Valdez y Ponce-Díaz, 1996; Celis-Ceseña, 1996; Lluch-Cota y Hernández-Vázquez, 2006; CONAPESCA, 2011). Actualmente la producción se encuentra alrededor de 479 t con un valor aproximado de 5.7 millones de dólares (CONAPESCA, 2013).

Se trata de un molusco, gasterópodo, perteneciente a la familia Haliotidae, en la cual se ubican alrededor de 130 especies y subespecies. Habita en zonas costeras rocosas, asociado principalmente a mantos de macroalgas y pastos marinos, así como a poblaciones de otras especies de invertebrados. Son de hábitos nocturnos, dioicos y su fertilización es externa (Cox, 1962; Mazón-Suastegui *et al.*, 1996; Peter, 2003).

En México, las especies de abulón que habitan en la costa occidental de la Península de Baja California son el abulón rosca (*Haliotis assimilis*), el abulón rojo (*H. rufescens*), el abulón chino (*H. sorenseni*), el abulón negro (*H. craceherodii*), el abulón amarillo (*H. corrugata*) y el abulón azul (*H. fulgens*), siendo estas dos últimas las que mayormente han contribuido a la captura total nacional (Carreón-Palau *et al.*, 2003; Mazón-Suastegui *et al.*, 1996; León-Carballo y Muciño-Díaz, 1996; Lluch-Cota y Hernández-Vázquez, 2006). Sin embargo, a partir de los años 1960s, las poblaciones de abulón han disminuido de manera considerable, particularmente el abulón amarillo, por lo hoy en día la producción se sostiene básicamente por el abulón azul (Casas-Valdez y Ponce-Díaz, 1996; Lluch-Cota y Hernández-Vázquez, 2006; Díaz *et al.*, 2006; Searcy-Bernal *et al.*, 2013). Como

medida de manejo, a partir de 1996, se aplicaron de manera oficial nuevos criterios para las cuotas de captura de este recurso, teniendo como principal criterio los valores de densidad. Estas reducciones afectaron significativamente la economía de las comunidades de la región que dependen directa o indirectamente de esta actividad.

Adicionalmente, en los últimos 15 años se han observado incrementos importantes de mortalidad natural, de la cual se desconoce aún a ciencia cierta las causas (Rodríguez-Valencia *et al.*, 2004; Lluch-Cota y Hernández-Vázquez, 2006; Micheli *et al.*, 2012). Basta con mencionar que para el año 2011, hubo una reducción en la captura de 314 t que representó pérdidas cercanas a los 1.5 millones de dólares (CONAPESCA, 2011). Algunos autores mencionan que esta mortalidad puede deberse a cambios ambientales, como por ejemplo el efecto de “El Niño”, asociado a aumentos en la temperatura superficial del mar, que podrían causar estrés a las poblaciones de abulón (Lluch-Belda *et al.* 1996; Mazón-Suastegui *et al.* 1996; Guzmán del Proó *et al.*, 2003; Ponce-Díaz *et al.*, 2003). Estas observaciones no son exclusivas de México; en Chile, Noruega, Japón y E.U.A, se han reportado la incidencia de eventos similares que han impactado distintos sistemas pesqueros (Cheung *et al.*, 2008; Díaz, 2001; Siikavuopio *et al.*, 2007; Vaquer-Sunyer y Duarte, 2008; Vaquer-Sunyer y Duarte, 2011; Micheli *et al.*, 2012; Veas *et al.*, 2012).

Vaquer-Sunyer y Duarte (2008) y Vaquer-Sunyer y Duarte (2011), realizaron una revisión de los efectos del cambio climático sobre distintos sistemas naturales alrededor del mundo y mencionan que los disturbios que éste provoca en la distribución de masas de agua y de las corrientes marinas, trae como consecuencia cambios en las características químicas del océano, particularmente por eventos de hipoxia, aunque debe reconocerse que faltan registros que lo sustenten. Hernández-Miranda *et al.* (2012) menciona que la temperatura provoca cambios en la dinámica de las corrientes oceánicas y puede generar intrusión de aguas profundas, con bajos niveles de oxígeno y pH ácidos, hacia las zonas

costeras, exponiendo a poblaciones bentónicas a condiciones de estrés y eventualmente la muerte (Vosloo *et al.*, 2012a). En México, enfrentamos fuertes deficiencias en la disponibilidad de registros continuos de variables ambientales y de información biológica básica de muchas especies, por lo que resulta difícil asociar las variaciones del ambiente con los cambios en los recursos marinos (Rodríguez-Valencia *et al.*, 2004; Lluch-Cota y Hernández-Vázquez, 2006). Micheli *et al.* (2012), reportan condiciones de hipoxia en 2010 en la zona de Isla Natividad en 2010 y sugieren que éstas afectaron a las comunidades bentónicas sésiles, tales como el abulón, incapaces de escapar ante condiciones adversas.

La temperatura es un factor de primer orden que afecta el nivel de actividad metabólica de organismos poiquiloterms (Bayne, 1976; Armitage y Wall, 1982). Interviene en la velocidad con que se realizan los procesos metabólicos, provocando cambios fisiológicos necesidades energéticas distintas, variaciones en la condición, el estado de salud y el crecimiento (Bernabé, 1991). Además, por ser una variable permisiva, atraviesa barreras físicas y puede provocar efectos directos sobre la estructura de todas las macromoléculas (Hickey y Singer, 2004). La termotolerancia es la capacidad de los organismos a soportar un intervalo de temperatura y está asociada a la especie, al historial térmico de la población, a la temperatura de aclimatación y a algunos factores externos como la salinidad y el oxígeno disuelto, e internos como la edad, talla, el estado reproductivo, entre otros (Bayne 1976; Green *et al.*, 1983; Quinn *et al.*, 1994). Por su parte, el oxígeno disuelto, es la variable ambiental más limitante para las especies acuáticas, ya que las reacciones metabólicas aerobias son controladas por la disponibilidad de éste (Villarreal, 1984). En el medio marino los niveles normales o normoxia están entre 8.0 y 5.0 mgO<sub>2</sub>/L mientras que en condiciones de hipoxia éstos pueden ser menores a 2.8 mgO<sub>2</sub>/L. La tolerancia a la hipoxia es específica y depende del nivel de actividad metabólica (Cheung *et al.*, 2008) y esto está asociado a factores internos como son la edad, condición, estado reproductivo, etc., y a factores externos principalmente la temperatura (Bayne, 1976).

Para lograr asociar los cambios ambientales a las respuestas de los organismos, se debe por un lado lograr el registro continuo de las variables ambientales y por otro establecer las bases fisiológicas de respuesta ante variables, en este caso temperatura y oxígeno disuelto. Lo anterior implica determinar los límites de tolerancia, zona de resistencia, así como el efecto sinérgico entre factores. Una posibilidad para caracterizar dicho efecto sinérgico es el uso de modelos matemáticos como las superficies de respuesta.

En el presente trabajo, se estudiaron las respuestas fisiológicas del abulón azul (*Haliotis fulgens*) ante los efectos combinados de temperatura y oxígeno. Se identificaron límites de tolerancia y zonas de resistencia de oxígeno disuelto en relación a la temperatura en exposiciones de 96 horas, simulando condiciones extremas sostenidas. Adicionalmente, se implementó un modelo de superficie de respuesta utilizando datos de mortalidad observada durante las simulaciones en laboratorio. El modelo se propone como una herramienta con valor predictivo de mortalidades en el ambiente natural, una vez que se alimente con registros térmicos y de oxígeno disuelto.

## ANTECEDENTES

Los cambios en la abundancia de las poblaciones de abulón han sido atribuidos mayormente al efecto de la sobreexplotación pesquera y la falta de regulación adecuada (Mazón-Suastegui *et al.*, 1996; Morales-Bojórquez *et al.*, 2008).

Sin embargo, existen evidencias de que también los efectos del aumento de la temperatura superficial del mar en las zonas de pesca de abulón, afectan el crecimiento individual, reclutamiento pesquero y/o mortalidad de abulones y en consecuencia los rendimientos pesqueros (Lluch-Belda *et al.*, 1996; Ponce-Díaz *et al.*, 2003). Rodríguez-Valencia *et al.* (2004) reportaron diferencias en aumento térmico con impacto en los abulones entre dos zonas cercanas de Isla Cedros, B.C.S., evidenciando que los organismos están adaptados a microclimas.

Se han realizado distintos estudios de termotolerancia para abulón azul, pero no todos concuerdan. Leighton *et al.* (1981) trabajó con organismos juveniles de California EUA y describe al abulón azul como una especie tropical, con un intervalo óptimo entre 22°C y 28°C y una temperatura letal media a 48h de 31.5°C. González-Avilés y Shepherd (1996), para poblaciones de Isla Cedros B.C.S, encontraron un mayor crecimiento en temperaturas entre los 20°C y 23°C. McBride *et al.* (2001) en Israel, evaluaron el potencial de crecimiento a diferentes temperaturas y mencionan que éste es mayor en temperaturas entre 20°C y 22°C, coincidiendo con los anteriores autores. Díaz *et al.* (2006), trabajaron con organismos juveniles de la zona de Eréndira en Ensenada B.C., encontrando una preferencia térmica y temperatura óptima de crecimiento en 25.4°C y 24.6°C respectivamente y una temperatura crítica máxima de 33.6°C. García-Ezquivel *et al.* (2007) determinaron la supervivencia, crecimiento y composición de tejidos a diferentes temperaturas y fotoperiodos en abulones juveniles provenientes también de la zona de Eréndira y observaron mejores rendimientos y supervivencias a 20°C, mientras que en abulones sometidas a 25°C observaron signos de estrés, alteraciones en sus ritmos fisiológicos y retraso en la



maduración. Recientemente Velasco-Echavarría (2014), trabajó con juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) provenientes de Bahía Tortugas B.C.S. y evaluó el potencial de crecimiento a diferentes temperaturas. Esta autora encontró la temperatura óptima de crecimiento a 23°C y un intervalo térmico entre <3°C-33°C, coincidiendo con el intervalo de temperaturas registradas en la zona.

En relación a la hipoxia, para el año de 2009 se reportó una mortalidad masiva de Haliotidos (entre otras especies de invertebrados marinos), al sur de Isla Natividad en B.C.S., con un impacto negativo que se estimó en una reducción del 75% de la biomasa de abulón (Michelis *et al.*, 2012). Una medición puntual del momento reveló niveles de oxígeno de 0.9 mgO<sub>2</sub>/L. Con base a lo sucedido, Michelis *et al.* (2012) colocaron sensores para registrar el oxígeno disuelto en varios puntos alrededor de Isla Natividad. Estos autores lograron asociar para el 2010, reportes de eventos con concentraciones menores a 4.6 mgO<sub>2</sub>/L por periodos de 23 días y en otras ocasiones menores a 2.0 mgO<sub>2</sub>/L durante periodos mayores a 21 h, observándose reducciones en la biomasa de alrededor de un 30%.

En cuanto a trabajos realizados en laboratorio, Balwdin *et al.* (2007) trabajaron con abulones adultos de *Haliotis asinina* y describieron los efectos de hipoxia evaluando los metabolitos en el músculo y en el pie. Estos autores observaron un incremento de D-lactato y tauropina en organismos expuestos al aire, así como una reducción en el pH de la hemolinfa. Un resultado similar fue el encontrado por Gäde (1986) con juveniles de *Haliotis lamellosa*, donde después de ser expuestos a periodos de ejercicio y 6 h de anoxia, se encontró la formación de tauropina en el músculo y de D-lactato en el pie, aunque mostraron una rápida capacidad de recuperación, menor a 2 h, al ser regresados a condiciones normales. En juveniles de *Haliotis diversicolor supertexta*, Cheng *et al.* (2004) encontraron que los organismos pueden resistir concentraciones de 4.98 mgO<sub>2</sub>/L al presentar una supervivencia del 100% después de 96 h de exposición, mientras que a concentraciones de 3.0 y 2.11 mgO<sub>2</sub>/L su resistencia es menor, presentándose una mortalidad total después de las 72 y 48 h respectivamente. Adicionalmente,

estos autores observaron un incremento en la osmolaridad y disminución del pH en la hemolinfa, mientras la concentración de glucosa y lactato aumentó con la hipoxia. Trabajos realizados en *Nassarius festivus* (un gasterópodo bentónico de las costas japonesas) y *Strongylocentrus droebachinensis* (el erizo verde en Noruega), sugieren que una exposición prolongada a la hipoxia provoca efectos negativos en el metabolismo y el crecimiento. Además, se ha observado que hipoxias prolongadas afectan la calidad y la cantidad de huevos durante la reproducción, provocando una reducción en las poblaciones de dichas especies (Cheung *et al.*, 2008; Siikavuopio *et al.*, 2007).

En el abulón azul *Haliotis fulgens*, falta generar información sobre indicadores fisiológicos bajo condiciones de hipoxia a distintas temperaturas, no se tienen referencias sobre los límites de tolerancia al oxígeno en relación a la temperatura que permitan relacionar con eventos ambientales y también se desconoce la capacidad de recuperación de la especie ante un evento prolongado de hipoxia.

## **JUSTIFICACIÓN**

En los últimos 15 años, las poblaciones de abulón azul (*Haliotis fulgens*) han disminuido provocando pérdidas importantes para los productores. Adicional a esto se han observado mortalidades masivas naturales que no han sido esclarecidas, pero al parecer están asociadas a cambios en el ambiente, particularmente al aumento de la temperatura y condiciones de hipoxia. Es necesario realizar estudios biológicos que permitan relacionar el efecto combinado de ambos factores y por otro lado impulsar el registro de variables ambientales para la región.

## **HIPÓTESIS**

Ante condiciones ambientales extremas, los organismos llegan a sus límites de tolerancia y presentan respuestas fisiológicas que pueden funcionar como indicadores de estrés. Entonces, al someter al abulón azul (*H. fulgens*) a simulaciones combinadas de temperatura y oxígeno disuelto, es posible determinar sus límites de tolerancia, zonas de resistencia e indicadores fisiológicos ante estas variables. Adicionalmente es posible generar una superficie de respuesta.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Estudiar las respuestas fisiológicas en juveniles de abulón azul (*Haliotis fulgens*) por el efecto combinado de hipoxia y estrés térmico.

### **Específicos**

Para organismos juveniles de abulón azul:

- 1) Estudiar los cambios en la tasa respiratoria en relación al efecto combinado de temperatura y oxígeno disuelto.
- 2) Observar los cambios en la composición de la hemolinfa en relación al efecto combinado de temperatura y oxígeno disuelto.
- 3) Establecer los límites de tolerancia y zonas de resistencia al oxígeno a diferentes temperaturas.
- 4) Evaluar la capacidad de recuperación de organismos sometidos al efecto combinado de temperatura y oxígeno disuelto.
- 5) Obtener la superficie de respuesta del efecto combinado de temperatura y oxígeno disuelto.

## METODOLOGÍA

### Diseño experimental

El diseño experimental consistió en aclimatar organismos juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) a diferentes temperaturas y posteriormente someterlos a condiciones de hipoxia y normoxia, para evaluar cambios en la tasa respiratoria y de algunos metabolitos de la hemolinfa. Durante la etapa experimental un grupo de organismos se mantuvo en hipoxia hasta la mortalidad total para estimar sus límites de tolerancia y zonas de resistencia. Paralelamente otro grupo se mantuvo bajo las mismas condiciones y una vez que se inició la mortalidad, los organismos se regresaron a condiciones de normoxia para observar su capacidad de recuperación (Figura 1).

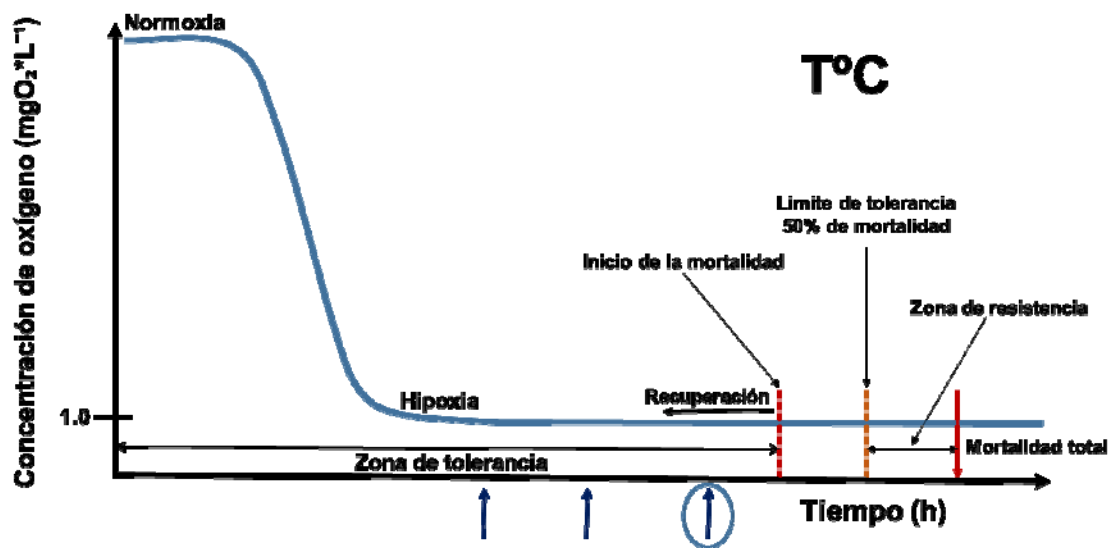


Figura 1. Diseño experimental al que fueron sometidos juveniles de *H. fulgens*. Las ↑ indican los puntos en los que fue evaluada la tasa respiratoria y en el último punto (flecha dentro de un círculo) se evaluaron cambios en los metabolitos de la hemolinfa.

## Organismos experimentales

### Origen

Se utilizaron organismos juveniles de abulón azul (*Haliotis fulgens*) de entre 2.0 a 4.0 cm de longitud, proporcionados por la Cooperativa Pesquera de Bahía Tortugas. Los abulones fueron transportados en un recipiente de poliuretano con hojas de macroalga y bolsas de hielo seco en gel en el fondo (Figura 2a) hasta las instalaciones del Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos (LEOA) del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). A su llegada los organismos se colocaron en tanques plásticos (80 L) con agua marina filtrada (5 µm), salinidad 38 ups, aireación constante, a la temperatura inicial a la que se recibieron (17°C y 20°C) y un fotoperiodo de 12:12. La alimentación se realizó *ad libitum* con hojas de la macroalga *Macrocystis pyrifera* previamente rehidratadas. Cada dos días, se realizó recambio de agua del 50% bajo las mismas condiciones y las frondas de alimento fueron cambiadas. La temperatura se registró continuamente usando un sensor HOBO (marca Onset modelo Pendant) colocado en el fondo de cada tara y así como la mortalidad (Figura 2b).

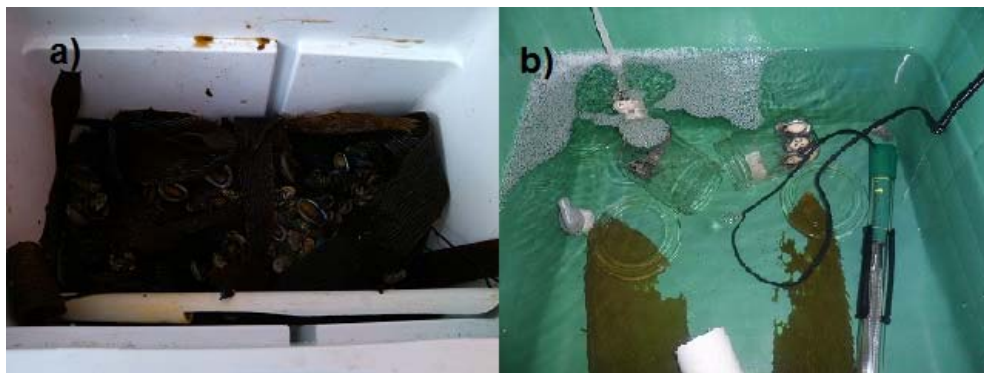


Figura 2. La figura a) muestra la forma en que se realizó el transporte de juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) y b) se observa cómo fueron mantenidos a su llegada.

### Aclimatación

Organismos juveniles de abulón azul de 3.5 a 4.5 cm de longitud fueron aclimatados a las temperaturas experimentales de 17, 23 y 26°C. La aclimatación se llevó a cabo a partir de la temperatura de recepción, incrementando o disminuyendo la temperatura en  $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{día}^{-1}$  hasta alcanzar la temperatura deseada (Figura 3). Los cambios térmicos se realizaron dentro de tanques plásticos de 140 L por medio de un controlador térmico automatizado (Figura 4). Durante este periodo la alimentación se realizó a base de pelletizados comerciales elaborados por Nutrimentos Acuícolas Azteca, con 35% de proteína.

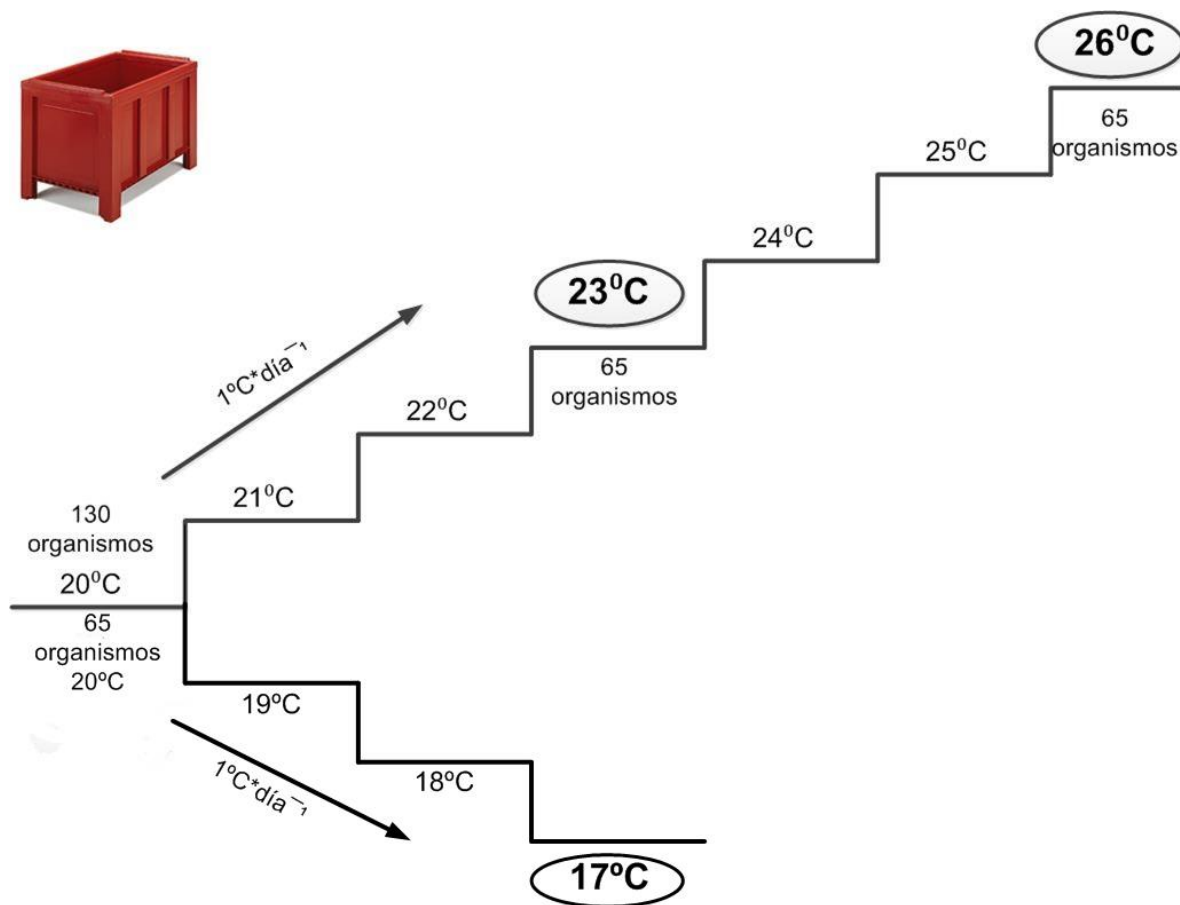


Figura 3. Cambios térmicos para realizar la aclimatación de organismos juveniles de abulón azul (*H. fulgens*). Las temperaturas experimentales se señalan con óvalos.



Figura 4. Mantenimiento de organismos de abulón azul (*H. fulgens*), durante el proceso de aclimatación dentro de los tanques del controlador térmico automatizado.

## Experimentación

A partir de los organismos aclimatados a las diferentes temperaturas (17, 23 y 26°C), 40 juveniles de cada temperatura fueron incubados de forma individual en cámaras de vidrio cerradas herméticamente y con flujo continuo ( $\approx 40\text{mL}/\text{min}$ ) a una salinidad de 39 ups. Las cámaras se dividieron en 4 tanques, colocando 10 cámaras con organismo más dos cámaras blanco. Cada cámara fue alimentada por medio de un sistema de mangueras con agua marina filtrada a  $1\ \mu\text{m}$  a la temperatura y condición experimental deseada, de acuerdo a la Tabla 1. Por otro lado, de cada cámara salía una manguera que se colocó en un distribuidor (Figura 5).



**Tabla I.-** Bioensayos realizados con organismos de abulón (*H. fulgens*), para cada una de las temperaturas experimentales.

Normoxia (7.8 mgO <sub>2</sub> /L)	Hipoxia (1.0 mgO <sub>2</sub> /L)		
Lote 1 (Control)	Lote 2 (Indicadores fisiológicos)	Lote 3 (Límite de tolerancia y zona de resistencia)	Lote 4 (Capacidad de recuperación)
Tasa Respiratoria	Tasa Respiratoria	Tasa Respiratoria	
Metabolitos en hemolinfa	Metabolitos en hemolinfa		
Supervivencia		Supervivencia (hasta mortalidad total)	Supervivencia (hasta inicio de mortalidad)



Figura 5. Sistema de cámaras selladas herméticamente con flujo continuo, utilizadas para incubar a los organismos de abulón azul (*H. fulgens*) y observar los cambios metabólicos de acuerdo al sistema experimental.

## Control de temperatura y oxígeno disuelto

Las condiciones experimentales descritas en el diseño experimental, se lograron gracias a un sistema de control de variables ambientales automatizado (Ecosim) que controla la temperatura y el oxígeno disuelto (entre otros factores). El control se realiza dentro de tinajas de 800 L y el agua es bombeada y distribuida al sistema de cámaras para cada lote experimental de organismos (Figura 6).

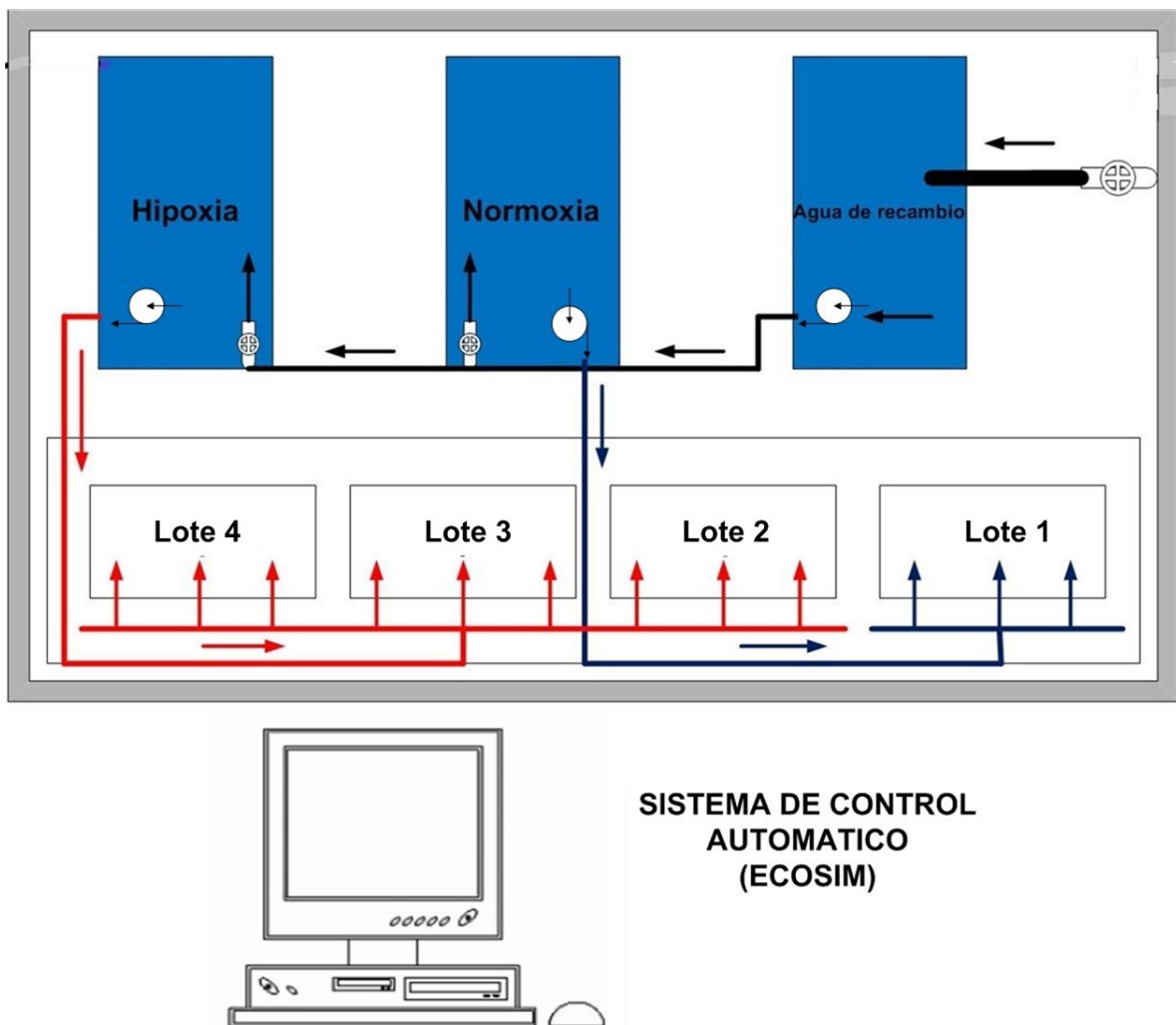


Figura 6. Esquema general que muestra la distribución de agua hacia el sistema de cámaras donde se incubaron organismos de abulón azul (*H. fulgens*) de diferentes lotes experimentales.

## Indicadores fisiológicos

### Tasa Respiratoria

La tasa respiratoria (TR) se determinó midiendo el consumo de oxígeno por unidad de tiempo (mgO<sub>2</sub>/g/h). Para esto los organismos del Lotes 2 y 3 fueron incubados y se estimó la concentración de oxígeno disuelto (OD) a la salida de agua de cada cámara, por medio de una oxímetro Microx TX equipado con un micro sensor de fibra óptica (10-30 µm de diámetro) adaptado a una celda de flujo continuo. Este equipo se encontraba conectado a una computadora y se maneja por medio del software específico Oxyview (Versión 4.16). Las lecturas de OD fueron registradas cada segundo por el oxímetro, por intervalos de 2 minutos en cada cámara, empezando por los organismos en normoxia (Lote 1) y después con los sometidos a hipoxia (Lotes 2 y 3). Para cada temperatura se determinó la TR en tres tiempos diferentes (Tabla II) antes de que se presentara mortalidad, según experimentos preliminares. El consumo de oxígeno se calculó por diferencia entre el OD de la cámara blanco menos el OD de cada una de las cámaras con organismo. La tasa respiratoria se estimó de la siguiente forma:

$$TR = (\text{Consumo de oxígeno} \times \text{Flujo de la cámara}) / \text{peso de tejido seco}$$

**Tabla II.-** Tiempos (h) en los que se estimó la tasa respiratoria de juveniles abulón azul (*H. fulgens*), en cada una de las temperaturas experimentales. Al tiempo final en cada temperatura, se extrajo la hemolinfa de los organismos para obtener otros indicadores fisiológicos.

17°C	23°C	26°C
2	2	1
40	20	5
70	35	8

Al final de la última determinación de TR, los organismos se sacaron de las cámaras para medirlos, pesarlos y extraer la hemolinfa.

### Composición de la hemolinfa

La composición bioquímica de la hemolinfa y el paquete celular fueron estimados una vez que se realizó la última determinación de tasa respiratoria. Los organismos control (Lote 1) y los organismos sometidos a hipoxia (Lote 2) fueron extraídos de las cámaras y para cada uno se realizó la rutina mostrada en la Figura 7.

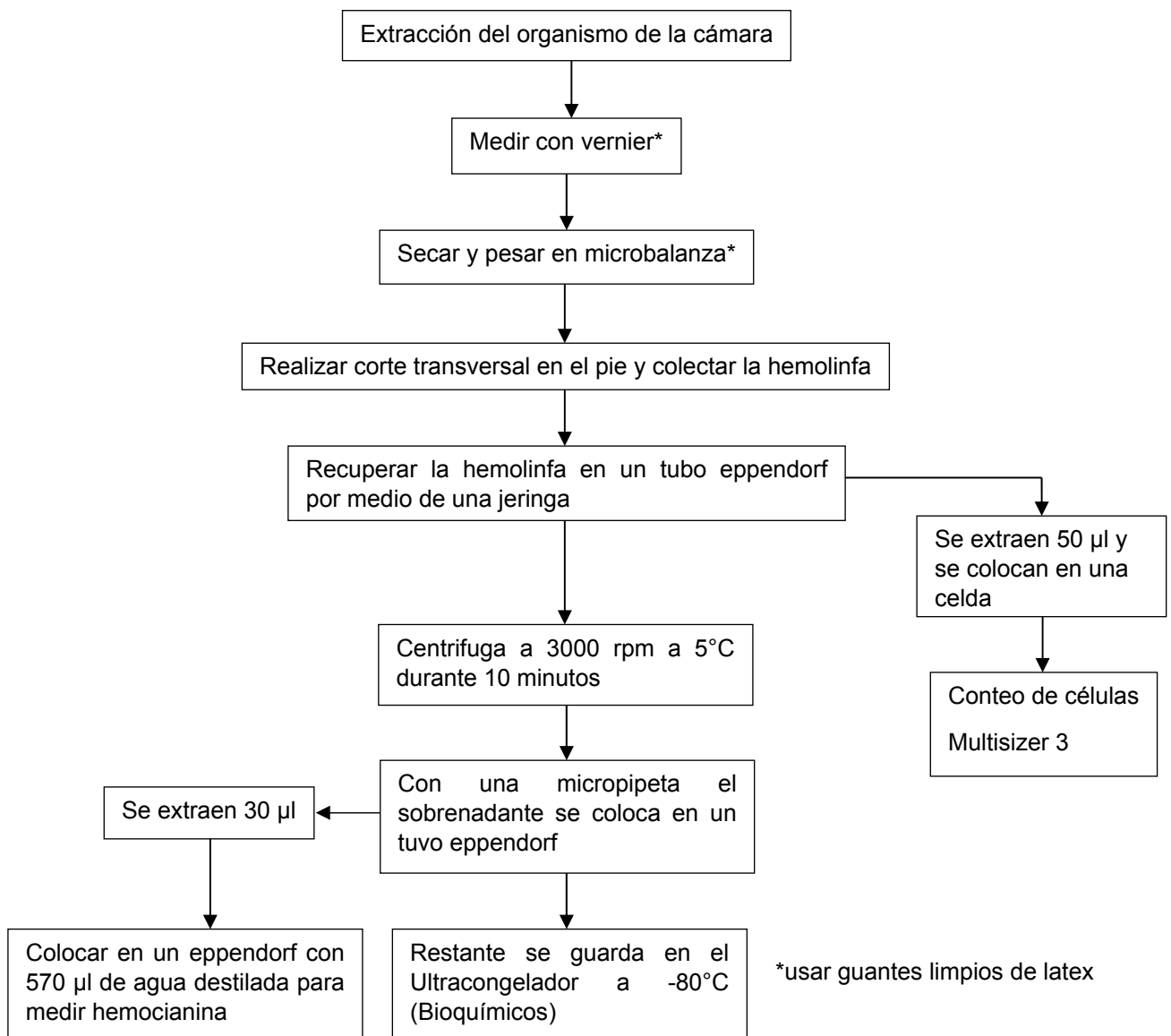


Figura 7. Procedimiento para extraer y procesar la hemolinfa de juveniles de abulón azul (*H. fulgens*), para realizar la cuenta del paquete celular y obtener muestra para análisis bioquímicos.

#### Conteo de paquete celular

El conteo del paquete celular (CC) se realizó a partir de una muestra de 50  $\mu$ l de hemolinfa. Una vez tenida la muestra, se realizó una dilución (1:1000) con agua marina filtrada a 1  $\mu$ m y el conteo de células totales se realizó utilizando el contador de partículas Multisizer 3.

#### Determinación de hemocianina

La determinación de hemocianina (HC) se realizó a partir de una muestra obtenida según lo descrito en la Figura 8. Se preparó una dilución con 30  $\mu$ L de hemolinfa y 570  $\mu$ L de agua destilada en un tubo eppendorf. La dilución se colocó en una celda de cuarzo y se midió en un espectrofotómetro a 275 nm de longitud (Racotta y Palacios, 1998).

#### Composición bioquímica

##### *Proteínas totales*

La determinación de las proteínas totales (PT) se realizó por medio del método de BCA o Ácido Bicinconínico (Fujimoto *et al.*, 1985). Este método se basa en el principio de que las proteínas reducen los iones cúpricos a iones cuprosos bajo condiciones alcalinas. Los iones cuprosos reaccionan con el ácido bicinconínico, sal sódica (verdoso) para formar un color morado. El color formado es proporcional al contenido proteico de la muestra. Se utiliza una solución reactiva comercial de Sigma (solución de ácido bicinconínico B9643 y solución de sulfato de cobre II C2284). Se tomaron 25  $\mu$ L de muestra en una microplaca, a la cual se le agregaron 200  $\mu$ L de reactivo de BCA y se incubaron a 60°C durante 15 minutos y se leyeron a 562 nm. La Figura 8 muestra el procedimiento seguido para las muestras de hemolinfa de abulón azul.

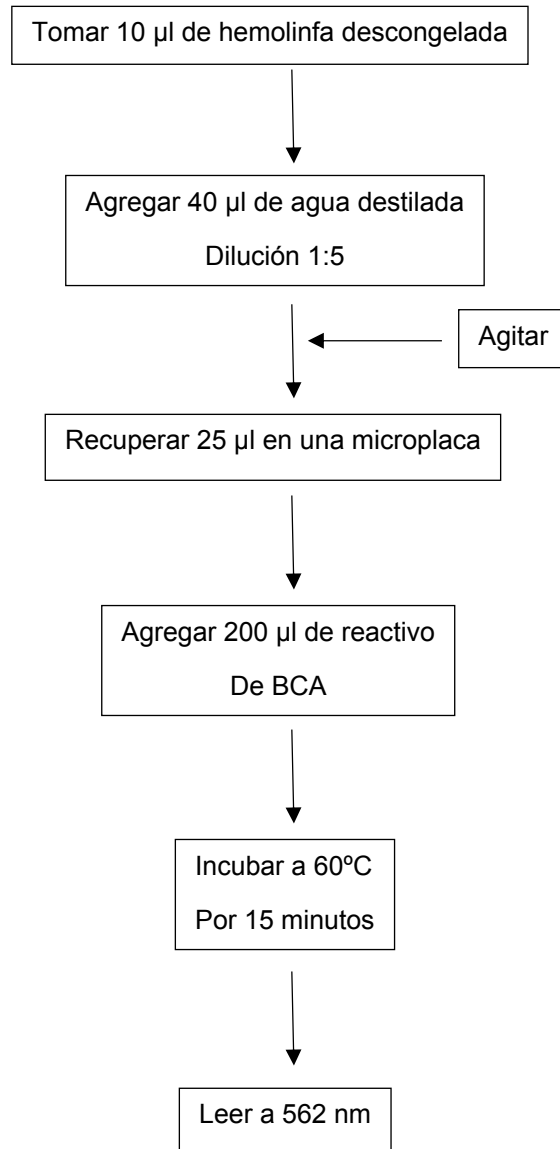


Figura 8. Procedimiento para estimar la cantidad de proteínas totales por el método de ácido bicinconínico en hemolinfa de juveniles de abulón azul (*H. fulgens*).

### *Glucosa*

Para medir la glucosa (GLU), se utilizó una prueba enzimática colorimétrica comercial (Kit de RANDOX método GOD-PAP, No. Catalogo AY 891). El método se basa en la oxidación de glucosa por medio de la enzima glucosa oxidasa, provocando la formación de peróxido de hidrogeno, que a su vez reacciona, catalizado por la peroxidasa, con fenos y 4-aminofenazona para formar quinoneimina, un indicador rojo-violeta, cuya intensidad es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra. La reacción se realizó colocando 40  $\mu$ L en pozos de una microplaca, a las cuales se les agregó 200  $\mu$ L de solución reactiva, se esperó durante 30 minutos. Posteriormente las muestras fueron leídas a 490 nm (Racotta y Palacios, 1998).

### *Lactato*

El lactato (LAC) se determinó por una prueba enzimática colorimétrica comercial (Kit de RANDOX, No. Catalogo LC 2389). Consiste en que el ácido láctico en presencia del oxígeno con la ayuda de lactato oxidasa dan lugar a piruvato + peróxido de hidrogeno, este último reacciona con 4-chorofenol y 4-aminoantipirina en presencia de peroxidasa da lugar a un compuesto colorido (quinoneimina), el cual es directamente proporcional a la concentración de lactato presente en la muestra. Para las determinaciones se tomaron 40  $\mu$ L en pozos de una microplaca a las cuales se les agregó 200  $\mu$ L de solución reactiva, transcurridos 10 minutos, las muestras fueron leídas a 540 nm (Racotta y Palacios, 1998).

### **Límite de tolerancia al oxígeno en relación a la temperatura**

El límite de tolerancia al oxígeno en relación a la temperatura se determinó en base al método de temperatura letal incipiente propuesto por Fry (1947). Los organismos del Lote 3 de cada temperatura experimental fueron sometidos de forma individual dentro de las cámaras de incubación a hipoxia progresiva hasta 1.0 mgO<sub>2</sub>/L y mantenidos bajo estas condiciones de forma permanente. Los abulones fueron revisados a intervalos de 1 h hasta observar mortalidad total (MT). El mismo procedimiento se realizó en organismos llevados a hipoxia de 1.5 mgO<sub>2</sub>/L. El tiempo letal medio (tLM) para cada concentración de oxígeno y para cada temperatura fue aquel tiempo en el que se tuvo el 50% de los organismos muertos.

### **Capacidad de recuperación**

Para evaluar la capacidad de recuperación en juveniles de abulón azul sometidos a condiciones de hipoxia y estrés térmico, en cada una de las temperaturas experimentales (17, 23 y 26°C), los organismos del Lote 4 se dejaron en condiciones de hipoxia continua de la misma forma descrita en el párrafo anterior. Una vez que se presentó el primer organismo muerto, los organismos restantes fueron regresados a normoxia colocándoles un aireador. Para evaluar la capacidad de recuperación se registró la mortalidad cada 2 h hasta un periodo de 48 h.

### **Análisis de datos**

Con los datos obtenidos se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA) al 95% de confianza, para evaluar el efecto de la hipoxia y el estrés térmico sobre los cambios en la tasa respiratoria; paquete celular, pigmentos respiratorios y composición bioquímica de la hemolinfa. En los casos en que se encontraron



efectos significativos, se realizó una prueba *a posteriori* de Tukey para mostrar estas diferencias.

### **Superficie de respuesta**

La superficie de respuesta se elaboró con los resultados de supervivencia en diferentes tiempos de exposición a las diferentes concentraciones de oxígeno disuelto y por efecto de la temperatura. Los datos fueron completados con resultados obtenidos del trabajo de Velasco-Echavarría (2014), realizado de forma simultánea y con el mismo lote de organismos. Para obtener el modelo, se realizó una regresión múltiple no lineal con ajuste de superficie de respuesta que establece las zonas de tolerancia y resistencia en relación al efecto combinado de oxígeno-temperatura, cuya ecuación es:  $Y = a + bx_1 + cx_1^2 + dx_2 + ex_2^2 + fx_1x_2$ , donde Y es la respuesta de interés; a, b, c, d y e son los coeficientes estimados por la regresión y  $x_1$  y  $x_2$  son las variables de efecto (oxígeno y temperatura). Para probar si existía un efecto sinérgico entre oxígeno y temperatura, se realizó una prueba t entre los tratamientos por separado y en combinación, con una significancia de  $P < 0.05$  (Bradley, 2007). Por último como criterio para establecer el tiempo en el cual se observan los mayores cambios en la mortalidad, se graficó la mortalidad global de los individuos de *H. fulgens* expuestos a diferentes valores de OD y temperatura, en relación al tiempo de exposición.

## RESULTADOS

### Indicadores fisiológicos

#### Tasa Respiratoria

La Figura 9 muestra los resultados de TR de juveniles de abulón azul mantenidos en normoxia, como mantenidos en hipoxia a diferentes temperaturas. Se puede observar que los organismos sometidos a hipoxia mostraron TR menores en relación a sus controles: a 17°C la reducción metabólica fue aproximadamente del 40%, mientras que para los de 23 y 26°C la disminución fue más drástica, alrededor del 75%, en todos los casos se presentaron diferencias significativas en relación a los controles ( $P < 0.05$ ). La Figura 10 muestra las TR promedio en relación a la temperatura tanto de organismos expuestos a hipoxia como de sus controles. La temperatura influyó sobre la TR de organismos mantenidos en normoxia, ya que se observa una relación directa encontrándose diferencias significativas entre los organismos mantenidos a 17°C respecto a los mantenidos a 26°C ( $P < 0.05$ ). En cambio se observó que la temperatura no influyó en la TR de los organismos mantenidos a hipoxia ( $P > 0.05$ ).

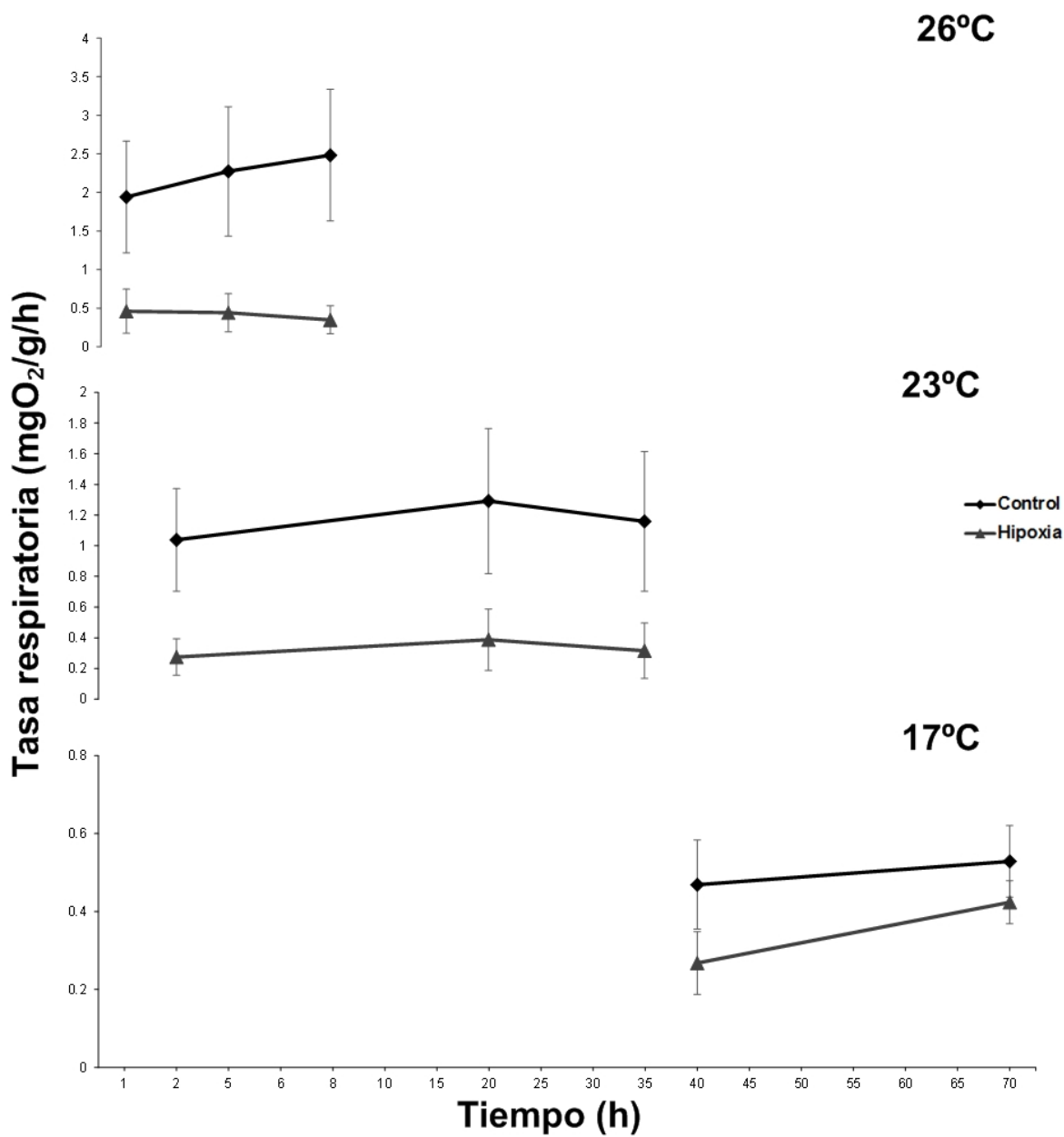


Figura 9. Tasa respiratoria ( $\bar{x} \pm ds$ ) de juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) sometidos a hipoxia de 1.0 mgO<sub>2</sub>/L en tres diferentes temperaturas de aclimatación.

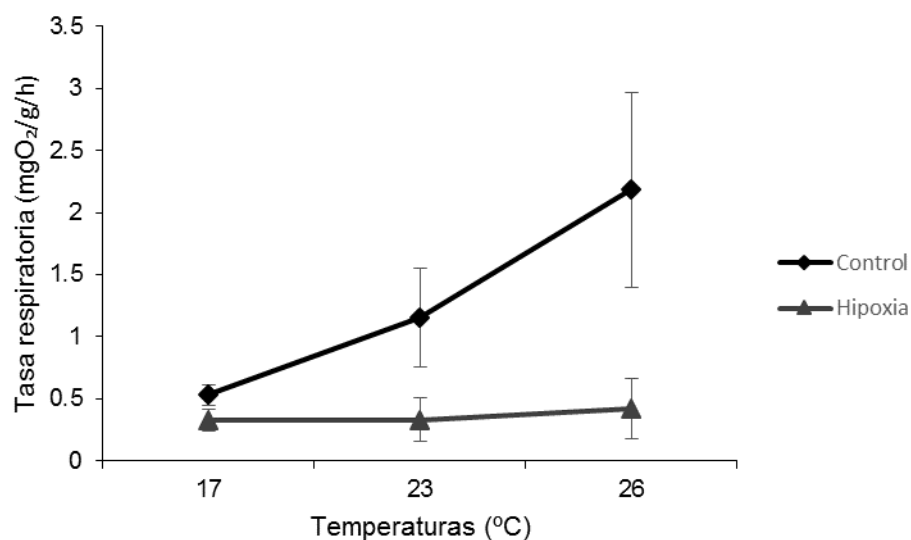


Figura 10. Tasa respiratoria promedio ( $\bar{x} \pm ds$ ) de juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) sometidos a hipoxia (1.0 mgO<sub>2</sub>/L) en tres diferentes temperaturas de aclimatación.

## Composición de hemolinfa

### Paquete celular

La Figura 11 muestra los cambios en el número de células de organismos sometidos a hipoxia comparados con sus controles a las diferentes temperaturas experimentales. En relación al oxígeno se observó una disminución muy marcada del número de células de los organismos mantenidos a hipoxia en relación a sus controles con diferencias significativas a 17 y 26°C ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, a la temperatura de 23°C el número de células en el control fue menor que el de los organismos mantenidos a hipoxia. Por otra parte, al comparar entre temperaturas, se observó una tendencia a reducir el número de células en organismos mantenidos en normoxia en relación al aumento de temperatura, encontrándose diferencias entre las tres temperaturas ( $P < 0.05$ ). En los organismos mantenidos a hipoxia, se observó que el número de células variaron de manera inversa en relación a la temperatura, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

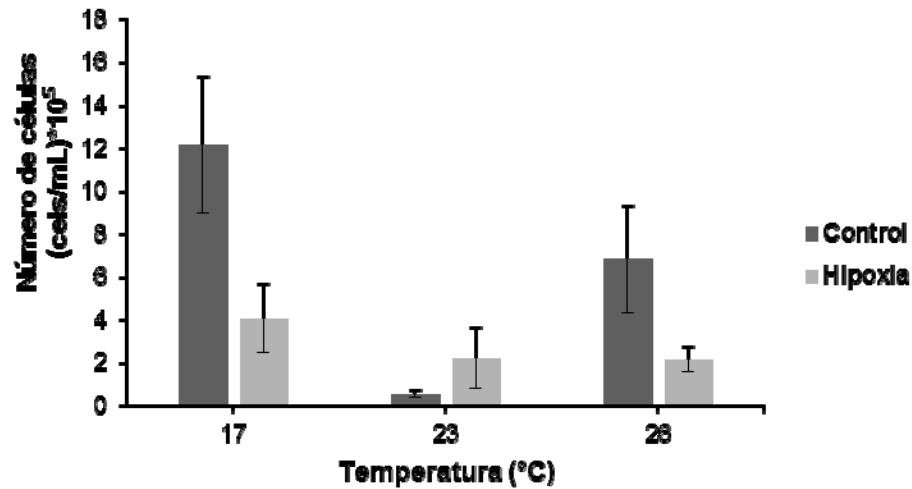


Figura 11. Número de células en hemolinfa ( $\bar{x} \pm ds$ ) de juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) sometidos a hipoxia (1.0 mgO<sub>2</sub>/L) en tres tratamientos térmicos.

#### Contenido de hemocianina

Los resultados del contenido de HC de organismos mantenidos a hipoxia en relación a sus controles a las diferentes temperaturas experimentales se muestran en la Figura 12. Se observó que el contenido de HC tendió a incrementarse en individuos expuestos a hipoxia, sin embargo solo en 17°C las diferencias fueron significativas ( $P < 0.05$ ). Se observó una tendencia a disminuir la concentración de HC en relación con el incremento de la temperatura, teniendo una diferencia significativa entre 17 y 26°C, tanto en hipoxia como controles ( $P < 0.05$ ).

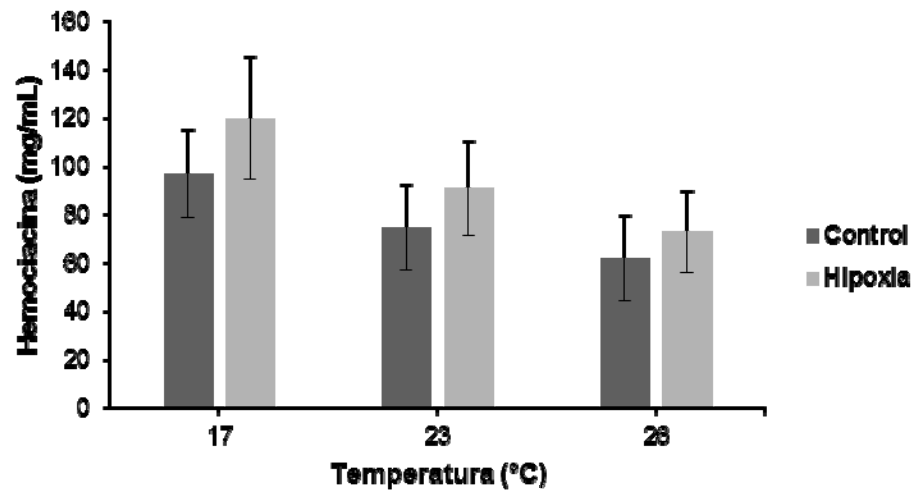


Figura 12. Concentración de hemocianina ( $\bar{x} \pm ds$ ) en hemolinfa de juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) sometidos a hipoxia (1.0 mgO<sub>2</sub>/L) en tres tratamientos térmicos.

### Composición bioquímica

#### *Proteínas totales*

Los resultados de PT en hemolinfa de organismos mantenidos en hipoxia respecto a sus controles en relación a diferentes temperaturas experimentales se presentan en la Figura 13. Se mostró un incremento en los organismos sometidos a hipoxia respecto a los organismos control, con diferencias significativas en las temperaturas de 17 y 26°C ( $P < 0.05$ ). Por otra parte las PT disminuyeron con el incremento de temperatura tanto en el control como en los tratamientos a hipoxia, observándose diferencias significativas entre 17 y 26°C ( $P < 0.05$ ).

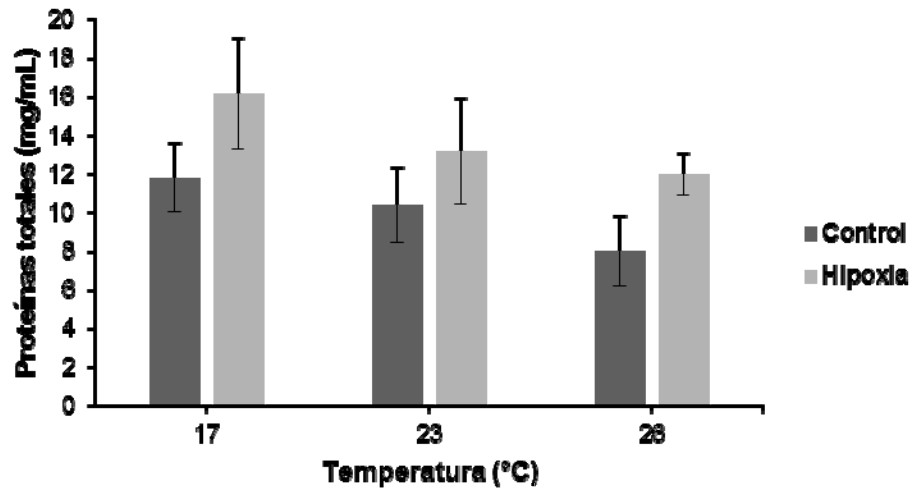


Figura 13. Concentración de proteínas totales ( $\bar{x} \pm ds$ ) en hemolinfa de juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) sometidos a hipoxia (1.0 mgO<sub>2</sub>/L) en tres tratamientos térmicos.

### Glucosa

La Figura 14 muestra el contenido de GLU de organismos mantenidos a hipoxia en relación a sus controles a diferentes temperaturas. Se observó un incremento de la GLU en los organismos mantenidos a hipoxia respecto a los controles con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). En los controles se observó que la GLU tiende a disminuir con el incremento en temperatura, presentándose diferencias significativas a los 17°C en relación a 23 y 26°C ( $P < 0.05$ ). Los organismos mantenidos a hipoxia tendieron a incrementar su GLU en relación a la temperatura, pero solo se presentaron diferencias entre 17 y 23°C.

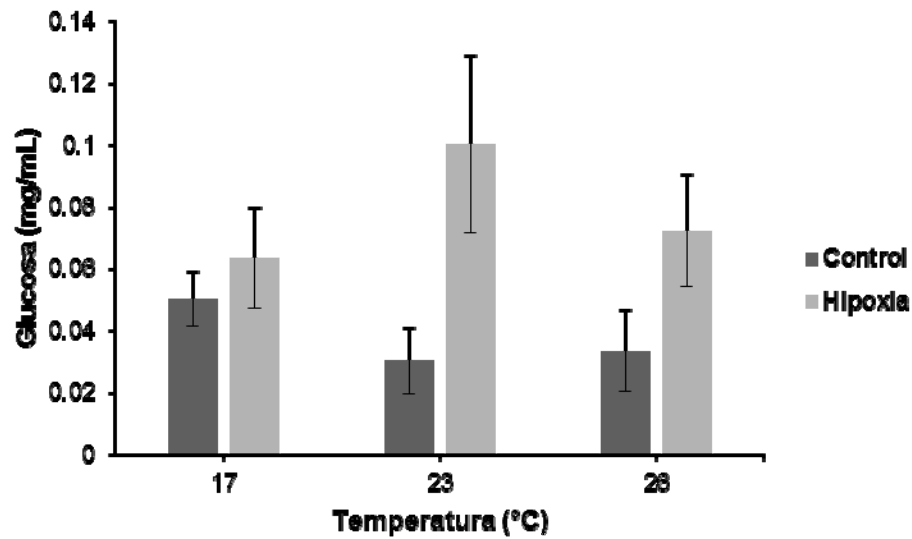


Figura 14. Concentración de glucosa ( $\bar{x} \pm ds$ ) en hemolinfa de juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) sometidos a hipoxia (1.0 mgO<sub>2</sub>/L) en tres tratamientos térmicos.

### *Lactato*

La concentración de LAC en los organismos mantenidos a hipoxia respecto a sus controles a las temperaturas experimentales se muestra en la Figura 15. El LAC tendió a incrementar en los organismos sometidos a hipoxia pero sin diferencias significativas en todas las temperaturas experimentales ( $P > 0.05$ ). No se presentó un patrón del contenido de LAC por efecto de la temperatura, ni en los organismos mantenidos a hipoxia, ni entre los controles y solo se presentaron diferencias entre 17 y 23°C tanto en controles como en hipoxia ( $P < 0.05$ ).



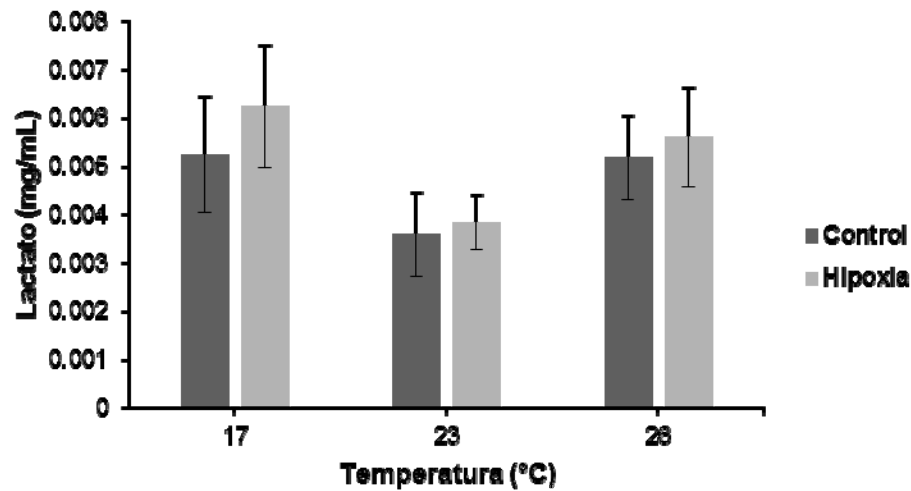


Figura 15. Concentración de lactato ( $\bar{x} \pm ds$ ) en hemolinfa de juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) sometidos a hipoxia ( $1.0 \text{ mgO}_2/\text{L}$ ) en tres tratamientos térmicos.

### Tolerancia a hipoxia en relación a la temperatura

Los resultados de tiempo letal medio (tLM) y de mortalidad total (MT) en organismos expuestos a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto y a diferentes temperaturas se observan en la Tabla III. Estos resultados muestran que la mortalidad a hipoxia se incrementa en relación a la temperatura, ya que la MT se presentó a menores tiempos en temperaturas mayores. Así mismo, el tiempo que se requirió para tener la mitad de organismos muertos (tLM) fue mayor en temperaturas menores. Se observó que a  $17^\circ\text{C}$  en ambas concentraciones de oxígeno, no se observó mortalidad hasta 120 h de observación. Para el caso de los organismos de  $23^\circ\text{C}$  expuestos a  $1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$  se presentó una mortalidad del 90% posterior a las 96 h de exposición.

**Tabla III.-** Tiempo letal medio (tLM) y mortalidad total (MT) de juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) expuestos a dos diferentes concentraciones de oxígeno disuelto.

T°C	1.0 mgO <sub>2</sub> /L		1.5 mgO <sub>2</sub> /L	
	tLM (h)	MT (h)	tLM (h)	MT (h)
17				
23	42	76	37	
26	32	54	33	45

### Capacidad de recuperación ante hipoxia en función de la temperatura

Los resultados de la capacidad de recuperación de juveniles de abulón azul ante hipoxia sostenida se presentan en la Tabla IV. Estos resultados muestran que los organismos tuvieron la capacidad de recuperarse casi al 100% aun cuando fueron mantenidos a una hipoxia extrema (1.0 mgO<sub>2</sub>/L) y sostenida.

**Tabla IV.-** Capacidad de recuperación (%) de juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) después de ser expuestos a hipoxia de 1.0 mgO<sub>2</sub>/L.

T°C	Capacidad de recuperación (%)	
	24 h	48 h
17	100	100
23	90	80
26	90	90

### Superficie de respuesta oxígeno-temperatura

En la Tabla V se presentan los modelos de regresión múltiple no lineal con ajuste de superficie de respuesta obtenidos a partir de los datos de supervivencia de juveniles de abulón azul en relación al efecto de hipoxia y temperatura, a diferentes tiempos de exposición. La representación gráfica de estos modelos se presenta en la Figura 16. Por último la Figura 17 muestra los resultados de las

pruebas de t realizadas a los datos a diferentes tiempos de exposición, para evaluar el efecto sinérgico entre oxígeno y temperatura.

Se puede observar que a las 24 h, el modelo predictivo indica supervivencias mayores de 75% debajo de los 25°C sin tener algún efecto por el OD. Sin embargo, arriba de esta temperatura la supervivencia presenta un decremento y esto se corrobora en el Pareto correspondiente, ya que a este tiempo el oxígeno por sí solo no tiene efecto significativo ( $P < 0.05$ ) sobre la supervivencia, a diferencia de la temperatura ( $P > 0.05$ ), sin embargo se observa un efecto sinérgico  $O_2$ -T°C ( $P > 0.05$ ). A las 36 h se obtuvo un resultado muy similar al anterior, en donde se observan que debajo de 25°C se tienen las mayores supervivencias y por arriba de esta temperatura, la supervivencia disminuye. En el Pareto a 36 h, el resultado presenta que el OD de manera individual no tiene efecto significativo sobre la supervivencia ( $P < 0.05$ ), a diferencia de la temperatura ( $P > 0.05$ ). Para este tiempo de exposición se observa un incremento en el efecto sinérgico  $O_2$ -T°C ( $P > 0.05$ ). A 48 h el modelo indica que el mayor porcentaje de supervivencia (75%) es por debajo de los 20°C y que arriba de esta temperatura el porcentaje de supervivencia se reduce. Lo anterior se debe a que a partir de este tiempo de exposición, se presentan un mayor efecto por la relación  $O_2$ -T°C ( $P > 0.05$ ), más que por el efecto de las variables solas, aunque la temperatura sigue teniendo mayor peso que el oxígeno con diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). A las 72 h y 96 h de exposición la respuesta en el modelo es muy parecida que la observada en 48 h y el resultado de la prueba de t, solo que se observa que el efecto del OD sobre la supervivencia va creciendo mientras que el de la temperatura va disminuyendo, aunque la temperatura sigue teniendo un efecto significativo ( $P > 0.05$ ) mientras que el oxígeno no ( $P < 0.05$ ) (Figura 17).

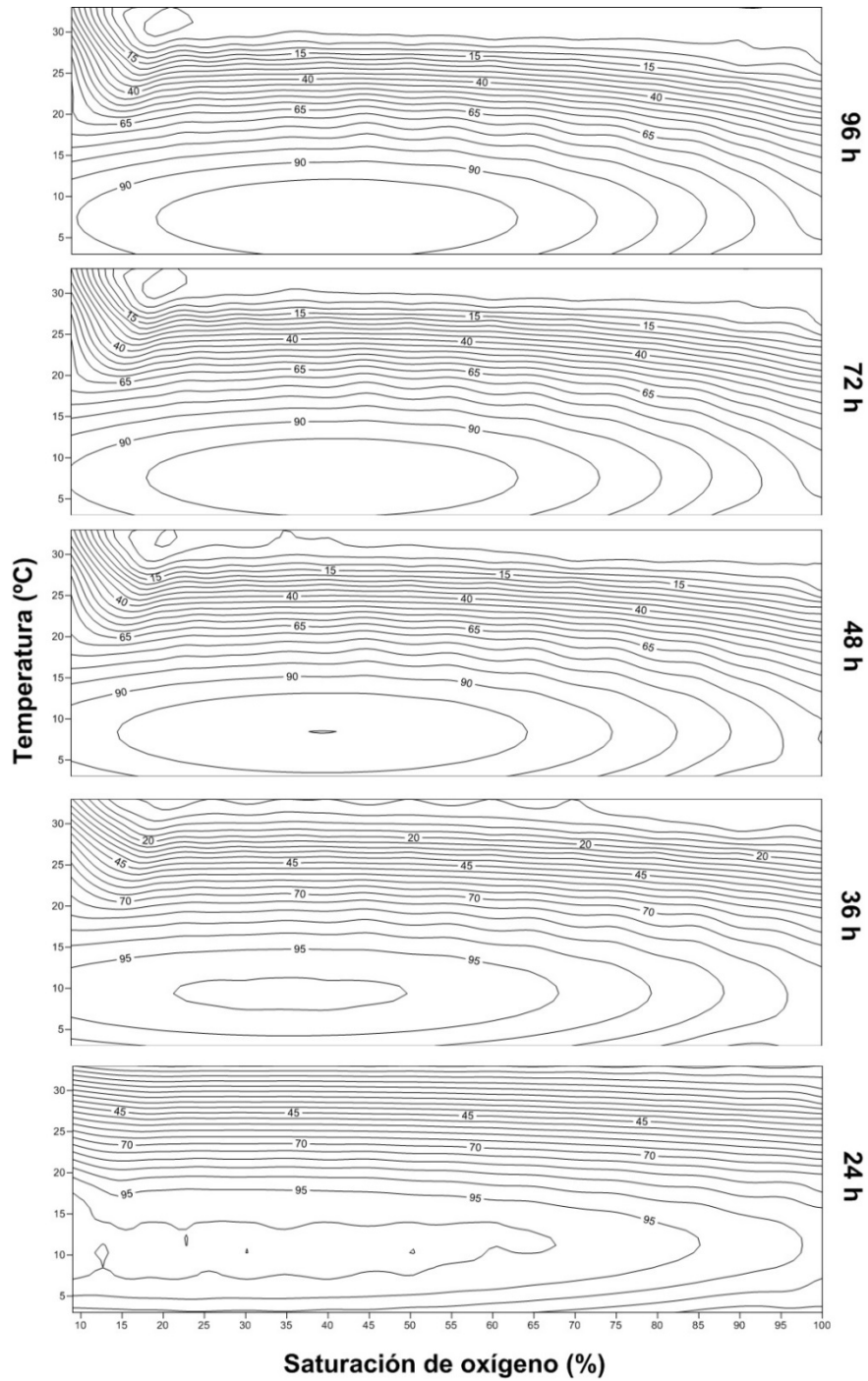


Figura 16. Superficies de respuesta obtenidas a partir de los datos de supervivencia en juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) sometidos a diferentes combinaciones de oxígeno disuelto y temperatura, a diferentes tiempos de exposición.

**Tabla V.-** Ecuaciones de la regresión correspondientes a las superficie de respuesta oxígeno-temperatura de juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) a diferentes tiempos de exposición.

Tiempo de exposición (h)	Ecuación
24	$Y = 72.86 + 0.17(\%O_2) - 0.003(\%O_2)^2 + 5.23(T^{\circ}C) - 0.23(T^{\circ}C)^2 + 0.01(\%O_2 * T^{\circ}C)$
36	$Y = 73.69 + 0.41(\%O_2) - 0.005(\%O_2)^2 + 4.23(T^{\circ}C) - 0.22(T^{\circ}C)^2 + 0.02(\%O_2 * T^{\circ}C)$
48	$Y = 72.67 + 0.64(\%O_2) - 0.008(\%O_2)^2 + 3.54(T^{\circ}C) - 0.21(T^{\circ}C)^2 + 0.03(\%O_2 * T^{\circ}C)$
72	$Y = 72.39 + 0.74(\%O_2) - 0.009(\%O_2)^2 + 3.17(T^{\circ}C) - 0.20(T^{\circ}C)^2 + 0.03(\%O_2 * T^{\circ}C)$
96	$Y = 72.03 + 0.79(\%O_2) - 0.009(\%O_2)^2 + 3.03(T^{\circ}C) - 0.20(T^{\circ}C)^2 + 0.03(\%O_2 * T^{\circ}C)$

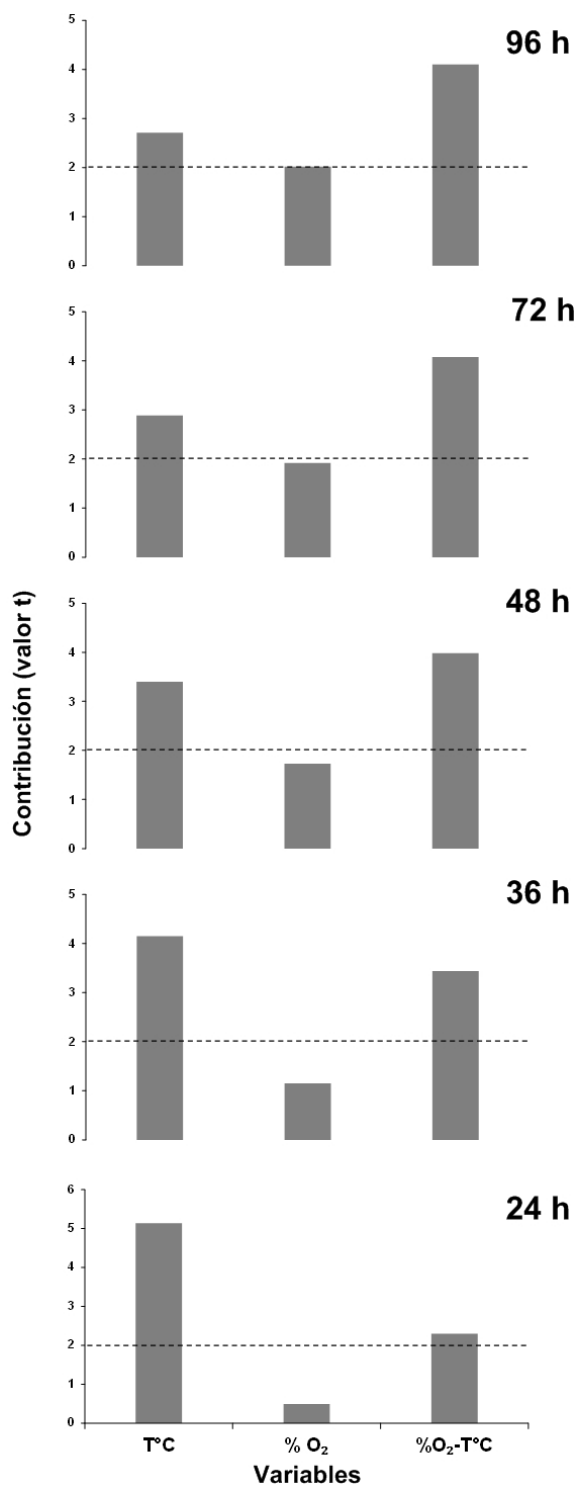


Figura 17. Pruebas de t realizadas a los datos de supervivencia de juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) por efecto de oxígeno disuelto y temperatura a diferentes tiempos de exposición, la línea punteada es el valor de P ( $=0.05$ ), donde por arriba de esta el efecto es significativo, mientras que por debajo, no es significativo.

La Figura 18 muestra la mortalidad global de juveniles de abulón azul (*H. fulgens*) a diferentes concentraciones de OD y temperatura para los distintos tiempos de exposición, el mayor cambio en el porcentaje de mortalidad se observa entre las 24 y 48 h.

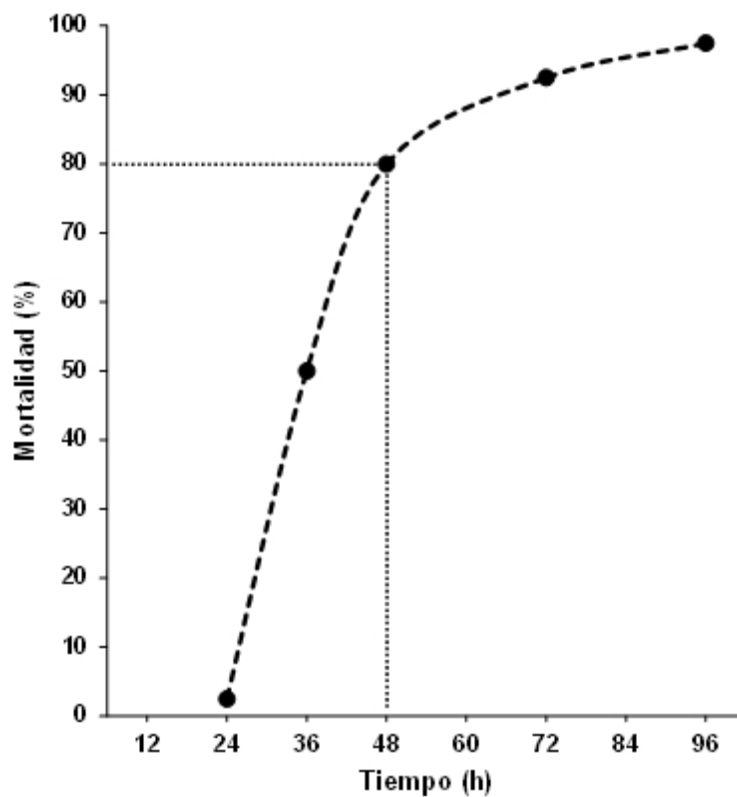


Figura 18. Mortalidad global de los organismos juveniles de abulón (*H. fulgens*) expuestos a diferentes valores de oxígeno disuelto y temperatura en relación al tiempo.

## DISCUSION

En el presente trabajo se estudiaron los efectos combinados de Oxígeno disuelto y temperatura ambiental en el abulón azul (*Haliotis fulgens*), a través de diferentes estrategias. Una de ellas fue encontrar indicadores fisiológicos y bioquímicos que reflejaran el estrés y permitieran cuantificarlo. Por ejemplo, se observó un aumento en la TR conforme se incrementó la temperatura en los organismos mantenidos en condiciones de normoxia. Se sabe que los cambios en la TR de los animales se deben al efecto ocasionado por las variaciones en los factores ambientales (Ocampo *et al.*, 2003). Particularmente en moluscos, la TR tiene una relación directa con el aumento de la temperatura (Bayne, 1976). Autores como Abele *et al.* (2002), Bayne (1976), Peck *et al.* (2009) y Somero (2002), han hecho mención de que un aumento en la actividad, como el que impone la elevación de la temperatura, tiene como respuesta el incremento de la TR como una medida para mitigar la demanda metabólica. Bajo estas circunstancias, los organismos también aumentan su consumo de alimento para conservar el aporte de energía e incrementan el ritmo cardiaco para transportar la cantidad necesaria de oxígeno. Resultados similares a los hallados en el presente estudio fueron encontrados para esta misma especie por Velasco-Echavarría (2014) donde la TR se incrementó alrededor del 100%, en organismos aclimatados de 17°C a 26°C.

Las reducciones en la TR del abulón azul (*Haliotis fulgens*) que se observaron durante los experimentos, presentaron un efecto significativo por la exposición a hipoxia sostenida en las temperaturas experimentales (Figuras 9). Pörtner (2001), menciona que la TR puede modificarse si los organismos se ven expuestos a condiciones limitantes de oxígeno. Harris *et al.* (1999), trabajando con abulones de *Haliotis laevigata* aclimatados a 18°C, encontraron una reducción en la TR de alrededor del 50% en organismos sometidos a condiciones de hipoxia de 5.9 mgO<sub>2</sub>/L y Cheung *et al.* (2008), observaron que el gasterópodo *Nassarius festivus*, redujo su TR hasta en un 61% al estar expuesto a condiciones de hipoxia



sostenida ( $1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ ). En este trabajo, el abulón azul redujo su TR alrededor del 40% en organismos aclimatados a  $17^\circ\text{C}$  y a una concentración de OD de  $1.0 \text{ mgO}_2/\text{L}$  y de hasta 75% para las temperaturas de  $23$  y  $26^\circ\text{C}$ . Sin embargo, los resultados también indican que los abulones expuestos a hipoxia sostenida en las temperaturas de  $17^\circ\text{C}$  con el tiempo incrementaron su TR para mantenerla cercana a los organismos control. Un mecanismo de compensación similar fue reportado por Cheung *et al.* (2008) en su trabajo con el gasterópodo *Nassarius festivus* mantenido a hipoxia sostenida de  $1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$  (Figura 9).

Es importante hacer mención de que, aunque los abulones mostraron un descenso de sus TR en relación a la hipoxia, al comparar las TR de organismos mantenidos en hipoxia a diferentes temperaturas no se presentaron diferencias. En la actualidad existen muchas investigaciones que comparan cambios en la TR respecto a la temperatura en condiciones de normoxia, sin embargo, no hay trabajos que comparen los cambios en la TR en organismos expuestos a hipoxia sostenida en relación a la temperatura. Estos resultados pueden sugerir que en condiciones de hipoxia, el abulón azul cambia de ser un organismo oxí-conformador a ser oxí-regulador. Mark *et al.* (2002), Pörtner (2009) y Pöter y Knust (2007), remarcan que el nivel de sensibilidad y tolerancia a la hipoxia de los animales está en función a los requerimientos celulares de oxígeno y que las condiciones oxí-conformador y oxí-regulador están definidas por el nivel de inactividad de los animales, la cual tiene como línea de partida la tasa metabólica estándar y se inicia cuando se rebasa el punto crítico ( $P_c$ ). Las condiciones de hipoxia donde los animales pasan de ser oxí-conformadores a ser oxí-reguladores, debajo del  $P_c$ , dan inicio a la respiración anaerobia en las células. Mientras que la temperatura ha tenido un efecto negativo en la capacidad oxí-conformadora de los animales, provocando que el  $P_c$  se presente antes en la caída de oxígeno, conforme la temperatura va incrementando (Cerezo-Valverde *et al.*, 2012).

Distintos autores mencionan que los hemocitos representan el mecanismo interno de defensa (sistema inmune) más importante para los invertebrados marinos y

que, los cambios en las concentraciones de estos, pueden servir como indicadores del estado de estrés o de salud de los animales (Fraga *et al.*, 2002; Oubella *et al.*, 1993; Rubio-Gastélum *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2012). En los análisis de la hemolinfa de abulón azul (*H. fulgens*) con el conteo total de células (CC) se observó una disminución significativa en organismos expuesto a hipoxia en las temperaturas de 17 y 26°C, de igual forma comparando entre temperaturas se encontró una tendencia similar con el aumento de la misma, tanto en hipoxia como en los controles (Figura 11). No existen trabajos que evalúen el efecto de la hipoxia sobre el CC en *H. fulgens* ni en otra especie de abulón, sin embargo, Fraga *et al.* (2002), estudiando la langosta espinosa (*Panulirus argus*) encontraron disminuciones del CC y mencionaron que podrían deberse a que los organismos están sometidos a algún tipo de estrés térmico. Wang *et al.* (2012) por su parte, en el mejillón (*Perna viridis*) encontraron una disminución en el CC de organismos expuestos a hipoxia en relación con los controles, coincidiendo con lo hallado en el presente trabajo. La disminución de hemocitos en la hemolinfa se deben a la alta movilización de éstos entre el torrente sanguíneo y los tejidos, para combatir el estrés oxidativo causado por la hipoxia (Oubella *et al.*, 1993; Rubio-Gastélum *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2012).

En el presente estudio se observó que los abulones incrementaron la concentración de HC en organismos expuestos a hipoxia, mientras la disminuyeron cuando se incrementó la temperatura (Figura 16). Se ha descrito que en condiciones de hipoxia los animales favorecen la síntesis de los pigmentos respiratorios, en moluscos este pigmento es la hemocianina (HC), que representa la mayor parte de las proteínas en la hemolinfa (Astete-Espinosa *et al.*, 2010; Modig y Ólafsson, 1998; Wu, 2002). Trabajando en otras especies de abulón como *H. midae* (Vosloo *et al.*, 2013a y b) y *H. iris* (Wells *et al.*, 1998; Behrens *et al.*, 2002) bajo condiciones de hipoxia, se reportaron aumentos en la concentración de HC similares a las del presente trabajo. En moluscos la HC además de transportar el oxígeno del exterior hasta las células y la regulación ácido-base en la hemolinfa

(Mangum, 1992), también almacena oxígeno necesario para soportar la respiración aerobia durante periodos de hipoxia (Ragg y Taylor, 2006). Sin embargo, la cantidad de oxígeno acarreado por la HC, depende en su totalidad del pH de la hemolinfa. Si el pH de la hemolinfa disminuye, la afinidad del oxígeno a la HC es mayor, provocado por el efecto Bohr inverso, que ocurre principalmente en moluscos, causado por el aumento de la presión parcial del CO<sub>2</sub>. Debido a que el CO<sub>2</sub> tiene mayor afinidad a la HC que el oxígeno, provoca que esta se sature más rápido, por lo que los moluscos aumentan la producción de HC en condiciones de hipoxia para poder acarrear la cantidad de oxígeno necesaria (Baldwin *et al.*, 2007; Mangum, 1992), fenómeno que se vio reflejado en el presente estudio.

Con respecto a las variaciones en los metabolitos en la hemolinfa, proteínas totales (PT), glucosa (GLU) y lactato (LAC), son una respuesta común al estrés que presentan los animales. Las PT se incrementaron en el presente estudio en los organismos sometidos a hipoxia con diferencias significativas a 17 y 26°C. Se ha observado que en la hemolinfa de *Neotrypaena uncinata* (Astete-Espinoza *et al.*, 2010) y en tejidos de *Haliotis midae* (Vosloo *et al.*, 2013a), se reportaron resultados similares. Otros autores mencionan que los animales cuando se encuentran sometidos bajo algún tipo de estrés (térmico, densidad poblacional y/o manejo) tienden a incrementar sus concentraciones de PT en la hemocianina como en el camarón *Litopenaeus vannamei* (Rubio-Gastelum *et al.*, 2014). Las proteínas son usadas como componentes estructurales de los tejidos y como enzimas, también sirven como fuente de energía al ser degradadas a aminoácidos, he incluso pueden ser convertidas en carbohidratos para obtención de glucosa (Terwilliger, 1998). Autores como Vosloo *et al.* (2013a) mencionan en Haliotidos que bajo condiciones extremas de hipoxia (por debajo de 60% de saturación de OD), disminuyen las tasas de consumo de oxígeno las cuales tienen una correlación con cambios hepatológicos, como por ejemplo necrosis en las células estructurales de las branquias, los cuales tienen como resultado una disminución en la difusión del oxígeno en las branquias. Por tanto el incremento de

las PT en el presente trabajo podría estar más relacionado a la reparación el daño provocado por estrés hipóxico.

Se observó un incremento de GC en los organismos de abulón azul tratados en el presente estudio. La glucosa es el monosacárido más común que se ha detectado en la sangre y en los tejidos de muchos moluscos, siendo la principal fuente de obtención de energía en la respiración celular (Wilbur, 1983). Observaciones similares a las obtenidas fueron reportadas por Cheng *et al.* (2004), en *Haliotis diversicolor*. Sin embargo, Vosloo *et al.* (2013b) para *Haliotis midae* bajo condiciones de hipoxia, observaron una disminución en la concentración de la GLU. Estos mismos autores mencionan que esto puede deberse a que las condiciones de hipoxia manejadas en su trabajo (80% saturación de OD) no fueron suficientes para provocar un estrés, aunque en este mismo trabajo se observaron disminuciones de GLU a 19°C comparados con aclimatados a 14°C, tanto en hipoxia y normoxia. Como se sabe el metabolismo aeróbico es más eficiente que el metabolismo anaeróbico, la clave en la supervivencia y evolución de los animales, va de la mano de los mecanismos compensatorios implementados por los mismos, que les permitan sobrevivir cuando se presentan condiciones extremas (Astete-Espinoza, 2010; Bayne, 1976). Los niveles de hipoxia manejados en este estudio provocaron un incremento de GLU, esto puede deberse a una medida de subsanar el estrés y por lo tanto, mayor costo energético por parte de *H. fulgens* y por ende el incremento de GLU en la hemolinfa para ser transportada hasta las células donde es requerida para la obtención de energía (Astete-Espinoza *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2004; Ocampo *et al.*, 2003; Wilbur, 1983).

En este estudio se presentó un incremento de LAC en hemolinfa por efecto de la hipoxia, aunque no fue significativo. Los cambios en el contenido de LAC han sido estudiados en diferentes haliotidos como *Haliotis diversicolor*, *Haliotis iris*, *Haliotis lamellosa* y *Haliotis asinina*, encontrándose incrementos en la concentración de LAC en diferentes tejidos, similares a los hallados en esta investigación (Cheng *et*

*al.*, 2004; Behrens *et al.*, 2002; Gäde 1988; Baldwin *et al.*, 2007). El LAC es el principal producto final de la hipoxia en animales, el cual podría tender a disminuir luego de un periodo prolongado en hipoxia (Gäde, 1988). Los organismos que están expuestos a condiciones ambientales de hipoxia, utilizan vías metabólicas anaeróbicas para la obtención de energía, de este modo el lactato es usado como sustrato gluconeogénico, obteniéndose un aumento en las concentraciones de glucosa en la hemolinfa (Harcet *et al.*, 2013). Lo anterior respalda los resultados obtenidos para *H. fulgens* expuestos a hipoxia ya que las concentraciones de LAC no fueron diferentes de las obtenidas en los controles. Por otro lado autores como Harcet *et al.* (2013) mencionan que los invertebrados pueden hacer uso de rutas metabólicas anaeróbicas alternas, el caso de los moluscos la más común es la ruta de las opinas, las cuales son de baja eficiencia pero tienen una alta tasa producción de energía, evitando así, hacer uso del LAC, en el caso de los moluscos gasterópodos, sobre todo en abulones, ha sido el uso de la taurina, la cual tiene como producto final la tauroquina. Incrementos de la tauroquina han sido reportadas en especies sometidas a hipoxia como *Haliotis lamellosa* (Gäde, 1988) y *Haliotis iris* (Behrens *et al.*, 2002) en tejidos para ambas especies y hemolinfa en *H. iris*; bajo condiciones de movimiento prolongado en *Haliotis asinina* (Baldwin *et al.*, 2007) y por efecto de las olas en *Haliotis iris* (Wells *et al.*, 1998).

Las mortalidades masivas de organismos marinos se han presentado con más frecuencia a lo largo de los últimos años en muchos países del mundo, dejando grandes impactos económicos en las zonas afectadas. Si bien las causas pueden ser diversas y de carácter local o regional, claramente se trata de variaciones ambientales repentinas y sus consecuencias son de carácter ecosistémico (Cheung *et al.*, 2008; Díaz, 2001; Siikavuopio *et al.*, 2007; Vaquer-Sunyer y Duarte, 2008; Vaquer-Sunyer y Duarte, 2011; Micheli *et al.*, 2012; Veas *et al.*, 2012).

Se han observado mortalidades en organismos sometidos a hipoxia, como en *Haliotis diversicolor* (Cheng *et al.*, 2004) donde se experimentó con organismos

aclimatados a 25°C y expuestos a tres diferentes concentraciones de OD. La especie fue catalogada por el autor como sensible a la hipoxia ya que encontró supervivencia del 100% en organismos a 4.98 mgO<sub>2</sub>/L después de 96 h de exposición, mientras que exposiciones de 3.08 y 2.11 mgO<sub>2</sub>/L, presentaron la mortalidad total (MT) a las 72 y 48 h respectivamente. En contraste, para *Nassarius festivus* (Cheung *et al.* 2008) se encontraron supervivencia del 100% a 6.0 mgO<sub>2</sub>/L y mortalidades acumuladas en 3.0 y 1.5 mgO<sub>2</sub>/L de 7 y 15% respectivamente, después de 6 semanas de exposición. En el presente trabajo, la mortalidad total para organismos aclimatados a 23°C y expuestos a 1.0 mgO<sub>2</sub>/L se dio a las 76 horas, mientras a 26°C al mismo nivel de hipoxia fue de 54 h. En este sentido, se puede proponer que el abulón azul es una especie medianamente sensible a hipoxia, donde el nivel de sensibilidad está fuertemente influenciado por la temperatura de aclimatación.

Por otro lado, el abulón azul se puede catalogar como de gran capacidad de recuperación ante hipoxia, dado que se observaron recuperaciones de más de 80% después de un tratamiento en condiciones de hipoxia sostenida de 1.0 mgO<sub>2</sub>/L (Tabla III). Para *Haliotis lamellosa* (Gäde, 1988) se observó una recuperación del 100% en organismos sometidos a condiciones de anoxia completa por un periodo de 6 h y después regresados a normoxia. Desafortunadamente no existe en la literatura una estándar para documentar y poder comparar la capacidad de recuperación, dado que es un dato que puede tomar mucha importancia cuando se encaran eventos de mortandad masiva en el medio natural.

Es importante conocer el efecto que pueden tener los cambios ambientales sobre los animales marinos, en especial con organismos bentónicos, que en su mayoría son incapaces de desplazarse a gran velocidad, ni de moverse grandes distancias para evitar condiciones ambientales adversas y repentinas (Vosloo *et al.*, 2012a y b). Existe cierta literatura sobre los efectos de alguna variable, pero son muy

pocos los trabajos que se han enfocado a estudiar los efectos sinérgicos de las variables ambientales (Pörtner y Langenbuch, 2005).

En el presente trabajo se abordó justo este propósito, con el apoyo de modelos de superficie de respuesta. En general se pudo observar que la temperatura tiene una mayor influencia en la supervivencia de *H. fulgens* que el oxígeno, pero se generó evidencia de que el efecto combinado oxígeno-temperatura tiene una mayor influencia en la supervivencia que cualquiera de las variables de forma independiente.

La importancia de contar con modelos como el de la superficie de respuesta para un recurso de la naturaleza del abulón, puede transitar por las prácticas de cultivo, donde el modelo delimita claramente los niveles combinados de temperatura y oxígeno adecuados y peligrosos. Sin embargo, también puede tener utilidad en el manejo de los bancos naturales, siempre y cuando se acompañara de un sistema de observación continua de temperatura y oxígeno. Durante eventos de hipoxia y altas temperaturas, el abulón se desprende y queda expuesto incluso antes de morir, y es rápidamente consumido por depredadores. Dado su alto valor comercial y su demostrada capacidad de recuperación, es viable proponer que si se detectaran condiciones especialmente adversas de la combinación temperatura-hipoxia, se pudieran realizar buceos para recuperar a los organismos desprendidos, recuperarlos en cámaras con aireación y regresarlos al medio. De nuevo, la viabilidad de esta práctica depende de contar con información in situ en tiempo real y acompañarla de las superficies generadas en el presente estudio.

## CONCLUSIONES

- Los juveniles de *Haliotis fulgens*, demostraron capacidad para reducir su tasa respiratoria, como un mecanismo compensatorio ante una exposición de hipoxia sostenida, demostrando que es un organismo capaz de cambiar su condición de oxí-conformador a oxí-regulador, al mantener constante la tasa respiratoria a lo largo del tiempo de exposición a hipoxia.
- Se observó una influencia de la hipoxia sobre el conteo de células (hemocitos) en la hemolinfa, indicando el posible uso de los mismos para reparar el daño celular, causado por el estrés.
- Los análisis bioquímicos realizados en la hemolinfa, arrojaron un incremento en las concentraciones de hemocianina, proteínas totales y glucosa, en organismos sometidos a hipoxia, demostrando que estos metabolitos son los mejores indicadores del estrés provocado por la hipoxia.
- Se encontró en organismos controles y sometidos a hipoxia, una reducción en las concentraciones de hemocianina, proteínas totales y glucosa, en relación al aumento de la temperatura, siendo indicativos de la respuesta al estrés térmico.
- No se observó influencia de la hipoxia sobre las concentraciones de lactato, sugiriendo el posible uso de una ruta metabólica alterna.
- Se demostró un efecto sinérgico oxígeno-temperatura, sobre la supervivencia de juveniles de *Haliotis fulgens*, representado en una reducción en la termotolerancia, así como una zona de resistencia oxígeno-



temperatura menor a las 48 h de exposición, afectando principalmente a organismos en temperaturas mayores a los 20°C.

- Se observó una capacidad de recuperación de más del 80% en organismos después de ser sometidos a hipoxia sostenida por periodos menores de 40 h.
- La supervivencia de juveniles de *Haliotis fulgens*, ante condiciones de hipoxia, está influenciada por el incremento de la temperatura y el tiempo de exposición.
- La mejor forma de representar y explicar los efectos sinérgicos de la cantidad de oxígeno disuelto y la temperatura, sobre las mortalidades en las poblaciones de abulón azul (*Haliotis fulgens*), ante los presentes cambios en el ambiente, es por medio del uso de las superficies de respuesta.

## RECOMENDACIONES

- Estandarizar el método para medir concentraciones de tauropina en abulón azul *Haliotis fulgens*.
- En relación al punto anterior y a que no se obtuvieron cambios en las concentraciones de lactato en organismos sometidos a hipoxia, se recomendaría realizar análisis de la concentración de tauropina, para corroborar que *H. fulgens*, hace uso de esta ruta metabólica alterna.
- Realizar análisis en los cambios del pH de la hemolinfa, en organismos sometidos a hipoxia, para observar los cambios que se puedan presentar.
- Realizar experimentos similares al presente, en otras especies de abulón e inclusive con otras especies de animales bentónicos, para ampliar el conocimiento y el marco ecológico de los efectos de estos fenómenos sobre los ecosistemas marinos.
- Es necesario lograr acuerdo interinstitucionales y con los campos pesqueros de abulón, para mantener una red de monitoreo de cambios en la temperatura del mar así como en la concentración de oxígeno disuelto.
- Con la información generada con el monitoreo de los cambios en las variables ambientales, el uso y la aplicación de las superficies de respuesta, se podrían realizar predicciones ante los posibles efectos que se podrían presentar ante los constantes cambios en el ambiente.

## LITERATURA CITADA

Abele, D., Heise, K., Pörtner, H.O., Puntarulo, S.. 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *The Journal of Experimental Biology*. 205, 1831-1841.

Astete-Espinoza, L., Garrido, C.F., Cáceres, C.W. 2010. Respuestas fisiológicas de *Neotrypaea uncinata* (Decapoda: Thalassinidea) a la hipoxia y al parasitismo por *Ionella agassizi* (Isopoda: Epicaridea). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 45(3), 423-431.

Armitage, K.B., Wall, T.J. 1982. The effect of body size, starvation and temperature acclimatation on oxygen consumption of the crayfish *Orconectes nais*. *Comp. Biochem. Physiol.* 73A(1), 63-68.

Balwdin, J., Elias, J.P., Wells, R.M.G., Donovan, D.A. 2007. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: Comparisons with temperate abalone species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 342, 213-225.

Bayne, B.L. 1976. *Marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge University Press. Inglaterra. 506p.

Behrens, J.W., Elias, J.P., Taylor, H.H., Weber, R.E. The archaeogastropod mollusc *Haliotis iris*: tissue and blood metabolites and allosteric regulation of haemocyanin function. *The Journal of Experimental Biology*. 205, 253-263.

Bernabé, G. 1991. *Acuicultura*. Vol. 1. Ediciones Omega. España. 478 pp.

Bradley, N. 2007. *The response surface methodology*. Master Thesis, Indiana University South Bend.

Carreón-Palau, L., Guzmán-del Próo, S.A., Belmar-Pérez, J., Carrillo-Laguna, J., Herrera-Fragoso, R. 2003. Microhábitat y biota asociada a juveniles de abulón *Haliotis fulgens* y *H. currugata* en Bahía Tortugas, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas*. 29, 325-341.

Casas-Valdez M., Ponce-Díaz, G. 1996. Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Secretaria de Medio Ambiente Recursos Naturales Y Pesca. México. Volumen II.

Celis-Ceseña, R. 1992. Abalone culture in México. *World Aquaculture*. 56-60.

Cerezo-Valverde, J., Aguado-Giménez, F., Dolores-Hernández, M., García-García, B. 2012. Oxygen consumption response to gradual hypoxia in spider crab, *Maja brachydactyla*: critical and lethal oxygen saturations and recovery ability. *Journal of the World Aquaculture Society*. 43(3), 433-431.

Cheng, W., Chun-Hung, L., Sha-Yen, C., Jiann-Chu, C. 2004. Effect of dissolved oxygen on the acid-base balance and ion concentration of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Aquaculture*. 231. 573-586.

Cheung, S.G., Chan, H.Y., Liu, C.C., Shin, P.K.S. 2008. Effect of prolonged hypoxia and food consumption, respiration, growth and reproduction in marine scavenging gastropod *Nassarius festivus*. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 280-286.

CONAPESCA. 2011. Anuario estadístico pesquero. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. México.

CONAPESCA. 2013. Anuario estadístico pesquero. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. México.

Cox, K. W. 1962. California Abalones, Family Haliotidae. *Fish Bulletin* No. 18. 131 pp.

Díaz, F., Re, A.D., Medina, Z., Re G., Valdez, G., Valenzuela, F. 2006. Thermal preference and tolerance of green abalone *Haliotis fulgens* (Philippi, 1845) and pink abalone *Haliotis corrugata* (Gray, 1828). *Aquaculture Research*. 37, 877-884.

Fraga, I., Galindo, J., de Arazoza, M., Blanco, W., Díaz-Iglesias, E., Báez, M., Bravet, E. 2002. Efecto de las diferentes relaciones proteína/energía en el

crecimiento de juveniles de langosta espinosa (*Panulirus argus*). I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. 74-83.

Fry, F.E.J., 1947. The aquatic respiration of fish. In: M.E.Brown (Editor) The physiology of fishes, 1, Academic Press New York and London, 1-63

Fujimoto, E.K., Goeke, N.M. Olson, B.J., Klend, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150:76-85.

Gäde, G. 1986. Purification and properties of tauroxine dehydrogenase from the shell adductor muscle of the ormer, *Haliotis lamellosa*. *Eur. J. Biochem.* 160, 311-318.

García-Esquivel, Z., Montes-Magallon, S., González-Gómez, A. 2007. Effect of temperature and photoperiod on the growth, feed consumption, and biochemical content of juveniles green abalone, *Haliotis fulgens*, fed on a balanced diet. *Aquaculture*. 262, 129-141.

González-Avilés, J.G., Shepherd, S.A. 1996. Growth and survival of the blue abalone *Haliotis fulgens* in barrels at Cedros Island, Baja California Sur, with a review of abalone barrel culture. *Aquaculture*. 140, 169-176.

Guzmán del Prío, S.,A., Carreón-Palau, L., Belmar-Pérez, J., Carrillo-Laguna, J., Herrera-Fragoso R. 2003. Effects of the “El Niño” event on the recruitment of benthic invertebrates in Bahía Tortugas, Baja California Sur. *Geofísica Internacional*. 42(3), 429-438.

Green, R.H., Singh, S.M., Hicks, B., McCuaig, J.M, 1983. An Arctic intertidal population of *Macoma balthica*. (Mollusca, Pelecypoda): Genotypic and phenotypic components of population structure. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40(9), 1360-1371.

Harcet, M., Perina, D., Pleše, B. 2013. Opine dehydrogenases in marine invertebrates. *Biochem. Genet.* 51, 666-676.

- Harris, J.O., Maguire, G.B., Edwards, J.S., Johns D.R. 1999. Low dissolved oxygen reduces growth rate and oxygen consumption rate of juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevis* Donovan. *Aquaculture*. 174, 265-278.
- Hernández-Miranda, E., Veas, R., Labra, F.A., Salamanca, M. & Quiñones, R.A. 2012. Responce of the epibenthic macrofaunal community to a strong upwelling-driven hypoxic event in a shallow bay the southern Humboldt Current System. *Mar. Environ. Res.* 79, 16-28.
- Hickey, D.A., Singer, G. A.C. 2004. Genomic and proteomic adaptations to growth at high temperature. *Genome Biology*. 5(10), Article 117.
- Leighton, D.I., Byhower, M. J. Kelly, J. C., Hooker, C. N., Morse, D. E. 1981. Acceleration of development and growth in young green abalone (*Haliotis fulgens*) using warmed effluent seawater. *J World Maricul Soc.* 12(1): 170–180.
- León-Carballo, G., Muciño-Díaz, M. 1996. Pesquería de abulón. Eds. Casas Valdez, M., Ponce Díaz, G. Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur. México. I, 15-41.
- Lluch-Belda, D., Lluch-Cota, D.B., Lluch-Cota, S.E., Hernández-Vázquez, S. 1996. Análisis de la pesquería de abulón de la Península de Baja California Sur. *Informe Técnico. SEMARNAP-INP.* 31pp.
- Lluch-Cota, D.B., Hernández-Vázquez, S. 2006. Desarrollo sustentable de la pesca en México: Orientaciones estratégicas. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste/ Senado de la Republica. México. 436pp.
- Mangun, Ch.P. 1992. Respiratory function of the molluscan hemocyanins. Chapter 11. *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, Vol. 13. Blood and tissue oxygen carriers. Softcover reprint of the original 1<sup>st</sup> ed. 1992, 459 pp, 302-323.

- Mark, F.C., Bock, C., Pörtner, H.O.. 2002. Oxygen-limited thermal tolerance in Antarctic fish investigated by MRI and <sup>31</sup>P-MRS. *Am. J. Physiol. Regul. Integ. Comp. Physiol.* 283, 1254-1262.
- Mazón-Suastegui, J.M., Muciño-Díaz M., Bazúa-Sicre, L.A. 1996. Cultivo de abulón *Haliotis* spp. Eds. Casas Valdez, M., Ponce Díaz, G. Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur. México. II, 475-511.
- McBride, S., Rotem, E., Ben-Ezra, D., Shpigel, M. 2001. Seasonal energetics of *Haliotis fulgens* (philippi) and *Haliotis tuberculata* (L.). *J Shellfish Res.* 20(2): 659-665.
- Micheli, F., Saenz-Arroyo, A., Greenley, A., Vazquez, L., Espinoza, J.,A., Rossetto, M., De Leo, G.A. 2012. Evidence That Marine Reserves Enhance Resilience to Climatic Impacts. *PLoS ONE* 7(7): e40832. doi:10.1371/journal.pone.0040832
- Morales-Bojórquez, E., Muciño-Díaz, M.O., Vélez-Barajas, J.A. 2008. Analysis of the Decline of the Abalone Fishery (*Haliotis fulgens* and *H. corrugata*) along the Westcentral Coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Journal of Shellfish Research.* 27, 865-870.
- Modig, H, Ólafson, E.. 1998. Responses of Baltic benthic invertebrates to hypoxic events. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 229, 133-148.
- Ocampo L., Patiño, D., Ramírez, C. 2003. Effect of temperature on hemolymph lactate and glucose concentrations in spiny lobster *Panulirus interruptus* during hypoxia. *Journal of Experimental Biology and Ecology.* 296, 71-77.
- Oubella, R., Maes, P., Paillard, C., Auffert, M. 1993. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms.* 15, 193-197.
- Peck, LI. S., Clark, M.S., Morley, S.A., Massey, A., Rossetti, H. 2009. Animal temperature limits and ecological relevance: effects of size, and activity and rates of change. *Functional Ecology.* 23, 248-256.

Peter, J.E. 2003. Ecophysiology of the blacklip abalone *Haliotis rubra* leach: Metabolic aspects of muscle function and blood oxygen delivery in a commercially important species. Tesis de doctorado. Australia. 230 pp.

Ponce-Díaz, G., Lluch-Cota, S.E., Bautista-Romero, J.J., Lluch-Belda, D. 2003. Caracterización multiescala de la temperatura del mar en zonas de bancos de abulón (*Haliotis* spp) en Bahía Asunción, Baja California Sur, México. Ciencias Marinas. 29, 291-303.

Pörtner, H.O. 2001. Climate change and the temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. Naturwissenschaften. 88, 137-146.

Pörtner, H.O. 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. Comparative Biochemistry and Physiology Part. A. 132, 739-761.

Pörtner, H.O., Langenbuch, M. 2005. Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO<sub>2</sub> on marine animals: From Earth history to global change. Journal of Geophysical Research. 110, C09S10, doi:10.1029/2004JC002561.

Pörtner, H.O., Knust, R. 2007. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. SCIENCE. 315, 95-97.

Quinn, J.M., Steele, G.L., Hickey, C.W., Vickers, M.L. 1994. Upper thermal tolerances of twelve New Zealand stream invertebrate species. J. Mar. Freshwat. Res. 28(4), 391-397.

Racotta, I. S., Palacios, E. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. J. World Aquac. Soc., 29:351-356.



Ragg, N.L.C., Taylor, H.H.. 2006. Oxygen uptake, diffusion limitation, and diffusing capacity of the bipectinate gills of the abalone, *Haliotis iris* (Mollusca: Prosobranchia). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 143, 299-306.

Rodríguez-Valencia, J.A., Caballero-Alegría, F., Castro-González, J. 2004. Tendencias temporales (1989-1999) en las poblaciones de *Haliotis fulgens* y *H. corrugata* (Gastropoda:Haliotidae) de Isla Cedros, Baja California, México. *Ciencias Marinas*. 30, 489-501.

Rubio-Gastélum, D., Valenzuela-Quiñónez, W., Parra-Bracamonte, G.M., Santamaria-Miranda, A. 2014. Respuestas de metabolitos en hemolinfa y desempeño productivo del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* cultivado a altas densidades en laboratorio. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 49(3), 601-606.

Searcy-Bernal, R., Anguiano-Beltrán, C., Espinoza-Montes, J.A., Carpizo-Ituarte, E. 2013. Restocking in abalone population (*Haliotis* spp) in Mexico. *Journal of Shellfish Research*. 32(1), 189-195.

Somero G.N. 2002. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integr. Comp. Biol.* 42(4), 780-789.

Siikavuopio, S. T., Dale, T., Mortensen, A., Foss, A. 2007. Effect of hypoxia on feed intake and gonad growth in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*. 266, 112-116.

Terwilliger, N.B. 1998. Functional adaptations of oxygen-transport proteins. *The Journal of Experimental Biology*. 201, 1085-1098.

Vaquer-Sunyer, R., Duarte, C.M. 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *PNAS*. 105(40), 15452-15457.

- Vaquer-Sunyer, R., Duarte, C.M. 2011. Temperature effects on oxygen thresholds for hypoxia in marina benthic organisms. *Global Change Biology*. 17, 1788-1797.
- Veas, R., Hernández-Miranda, E., Quiñones, R.A., Carrasco, F.D. 2012. Spatio-temporal biodiversity of soft bottom macrofaunal assemblages in shallow coastal waters exposed to episodic hypoxic events. *Mar. Environ. Res.* 78, 1-14.
- Velasco-Echavarría, H. 2014. Marco ambiental y capacidad de recuperación ante estrés térmico del abulón azul (*Haliotis fulgens*, Philippi 1845) provenientes de la zona de Bahía Tortugas, B.C.S. Tesis de Maestría. CIBNOR. 56 pp.
- Villarreal, C.H. 1989. Prawn culture in México. *Austasia Aquaculture Magazine*, 3:17-18.
- Vosloo, A., Laas, A., Vosloo, D. 2013(a). Differential responses of juvenile and adult South African abalone (*Haliotis midae* Linnaeus) to low and high oxygen levels. *Comp. Biochem. Phys. Part. A*, 164, 192-199.
- Vosloo, D., van Rensburg, L., Vosloo, A. 2013(b). Oxidative stress in abalone: The role of temperature, oxygen and L-proline supplementation. *Aquaculture*. 416-417, 265-271.
- Wang, Y., Hu, M., Cheung, S.G., Shin, P.K.S, Lu, W., Li, J. 2012. Immune parameter changes of hemocytes in green-lipped mussel *Perna viridis* exposure to hypoxia and hyposalinity. *Aquaculture*. 356-357, 22-29.
- Wells, R.M.G., McShane, P.E., Ling, N., Wong, R.J., Lee, T.O.C., Baldwin, J. 1998. Effect of wave action on muscle composition, metabolites and growth indices in the New Zealand abalone, Paua (*Haliotis iris*), with implications for harvesting and aquaculture. *Comp. Biochem. Physiol.* 119(1), 129-136.
- Wilbur, K.M., Yonge, C.M. 1998. *Physiology of Mollusca*. Volume II. Academic Press Inc. 645 pp.

Wu, R.S.S. 2002. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin*. 45, 35-45.