

Sistema de temperatura, oxígeno y salinidad para la experimentación en ecofisiología

System for temperature, oxygen and salinity research in ecophysiology

L. Fernando Bückle R.¹, Benjamín Barón S.¹,
Mónica Hernández R.¹, Armando Ledo M.¹, Ricardo Solís A.²,
Benjamín Pérez E.² y Albino Hernández S.³

¹Departamento de Acuicultura, Laboratorio de Instrumentación Electrónica ²Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (C.I.C.E.S.E.), Km 107 Carretera Tijuana – Ensenada. Apdo. Postal 2732, Baja California 22800, México.

³Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, México

Bückle R., L. F., B. Barón S., M. Hernández R., A. Ledo M., R. Solís A., B. Pérez E. y A. Hernández S. 2003. Sistema de temperatura, oxígeno y salinidad para la experimentación en ecofisiología. *Hidrobiológica* 13(4): 277-287.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue construir una infraestructura en la cual se pudiera generar un gradiente de temperatura, salinidad y de oxígeno disuelto en el agua. El diseño del sistema permite controlar estos parámetros y con la combinación de ellos se pueden realizar muchos experimentos en el campo de la ecofisiología. El estanque horizontal que se utilizó para hacer los experimentos fue construido de lamina de acrílico transparente con paredes de 1.1 cm de espesor, 365 cm de largo, 31 cm de ancho, 26 cm de alto que alberga un volumen de 220 L de agua. Con otros agregados al sistema y el estanque se pueden extraer los gases disueltos en el agua o desplazarlos con nitrógeno. La temperatura del agua se puede conservar constante en ± 0.1 °C con un control electrónico o generar un gradiente de temperatura adicionando un enfriador de agua al sistema. La salinidad y el oxígeno se pueden mantener de manera uniforme o formar un gradiente. Otra unidad de control electrónico adicional permite simular diferentes ciclos diarios de luz/oscuridad para configurar ritmos circadianos que junto al sistema de control de temperatura y de control electrónico del degasificador fueron desarrollados y construidos en la Institución.

Palabras clave: Sistema, temperatura, oxígeno, salinidad, ecofisiología.

ABSTRACT

The objective of this work was to build an infrastructure in which one could generate a gradient of temperature, salinity and dissolved oxygen in the water. With the control of these parameters and the combination of them is possible to carried out many experiments in the field of the ecophysiology. The tank was constructed with sheets of clear acrylic with walls 1.1 cm thick, 365 cm length, 31 cm wide, 26 cm high that harbors a volume of 220 L of water. With other systems added to the tank, the dissolved gases in the water can be extracted by mean of degasification or displace with nitrogen. With an electronic control, the temperature can be constant in ± 0.1 °C or generate a temperature gradient adding chiller to the system. Salinity and dissolved oxygen can be maintained constant or generate a gradient. Another additional electronic control unit allows simulating different daily cycles of light/darkness to imitate circadian rhythms. This light/darkness system and those to control the temperature and the degasification unit were developed and build in the Institution.

Key words: System, temperature, oxygen, salinity, ecophysiology.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas donde se pueden generar gradientes térmicos se han utilizado en diversas investigaciones para trabajar con organismos marinos y dulceacuícolas con el fin de conocer la temperatura preferida y las que evitan activamente (Reynolds, 1997). Muchos animales han sido expuestos a intervalos de temperatura utilizando un estanque o acuario que en un extremo se calienta y en el otro se enfría. Los primeros experimentos de este tipo que se hicieron en México se realizaron en el Laboratorio de Ecofisiología del Departamento de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.) (Rosas *et al.*, 1986) con el ciclido *Sarotherodon mossambicus* en un tubo de asbesto de 3.7 m de largo y 0.3 m de diámetro. Thomas *et al.* (1963) utilizaron una lamina de aluminio cubierta con agar en la superficie para conocer el crecimiento de las algas. En este tipo de laminas también se caracterizó el crecimiento y el contenido de lípidos de la diatomea *Chaetoceros muelleri* (McGinnis *et al.*, 1997). Reynolds (1977) hace una exhaustiva retrospectiva del tema y presenta un "shuttlebox" para estudiar las respuestas de los organismos con un diagrama del "ictiotron" para estudiar simultáneamente aspectos de termorregulación, preferencia por la intensidad de luz y ritmos de actividad locomotora del huro *Micropterus salmoides* (Lacepède, 1802) y la trucha café *M. dolomieu* Lacepède, 1802. Rocha y Branco (1998) equiparon a *Rana catesbiana* con sondas de temperatura y las estudiaron en un intervalo térmico de 10-40 °C. También, se han generado intervalos térmicos verticales para conocer las respuestas al ambiente en juveniles del salmón *Oncorhynchus keta*. Los sistemas donde se generan cambios térmicos también se pueden utilizar como incubadores para estudiar el efecto de la temperatura en el desarrollo embriológico y eclosión como se hizo con el jurel *Trachurus trachurus* (Linnaeus, 1758) (Pipe & Walker, 1987). Chen y Chen (1991) estudiaron la selección de temperatura de la anguila *Anguilla japonica* en un gradiente que tenía un intervalo de 11 a 31 °C. Espina *et al.* (1993) estudiaron la temperatura preferida y las evitadas del acocil *Procambarus clarkii*, así mismo Bückle *et al.* (1994, 1996) investigaron la relación de la termorregulación y los ritmos circadianos de este crustáceo y con base en el comportamiento termorregulador los autores enfocaron sus resultados aplicándolos al cultivo de la especie. Hecht (1994) estudió el comportamiento termorregulador del abulón *Halotis midae* y su aplicación en el cultivo intensivo. El comportamiento termorregulador y el desove de moluscos como el caracol marino *Bulla gouldiana* fue estudiado por Díaz *et al.*, (1996). Hernández *et al.* (1995) describen el comportamiento del langostino *Macrobrachium tenellum* expuesto a un gradiente térmico y los resultados del área de preferencia térmica fueron incorporados en el contexto del cambio climático global (Hernández & Bückle, 1997). En un estanque con un

gradiente de temperatura establecido se estudió la tolerancia térmica del pecílido *Poecilia sphenops* (Hernández & Bückle, 2002a) y también el efecto de la temperatura de aclimatación en la temperatura preferida (Hernández *et al.*, 2002b).

Keiser y Aldrich en 1973 hacen un extenso análisis de los sistemas que se utilizan para generar los gradientes salinos los cuales se utilizaron para conocer la preferencia salina de los oligoquetos (Jansson, 1962) en cámaras con diferencias abruptas de salinidad. Hodgson (1951) y Jones (1947) emplearon un gradiente horizontal de salinidad donde introdujeron agua con diferentes salinidades en cada extremo del estanque. Este arreglo fue modificado introduciendo agua con diferentes soluciones salinas para que los organismos nadaran en busca de la fuente de su preferencia. También, se han ensayado gradientes salinos verticales organizados con diferentes capas de agua con soluciones salinas discontinuas. Doudoroff (1938) introdujo agua con diferentes salinidades en catorce áreas o puntos de un estanque horizontal y Hansen (1972) mezcló agua de mar con agua dulce para producir un gradiente horizontal. En general los gradientes salinos han sido adaptados a las exigencias del estadio de desarrollo, tamaño y comportamiento de los organismos (Keiser & Aldrich, 1973). El gradiente horizontal sin barreras salinas que se describe en este trabajo tiene el principio de inyectar continuamente agua dulce y de mar en los extremos del estanque.

El objetivo de este trabajo se remonta a varios años de experimentación, perfeccionamiento e integración de un sistema para la investigación ecofisiológica en organismos marinos y dulceacuícolas. Con los resultados de numerosas experiencias se concluye con un sistema flexible en el que se pueden hacer diversos experimentos para conocer la termo y halotolerancia en diferentes etapas de la vida temprana de los animales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diagrama del sistema. La figura 1 muestra la disposición general del sistema. Todas las partes que constituyen el sistema no funcionan simultáneamente y depende del objetivo que tenga el experimentador.

El estanque experimental. El estanque fue construido con laminas de acrílico transparente de 1.1 cm de grosor, 365 cm de longitud, 31 cm ancho y 26 cm de alto (Fig. 2 a) y tiene un volumen total de 220 L. El estanque esta sobre una base metálica de aluminio de 90 cm de alto y 39.5 cm de ancho montada sobre ruedas y con tornillos que permiten equilibrarla y mantenerla horizontal (Fig. 2 b). En el interior y a lo largo del estanque sujeto a una tubería de PVC de 2.5 cm de diámetro rellena con arena y sellada en sus extremos con tapones de

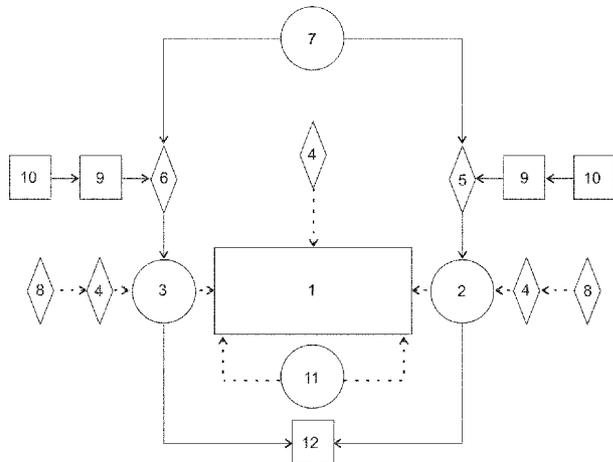


Figura 1. Diagrama básico del sistema. Todas las partes que constituyen el sistema no funcionan simultáneamente y depende del objetivo que tenga el experimentador. 1, estanque; 2, intercambiador de calor que enfría el agua; 3, fuente de calor; 4, aire; 5 y 6, agua dulce o agua de mar; 7, degasificador; 8, nitrógeno; 9, sistema ultravioleta; 10, filtro de agua de 80 micras; 11, motobomba para recircular el agua entre los extremos distales del estanque; 12, canal recolector.

PVC, se instaló una manguera de irrigación con poros pequeños que permite difundir el aire uniformemente (difusor central Fig. 3 j) en toda la columna de agua. En cada extremo del estanque se incluyó una cámara construida de tubo PVC de 20.3 cm de diámetro y 29 cm de largo (Fig. 2 d y Fig. 3 b) en cuya base se instalaron tres llaves de paso de 1/2 pulgada (Fig. 3 c). En un extremo del estanque se sumergieron dos calentadores de titanio de 1,000 W cada uno (Figs. 2 d y 3 g) y dos termistores (YSI 44106) conectados a un controlador electrónico (Figs. 2 e y 3 h) que mantienen la temperatura en ± 1 °C. El agua se enfría en el otro extremo del estanque por medio de un intercambiador de calor (HX -100, Neslab, Fig. 2 f). La pared del estanque fue marcada para dividirlo en 15 cámaras virtuales. La temperatura en cada cámara se midió con un termógrafo (SR 630 Stanford Research System) con 15 termistores (Fig. 2 g) que transmiten la información recabada, en un intervalo de tiempo prefijado por el operador, a una impresora o a una computadora. Una motobomba de 1/20 HP puede recircular el agua del estanque (Fig. 2 h) y otra de mayor capacidad puede impulsar el agua a un degasificador (Figs. 2 i y 3 k).

Unidad electrónica de control de temperatura. El circuito de esta unidad está basado en un microcontrolador inteligente,

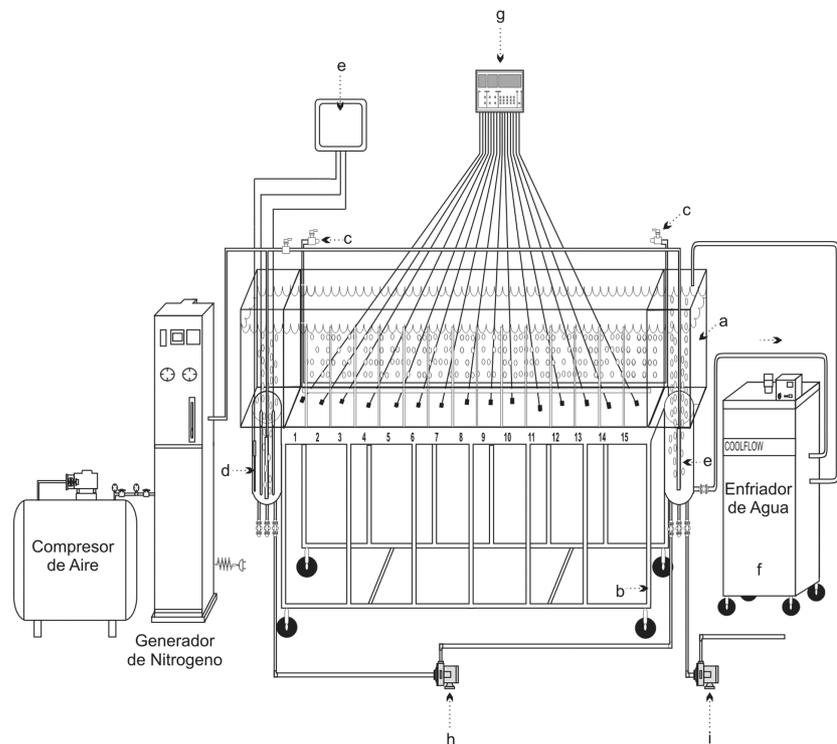


Figura 2. Vista general del sistema. a, estanque; b, mesa metálica con ruedas y tornillos para equilibrar el estanque; c, válvula de paso del difusor que distribuye el aire en el interior del estanque; d, cámara con calentadores de titanio y termistor; e, piedra de aireación; f, intercambiador de calor para enfriar el agua de la cámara fría; g, sensor remoto de temperatura (SR 630) con termistores para cada una de las 15 cámaras virtuales del gradiente; h, motobomba de 1/20 HP para recircular el agua del estanque; i, motobomba de 1 HP con turbina magnética que impulsa el agua del estanque al degasificador a través de la válvula solenoide ubicada en la parte superior del degasificador.

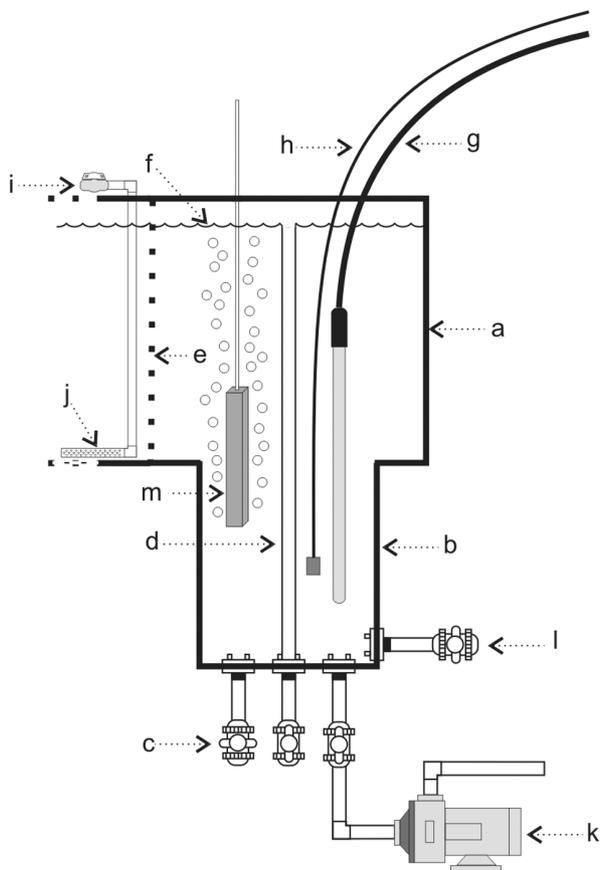


Figura 3. Vista lateral de una cámara dístal del estanque. a, estanque; b, cilindro de PVC de 8 pulgadas de diámetro; c, válvulas de 1/2 pulgada; d, tubo de 1/2 pulgada para fijar el nivel del agua (f) en el estanque; e, malla de mosquitero para evitar que los organismos en experimentación tengan contacto directo con las cámaras fría o caliente; g, calentador de titanio; h, termistor; i, inyección de aire; j, difusor central que distribuye el aire a lo largo del interior del estanque; k, motobomba de 1/2 HP que impulsa el agua del estanque al degasificador; l, válvula de paso de 3/4 de pulgada que transfiere el fluido de la cámara al enfriador de agua; m, piedra de aireación.

programado para ejecutar las funciones de medición, despliegue y control de la temperatura del agua (Fig. 4). El sensor utilizado en el circuito es un termistor de alta precisión que varía su resistencia eléctrica en función de la temperatura del agua. El microcontrolador mide el valor de resistencia del termistor, lo convierte a temperatura y envía la información a una pantalla de tres dígitos que la despliega con una resolución de 0.2 °C. Para controlar la temperatura del agua se selecciona un punto de ajuste entre 0 y 65 °C. Si la temperatura es menor que el punto de ajuste, el microcontrolador enciende un relevador electrónico de potencia que alimenta con voltaje a una resistencia eléctrica de hasta 4,000 vatios para que caliente el agua. Cuando la temperatura del agua es igual

o mayor que el punto de ajuste, el relevador se desactiva. Para aumentar la precisión del circuito el microcontrolador ejecuta un ciclo de calibración previo a cada ciclo de medición leyendo una resistencia de precisión cuyo valor esta almacenado en el programa. La diferencia entre la lectura real y el valor programado, corresponde a los errores de primer orden provocados por los cambios en la temperatura ambiental, tolerancia de los componentes y variaciones del voltaje de alimentación que son eliminados. El micro-controlador trabaja a cuatro Megahertz de velocidad, lo que permite realizar aproximadamente en un tercio de segundo un periodo completo de medición, despliegue y control de la temperatura. Una botonera permite al usuario programar y ver en la pantalla el punto de ajuste de la temperatura y tres lámparas indicadores señalan el estado de operación del controlador (Fig. 4), la presencia de voltaje, la activación del relevador y la selección del punto de ajuste.

Temperatura constante. Para obtener una temperatura constante en todo el estanque, se fija la temperatura del agua en la caja de control de los calentadores (Fig. 4). Para que la energía transferida por los calentadores (constituidos por dos resistencias de 1,000 vatios cada uno) se reparta uniformemente se incluye la motobomba de 1/20 HP que recircula el agua entre los extremos del estanque (Fig. 2 h). El agua del estanque también se puede enfriar con el enfriador o intercambiador de calor y la motobomba de 1/20 HP activada (Fig. 2). El difusor central de aire ubicado dentro del estanque evita que el agua de diferente temperatura se estratifique (Fig. 3 j).

Gradiente de temperatura. Para generar un gradiente térmico en el estanque se procede a calentar el agua como en el ca-

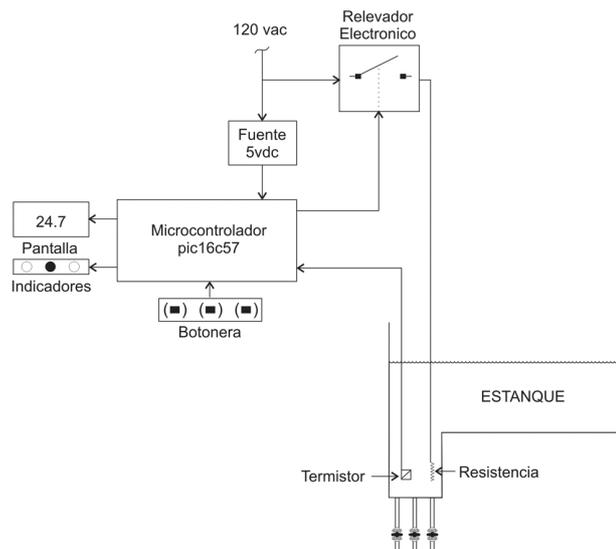


Figura 4. Unidad electrónica de control de temperatura.

so de la temperatura constante pero se excluye la motobomba de recirculación de 1/20 HP (Fig. 2 h). Con los aparatos de enfriamiento y calentamiento de agua ubicados en cada extremo del estanque se fija el intervalo de temperatura deseado. Para obtener una buena mezcla del calor y del frío en cada extremo del estanque se incluye una piedra de aireación (Fig. 3 m). El difusor de aire ubicado dentro del estanque (Fig. 3 j) permite mantener los niveles adecuados de oxígeno disuelto y evita la estratificación de la columna de agua.

Sistema para establecer diferentes niveles de oxígeno (degasificador). El sistema degasificador fue construido con el principio de generar en el interior de un cilindro vertical de PVC el vacío necesario para extraer los gases disueltos del agua (Fig. 5). El funcionamiento de los degasificadores han sido descrito por Dawson y Marking (1986), Fuss (1986) y Herman (1995). El que se construyó para este sistema consiste en un cilindro de PVC célula 40 que tiene 230 cm de altura y 10.1 cm de diámetro (Fig. 5 a). El extremo superior del cilindro tiene una válvula solenoide (Fig. 5 b) activada por el sistema electrónico (Fig. 6) que permite la entrada de agua previamente filtrada que se va a degasificar. En el interior del cilindro hay tres sensores de control de nivel de agua (Flowline, LV10-1301), dos que detectan el nivel superior e inferior del agua (Fig. 5 d, e) y otro que señala el nivel crítico de agua del sistema (Fig. 5 f) y activa una alarma sonora. La bomba de vacío (Fig. 5 g) extrae el aire disuelto en el agua desde la parte superior del cilindro de PVC a través de un matraz de kitasato de paredes gruesas (Fig. 5 h) conectado a un manómetro que indica la presión negativa dentro del cilindro (Fig. 5 i) y una válvula de paso (Fig. 5 j) que regula el vacío. En la medida que se abre la válvula de paso, esta permite una mayor entrada de aire y en consecuencia disminuye el vacío que se ejerce sobre la columna de agua en el interior del cilindro y aumenta la concentración de oxígeno. Una motobomba de 1 HP con una turbina magnética (Fig. 5 k) conectada a la base del cilindro extrae el agua desgasificada y la impulsa al estanque (Fig. 5 l) ya sea en la cámara donde se encuentran los calentadores de titanio o en la cámara donde se enfría el agua. La figura 6 muestra la estructura electrónica que controla al degasificador.

Para desplazar el oxígeno disuelto en el agua también se puede utilizar un generador de nitrógeno (Balstron Modelo 75-790) en línea con un compresor de aire de 100 libras de presión que funciona sin aceite (Fig. 2). El nitrógeno se puede inyectar en el difusor central de aireación ubicado dentro del estanque (Fig. 3 i, j) o en las cámaras fría o caliente del sistema.

Concentración de oxígeno constante. Para obtener una concentración uniforme de oxígeno disuelto es necesario recircular el agua entre los extremos del estanque con la motobomba de 1/20 HP. La extracción de los gases disueltos

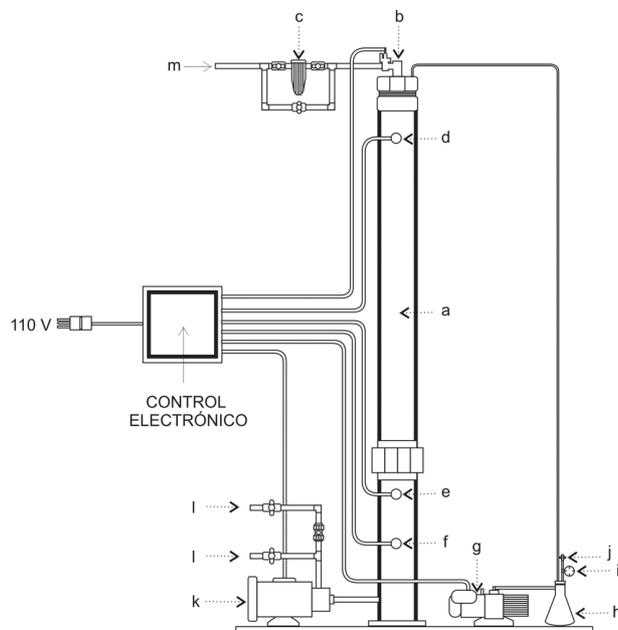


Figura 5. Degasificador. a, Tubo vertical de PVC de 230 cm de alto y 10.1 cm de diámetro; b, válvula solenoide; c, filtro de agua; d, e, control del nivel superior y medio del agua en el cilindro; f, control del nivel crítico del agua; g, bomba de vacío; h, matraz kittasato; i, manómetro de vacío (0-30 psi); j, válvula de paso para permitir la entrada de aire y regular el nivel de vacío en el cilindro; k, motobomba; l, salida de la motobomba que desplaza el agua degasificada al estanque; m, motobomba que extrae el agua del estanque (Fig. 2 i) e impulsa el fluido a la parte superior del cilindro que extrae los gases del agua.

se realiza impulsando el agua desde el estanque experimental al degasificador con la motobomba (Fig. 2 i) y la devuelve al lugar de origen. El nivel de oxígeno que se desea establecer en el estanque se fija en la válvula de paso que se encuentra en el kitasato (Fig. 5 j) inmediatamente después de la bomba de vacío (Fig. 5 g). En la medida que esta válvula se abre o se cierra regula el vacío en el matraz de kitasato. El oxígeno disuelto se midió con un oxígeno metro marca YSI Modelo 57 con compensador de salinidad.

Gradiente de oxígeno disuelto. Para generar un gradiente de concentración de oxígeno disuelto en el agua de mar o dulce, en el estanque de experimentación no se utiliza la motobomba de recirculación de 1/20 HP. Al difusor central de aire que se encuentra en el interior del estanque (Fig. 3 j) se agrega una pequeña cantidad de aire para mantener el agua del estanque en movimiento. Para extraer los gases disueltos en el agua se procede a trabajar con el degasificador en la misma forma descrita para la concentración constante de oxígeno. En al cámara distal opuesta a la motobomba (Fig. 2 i) que ex-

trae el agua del estanque y la impulsa al degasificador, se inyecta aire profusamente a través de una piedra de aireación rectangular de 15 x 3.5 cm para mantener la concentración de oxígeno disuelto al mas alto nivel posible.

Si se desea disminuir el oxígeno disuelto en el agua del estanque mas allá de la capacidad del degasificador, se procede para que la mitad del difusor central reciba aire (Fig. 2 c) y la otra mitad, nitrógeno con un 95 % de pureza (0.6 - 0.7 % de O₂) para disminuir la concentración de oxígeno de 2.2 a 0.97 mg/L en 1.5 h.

Salinidad constante. Para establecer una salinidad lineal en el estanque experimental, los volúmenes de agua dulce o de agua de mar que se adicionan pueden ser variables, para evitar un gasto excesivo de agua, es recomendable limitarlo, de manera tal que la suma de los fluidos sea de un máximo de 1 L/min. Para producir una mezcla adecuada en todo el estanque se activa la motobomba de recirculación de 1/20 HP que une las cámaras de los extremos del estanque (Fig. 2 h). El estanque inicialmente vacío, se llena con agua hasta que se complete el volumen total de 220 L y el remanente de agua dulce o de mar escurre por los tubos de desagüe instalados en cada uno de los extremos del estanque (Fig. 3 d).

Para obtener una salinidad lineal se puede utilizar la siguiente ecuación:

$a \cdot X = b \cdot (x + y)$ donde a = salinidad (ups) del agua de mar; x = volumen de agua de mar; y = volumen de agua dulce; b = salinidad (ups) deseada por mezcla.

La salinidad se midió con un refractómetro (± 1 ‰) marca Vista con compensación automática de temperatura (0 -10%) y también con un salinómetro marca LabComp SCT (± 0.1 ‰).

Gradiente de salinidad. Para formar un gradiente salino es necesario tener en cuenta las siguientes condiciones iniciales: el estanque experimental hay que mantenerlo perfectamente horizontal; los desagües ubicados en los extremos del estanque (Fig. 3 d) deben tener la misma altura para que el agua se descargue por igual en cada uno de los extremos (Fig. 1; 12). Los desagües están conectados a una de las llaves de paso de 1.3 mm ubicada en la cámara fría y caliente (Fig. 3). Para iniciar el gradiente salino, el estanque debe estar vacío. El volumen de las entradas de agua de mar y dulce se regula con base a la diferencia de unidades de salinidad que se desea establecer entre los extremos del estanque. Las piedras de aireación que se encuentran ubicadas en las cámaras de los extremos del estanque se cancelan y el difusor central de aire que se encuentra en el interior del estanque, mantiene el agua aireada y no causa una variación en la distribución del gradiente salino.

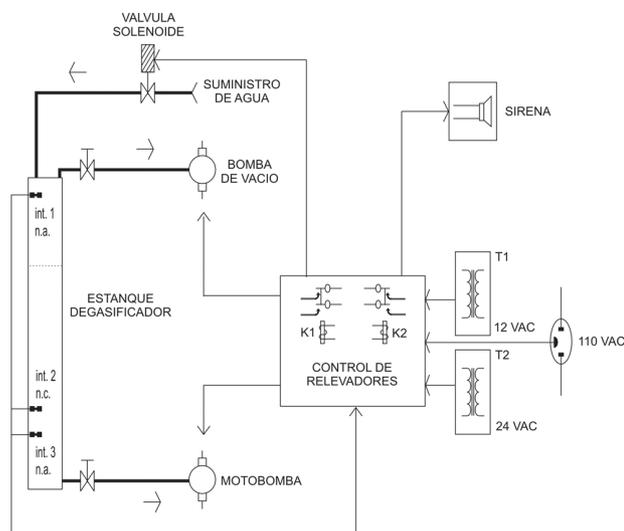


Figura 6. Control electrónico del degasificador. El agua dulce o agua de mar es expuesta al vacío en el cilindro de PVC. La caja de control ordena la operación secuencial de los relevadores y de tres interruptores magnéticos ubicados en el interior del cilindro. Cuando el nivel del agua disminuye hasta el interruptor magnético 2 (normalmente cerrado) se abre la válvula solenoide que suministra el agua al cilindro hasta el nivel del interruptor magnético 1 (normalmente abierto) y se activa la bomba de vacío. El agua extraída por la motobomba disminuye el nivel del agua hasta que llega al interruptor magnético 2 (normalmente abierto) que cierra la válvula solenoide, apaga la bomba de vacío y se completa el ciclo. Si el interruptor 3 (normalmente abierto) detecta un nivel muy bajo de agua (condición de emergencia) se apaga la motobomba que extrae el agua degasificada y se activa una alarma sonora.

Substitución continua de agua. Para evitar la acumulación de productos derivados del metabolismo de los animales en la cámara fría o caliente del estanque se agrega un flujo continuo de 80 ml/min de agua dulce o agua de mar para reemplazar al menos el 50% del volumen del estanque en 24 h.

Simulador electrónico para establecer la longitud del día y de la noche. El laboratorio tiene un sistema para simular la longitud del día y la noche. Este sistema se utiliza para estudiar el ritmo circadiano de los organismos y está constituido por una unidad electrónica (Fig. 7) que tiene la característica de fijar el momento de la iniciación o término del día o la noche, encender o apagar paulatinamente la luz, y extender o acortar la duración entre ambas situaciones con base en los objetivos de los experimentos.

Primero el aparato genera una frecuencia fija como referencia (base de tiempo). Después se selecciona el tiempo de amanecer/atardecer en dos interruptores rotatorios, uno para las horas (con 10 posiciones numerados del cero al nue-

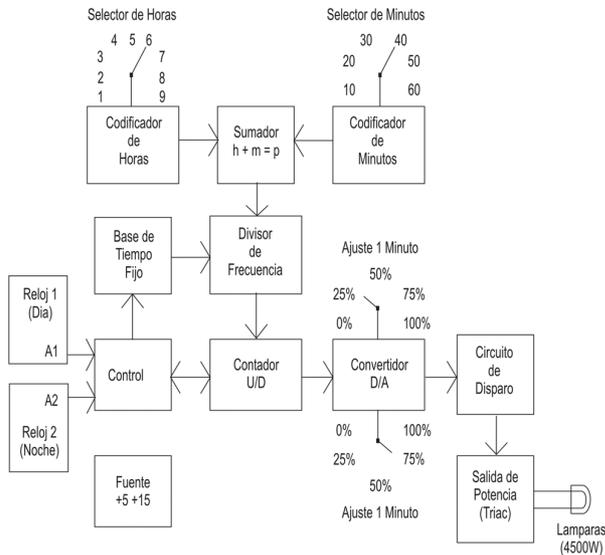


Figura 7. Estructura electrónica del simulador circadiano.

ve donde "1" corresponderá a una hora y así sucesivamente) y el otro para los minutos (con 7 posiciones numeradas del 0 al 60 en pasos diez en diez). Las salidas de los selectores se conectan con dos codificadores que convierten los números seleccionados a binario y pasan a un bloque sumador para obtener las horas y los minutos expresados en una sola cantidad. La frecuencia de base de tiempo se divide entre este número en un bloque divisor de frecuencia programable. El contador U/D (Fig. 7) toma la salida del divisor como entrada de reloj, por consiguiente su velocidad de recuento queda en función del tiempo seleccionado. El convertidor digital/análogo (D/A) (Fig. 7) recibe el recuento, genera una rampa de voltaje con una velocidad proporcional a la del recuento. La rampa de voltaje continúa por un circuito de disparo que controla el ángulo de conducción de un Triac conectado a las lámparas, entonces mientras el nivel de la rampa aumenta, el brillo de las lámparas también y viceversa. Con el ajuste de los límites mínimo y máximo de la rampa generada por el convertidor D/A se obtiene el ajuste de la intensidad mínima y máxima en las lámparas. Para que el ciclo sea completamente automático el bloque de control recibe las alarmas de dos relojes, uno para la hora de amanecer y otra para el atardecer. Cuando una de las alarmas se activa el control habilita la base tiempo para que se inicie el sistema, así mismo impone al contador aumentar o disminuir, dependiendo de la alarma que haya recibido y detiene el sistema cuando termina de ejecutar el ciclo y lo mantiene esperando para ejecutar el siguiente periodo (Fig. 7).

Fuente de luz artificial. Frente al estanque se instaló un banco luz blanca constituida por siete focos de 75 vatios conectados a una resistencia variable (Fig. 8, A B a) y dos focos

neón rojos de 75 vatios, 244 cm de largo cada uno para trabajar durante la noche (Fig. 8, A B b). Waterman (1961) propuso que para observar el comportamiento de algunos crustáceos sensibles a la luz, podría minimizarse cualquier perturbación utilizando luz roja. La estructura tiene ruedas para moverla y sostiene una cortina de color azul oscuro en cuya parte superior se hicieron pequeñas ventanas para observar el comportamiento de los organismos en el estanque experimental (Fig. 8 B, c).

RESULTADOS Y DISCUSION

El sistema. Este trabajo es el resultado de años de éxitos y fracasos que sirvieron para establecer un sistema que consideramos de gran utilidad para la experimentación en algunos aspectos del campo de la ecofisiología. El sistema descrito ha resultado altamente eficaz y flexible para los objetivos de la investigación experimental.

La temperatura, el oxígeno y la salinidad se pueden modular en forma uniforme o gradual pero también es posible formar gradientes con pares de variables y además con el conjunto de las tres. Los experimentos se repitieron varias veces para comprobar que las variables se mantenían en los niveles proyectados. Con toda la infraestructura descrita se han hecho experimentos con moluscos (*Bulla gouldiana*), crustáceos (*Litopenaeus vannamei*), peces (*Poecilia sphenops*, *Totoaba macdonaldi*, *Hypsypops rubicundus*, *Atractoscion nobilis*) en experimentos agudos (1 h) o crónicos (24 h o más) y también con las microalgas *Rhodomonas* sp y *Chaeto-*

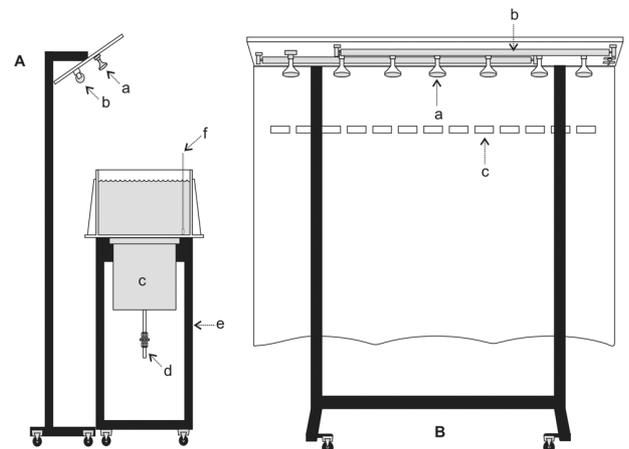


Figura 8. Vista lateral y de frente del banco de luz y del estanque. (A), a, focos de 75 vatios para trabajar en el día; b, lámparas neón rojas (Sylvania, F96T12/R de 75 vatios) para trabajar de noche; c, estanque; d, llaves de paso de 1/2 pulgada; e, base metálica del estanque. (B) banco de luz visto de frente; a, focos de 75 vatios; b, lámparas de neón rojas; c, cortina con ventanas para observar el comportamiento de los organismos en el estanque.

ceros sp. Al comparar con otros sistemas descritos, este tiene la posibilidad de trabajar con las variables temperatura, salinidad y oxígeno que afectan la fisiología de los organismos marinos o dulceacuícolas. Con un reloj electrónico también se puede modular la longitud del día y de la noche y si es necesario trabajar de noche en experimentos crónicos la fuente de luz artificial proporciona la luz roja.

Temperatura constante. Todo el estanque puede uniformarse a una temperatura constante para lo cual es necesario activar una motobomba de 1/20 HP para recircular el agua dulce o de mar entre las cámaras (Figs. 2d y 3b) ubicadas en los extremos del estanque. Para que el agua fluya entre las cámaras se utilizan las llaves de paso de 1/2 pulgada ubicadas en la base de las cámaras fría y caliente (Fig. 3 c). Después se determina la temperatura deseada con la unidad de control electrónica (Figs. 2 e y 4). Cuando se utilizan calentadores de titanio, la energía transferida al agua se puede regular a partir de la temperatura ambiental hasta 40 °C y puede aumentarse con otros calentadores de titanio si las condiciones de los experimentos lo requieren. Para mantener la temperatura del agua sin variaciones verticales, es necesario inyectar aire en el difusor central (Fig. 3 i, j) ubicado en el interior del estanque experimental que produce un movimiento circular del agua.

También es posible experimentar con temperaturas constantes bajas utilizando un enfriador de agua (Fig. 2 f), que disminuye la temperatura con base en la capacidad de extracción de calor que tenga. La unidad de enfriamiento tiene una motobomba que extrae el agua, la enfría y la impulsa nuevamente al estanque. La temperatura baja también se mantiene invariable en la vertical si al conjunto se incluye la motobomba de recirculación (Fig. 2 h). Por ejemplo, el enfriador puede estabilizar la temperatura inicial de 23 °C de los 220 L del estanque, a 11.4 °C después de 4 h.

Gradiente de temperatura. Para formar un gradiente térmico se prescinde de la motobomba de recirculación de 1/20 HP que se utiliza para mantener la temperatura constante en el estanque. Con el control electrónico (Fig. 4) se precisa la temperatura experimental deseada en la cámara caliente del estanque que apaga y enciende automáticamente a dos calentadores de titanio de 1,000 vatios cada uno. Con el enfriador se fija la temperatura del agua en el extremo opuesto del estanque. El investigador puede establecer la diferencia de temperatura que desea entre los extremos del estanque y esto depende de las capacidades de los aparatos que utiliza para enfriar o calentar el agua. Se han experimentado gradientes de temperatura con una diferencia máxima de 30 °C entre los cámaras distales del estanque de 3.65 m. Durante el proceso de la formación del gradiente de temperatura, los termistores transmiten una señal con la temperatura local de

cada cámara virtual al termógrafo SR 630 (Fig. 2 g) que las inscribe en una impresora o directamente a una computadora.

Concentración de oxígeno constante. El degasificador (Fig. 5) puede extraer el oxígeno disuelto del agua de mar del estanque con 20.8 °C, 37 uds y con una concentración inicial promedio de 7.11 mg/L a una concentración final promedio de 2.2 mg/L en 1h (Fig. 9). La extracción de los gases efectuada en el degasificador se hizo con un vacío de -35 psi. La concentración del oxígeno extraída por el degasificador se puede regular en la válvula de paso ubicada en el kitasato (Fig. 5 j) al nivel que estime el investigador.

Con el estanque lleno de agua dulce (1 uds) se procede en forma similar. El estanque con un promedio inicial de 9.25 mg/L de oxígeno disuelto (Fig. 9) puede disminuir con el degasificador a 2.53 mg/L en 1.5 h y puede continuar disminuyendo a 1.69 mg/L si el agua se expone 1 h más a la inyección del nitrógeno. La motobomba de recirculación de 1/20 HP mantiene la condición experimental establecida.

Gradiente de oxígeno disuelto. En el estanque lleno de agua dulce o agua de mar se puede generar un gradiente de oxígeno. El agua del estanque se transfiere por medio de la motobomba (Fig. 2 i) al degasificador que después de ser procesada se re-inyecta en la misma cámara donde además, si es necesario disminuir la concentración de los gases se puede adicionar nitrógeno a través de una piedra de aireación rectangular de 15 x 3.5 cm (Fig. 3 m). La experiencia de trabajo experimental señala que es importante inyectar nitrógeno en el difusor central para obtener el gradiente de oxígeno

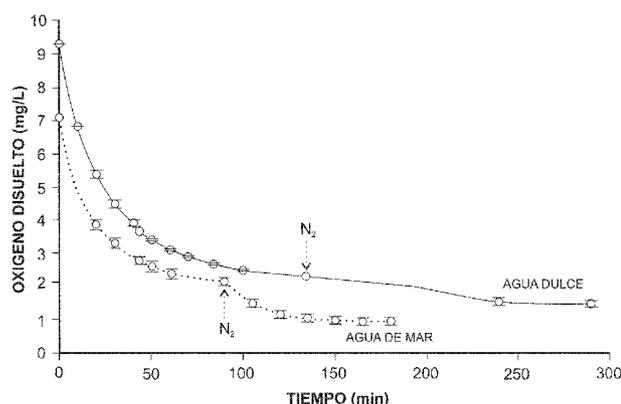


Figura 9. Tiempo requerido para extraer el oxígeno disuelto del agua del estanque. La curva superior corresponde al efecto del degasificador al extraer el oxígeno del agua dulce y la curva inferior al agua de mar. Las flechas indican el momento en que las variables tienden a estabilizarse y si es necesario para el objetivo de experimentación, se inicia la inyección del nitrógeno (N_2) al estanque (en cada punto se indica el error estándar).

no. Con otra piedra de aireación, en la cámara opuesta, se inyecta el aire profusamente.

La figura 10 muestra el proceso de la extracción de oxígeno del estanque lleno con agua dulce o agua de mar. En ambos el procedimientos se inició primero con el degasificador que re-circulaba el agua en un extremo del estanque. Cuando el oxígeno disuelto del agua comenzó a estabilizarse se inició la inyección de nitrógeno con un 95% de pureza (0.6 - 0.7 % O₂). Este proceso es más lento en el agua dulce, que requiere cerca de 300 min y el agua de mar 150 min. Una vez que el gradiente de oxígeno se estabiliza se mantiene sin variar. Si el operador solo dispone de nitrógeno, este se inyecta en la piedra de aireación y en la válvula de paso del aire (Fig. 2) del mismo lado del estanque y en el extremo opuesto se insufla el aire en la piedra de aireación y en la válvula de paso del difusor central. En esta forma la mitad del difusor central (Fig. 3 j) recibe nitrógeno y la otra aire. La figura 10 es el resultado de la distribución del oxígeno disuelto en todas las cámaras del estanque. El proceso se inicia en el estanque con una concentración de oxígeno de 8.0 mg/L y se estabiliza en la cámara 1 con 7.2 y la cámara 15 con 2.3 mg/L. Este proceso tiene pequeñas diferencias con respecto al modelo constante pero que en términos generales configura diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los extremos y el centro del estanque.

Es importante mencionar que la concentración de oxígeno en el agua se considera un factor limitante que puede restringir la cantidad de oxígeno necesario para los procesos metabolitos de los organismos. Con este dispositivo se pueden establecer los límites óptimos de oxígeno que requieren las especies y es un campo de estudio donde se carece de información científica.

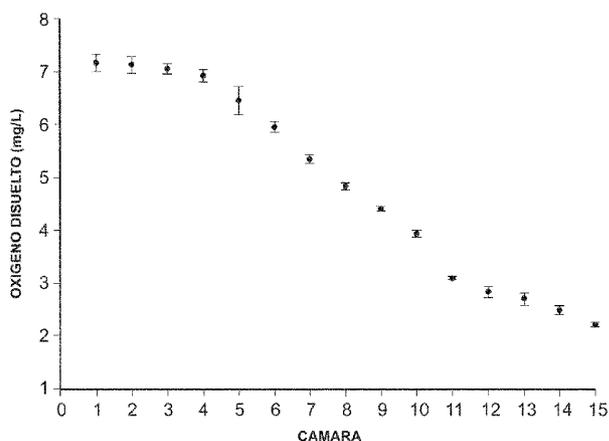


Figura 10. Distribución del oxígeno disuelto en el agua de mar de las cámaras del estanque. En éste ejemplo se utilizó el degasificador y también nitrógeno (en cada punto se indica el error estándar).

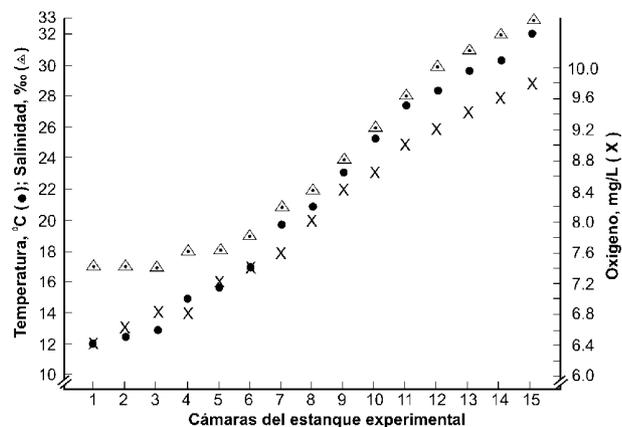


Figura 11. La figura indica el resultado de las concentraciones de tres variables en el estanque experimental. En este ejemplo la salinidad del agua de mar y del agua dulce fue de 36 y 1 ups respectivamente.

Salinidad constante. Se aplicó la ecuación y se hicieron ensayos de salinidad lineal para 10, 15, 20 y 25 ups. La salinidad inicial del agua de mar fue 35 ups y el agua dulce 1 uds. En los experimentos la salinidad se mantuvo constante en todo el estanque por que la motobomba de 1/20 HP mantiene una excelente recirculación en el sistema. Además, no existe una diferencia significativa en la distribución vertical de la salinidad en todas las cámaras virtuales del estanque por que el difusor central de aire (Fig. 3 j) y la motobomba de recirculación (Fig. 2 h) la distribuyen uniformemente.

Gradiente de salinidad. Se hicieron experimentos con diferentes volúmenes de agua de mar y de agua dulce para generar intervalos salinos de 3 a 22 unidades de diferencia entre los extremos del estanque. El agua se dosifica a las cámaras distales del estanque que se llenan lentamente hasta que se establece el gradiente salino y no tiene variaciones si el volumen de agua que se añade es constante. El agua que se inyecta en las cámaras distales del estanque ejercen presión sobre todo el volumen del agua del estanque, por tanto, para que un fluido no predomine sobre el otro, es fundamental que por los desagües escurra el volumen correspondiente. Sin embargo, en la medida que la experimentación requiere que el intervalo de salinidad en el estanque sea mayor, la práctica señala que es necesario obligar al volumen del estanque que fluya en una dirección determinada. Por ejemplo, para tener en el estanque un gradiente de 35 ups a 7 ups el fluido debe desaguar en la cámara donde se inyecta el agua de mar, de esta manera el agua dulce presiona el fluido, generando el gradiente programado. Con la práctica experimental se puede formar un gradiente de salinidad. El difusor central de aire se mantiene activo para conservar la mezcla de las aguas y evitar la estratificación. La salinidad en cada una de las cá-

Tabla 1. Ejemplos de intervalos salinos con diferentes flujos de agua de mar y agua dulce (ml/min).

Agua de mar	Agua dulce	Cámara 1	Cámara 15	Intervalo de ups
2160	640	34	29	5
1000	1580	15	9	6
1760	1020	29	22	7
1420	740	26	18	8
1280	1060	24	16	8
2280	720	31	22	9
2200	720	25	15	10
1760	1020	32	21	11
1000	1580	15	3	12
1280	1060	28	15	13
2200	720	32	18	14
2240	760	30	15	15

maras virtuales a lo largo del estanque corresponde al gradiente establecido y no se produce una diferencia de la salinidad entre el fondo, el medio y la superficie del agua. El gradiente de salinidad se puede producir en dos horas aproximadamente. La Tabla 1 resume una selección de experimentos que se han hecho con diferentes volúmenes de agua de mar y agua dulce donde el intervalo de salinidad entre las cámaras 1 al 15 fue ordenado en forma creciente.

Gradiente de temperatura, oxígeno y salinidad combinados.

Dentro de los límites de los aparatos que se dispongan es posible generar gradientes de temperatura, salinidad y oxígeno combinados. De hecho, al calentar el extremo del estanque experimental lleno con agua y enfriar el otro, se forma un gradiente de oxígeno con la combinación del aire insuflado y la temperatura de cada una de las cámaras virtuales. En secuencia de trabajo se ha procedido a formar primero el gradiente de salinidad, seguido del gradiente de temperatura sin utilizar el degasificador. El tiempo para la formación de los gradientes depende de la capacidad de los aparatos y del volumen del estanque. Por ejemplo, si el estanque experimental de 220 L tiene inicialmente 8 mg/L de oxígeno y 18°C donde el flujo de agua de mar se fija 1140 ml/min; el flujo de agua dulce a 500 ml/min y el enfriador recircula el agua de la cámara correspondiente a 6 L/min, se obtiene la figura 11 donde un organismo puede ubicarse en una cámara que sea su selección preferencial. En este ejemplo las variables se estabilizaron en tres horas.

La experimentación en el sistema construido y perfeccionado durante varios años ha garantizado la eficiencia en tiempo al poder trabajar con tres variables, además ha permitido conocer la respuesta de los organismos al preferir o seleccionar un

intervalo de condiciones ambientales específicas tal como se observó en el camarón *Litopenaeus vannamei* al exponerlo a un gradiente de temperatura y salinidad (Hernández et al., Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, datos sin publicar).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Gobierno Federal de México con los fondos regulares del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (C.I.C.E.S.E.) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto 4050-PB. También extendemos nuestro reconocimiento a Francisco Valenzuela Buriel por los dibujos de los sistemas.

REFERENCIAS

- BÜCKLE, R. L., F. H. DÍAZ, F. S. CORREA, B. S. BARÓN & M. R. HERNÁNDEZ. 1994. Diel thermoregulation of the crawfish *Procambarus clarkii* (Crustacea, Cambaridae). *Journal of Thermal Biology* 19 (6): 419-422.
- BÜCKLE, R. L. F., F. H. DÍAZ & S. ESPINA. 1996. Thermoregulatory behavior applied to the culture of *Procambarus clarkii* (Decapoda, Cambaridae). *Revista de Biología Tropical* 44: 123-126.
- CHEN, Y. L. L. & Y. H. CHEN. 1991. Temperature selections of *Anguilla japonica* (L.) elvers, and their implications for migration. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 42: 743-750.
- DAWSON, V. K. & L. MARKING. 1986. An integrated system for treating nitrogen supersaturated water. *The Progressive Fish-Culturist* 48: 281-284.
- DÍAZ, H. F., R. L. F. BÜCKLE, B. BARÓN S. & C. FARFAN. 1996. Behavioral thermoregulation of *Bulla gouldiana* (Gastropoda: Opisthobranchia: Cephalaspidea). *Journal of Thermal Biology* 21: 319-322.
- DOUDOROFF, P. 1938. Reactions of marine fishes to temperature gradients. *Biological Bulletin* 75: 494-509.
- ESPINA S., F. H. DÍAZ & L. F. R. BÜCKLE. 1993. Preferred and avoided temperatures in the crawfish *Procambarus clarkii* (Decapoda, Cambaridae). *Journal of Thermal Biology* 18: 39-39.
- FUSS, J. T. 1986. Design and application of vacuum degassers. *The Progressive Fish-Culturist* 48: 215 - 221.
- HANSEN, D. J. 1972. DDT and malathion: effects on salinity selection by mosquitofish. *Transaction of the American Fisheries Society* 101: 346-350.

- HECHT, T. 1994. Behavioral thermoregulation of the abalone *Haliotis midae*, and the implications for intensive culture. *Aquaculture* 126: 171-181.
- HERNÁNDEZ, R. M., R. L. F. BÜCKLE & F. DÍAZ. 1995. Preferred temperature of *Macrobrachium tenellum* (Crustacea, Palaemonidae). *Rivista Italiana di Acquacoltura* 30: 93-96.
- HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, M. & L. F. BÜCKLE RAMIREZ. 1997. Thermal preference area for *Macrobrachium tenellum* in the context of global climatic change. *Journal of Thermal Biology* 22, No. 4-5: 309-313.
- HERNÁNDEZ, R. M. & R. L. F. BÜCKLE. 2002a. Temperature tolerance polygon of *Poecilia sphenops*. *Journal of Thermal Biology* 27: 1-5.
- HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ M., L. F. BÜCKLE RAMIREZ & S. ESPINA AGUILERA. 2002b. Temperature preference and acclimation in *Poecilia sphenops* (Pisces, (Poeciliidae). *Aquaculture Research* 27 (1): 1-5.
- HERMAN, L. J. 1995. Water conditioning tank to control supersaturation and temperature. *The Progressive Fish-Culturist* 57: 164-165.
- HODGSON, E. S. 1951. Reaction thresholds of an aquatic beetle, *Laccophilus maculosus* Germ., to salts and alcohols. *Physiological Zoology* 24: 131-140.
- JANSSON, B. O. 1962. Salinity resistance and salinity preference of two aligochaetes *Akteredilus monospermatecus* Knoller and *Marionina preclitellochaeta* n.sp. from the interstitial fauna of marine sandy beaches. *Oikos* 13: 294-305.
- JONES, J. R. E. 1947. The reaction of *Pygosteus pungitius* L. to toxic solutions. *Journal Experimental Biology* 24: 110-122.
- KEISER, R.K. JR. & V. D. ALDRICH. 1973. A gradient apparatus for the study of salinity preference of small benthic and free swimming organisms. *Marine Science* 17: 153-161.
- MCGINNIS, K. M., T. A. DEMPSTER & M. R. SOMMERFELD. 1997. Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. *Journal of Applied Phycology* 9: 19-24.
- PIPE, R. K. & P. WALKER. 1987. The effect of temperature on development and hatching of scad, *Trachurus trachurus* L., eggs. *Journal Fish Biology* 31: 675-682.
- REYNOLDS, W. W. 1977. Fish orientation behavior: an electronic device for studying simultaneous responses to two variables. *Journal Fisheries Research Board Canada* 34: 300-304.
- ROCHA, P. L. & L. G. S. BRANCO. 1998. Physiological significance of behavioral hypothermia in hypoglycemic frogs (*Rana catesbeiana*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 119A: 957-961.
- ROSAS, C, J. LATOURNERIE, A. SÁNCHEZ & S. ESPINA. 1986. Respuestas metabólicas de *Sarotheron mossambicus* medidas experimentalmente en un gradiente térmico (Pisces : Cichlidae). *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Autónoma de México* 13: 243-250.
- THOMAS, W. H., H. L. SCOTTEN & J. S. BRADSHAW. 1963. Thermal gradient incubators for small aquatic organisms. *Limnology and Oceanography* 8: 357-359.
- WATERMAN, T. H. 1961. Light sensitivity and vision. In: T. H. Waterman (ed.). *The Physiology of Crustacea*, Vol. II. Sense Organs, Integration, and Behavior. Academic Press, N. Y.

Recibido: 25 de abril de 2003.

Aceptado: 4 de septiembre de 2003.

