

TESIS DEFENDIDA POR
Ma. De la Luz Paola Pérez Arvizu
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Mónica Hernández Rodríguez
Co-Director del Comité

Juan Pablo Lazo Corvera
Co-Director del Comité

Benjamín Barón Sevilla
Miembro del Comité

Oscar sosa Nishisaki
Miembro del Comité

Meritxell Riquelme Pérez
*Coordinador del programa de
posgrado en Ciencias con
Orientación en Acuicultura*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

31 de agosto de 2009

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE
ENSENADA



PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA

EFFECTO DE LA DENSIDAD DE SIEMBRA EN JUVENILES DE LENGUADO DE
CALIFORNIA *Paralichthys californicus* EVALUADO MEDIANTE INDICADORES DE
ESTRES

TESIS

Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

MA. DE LA LUZ PAOLA PEREZ ARVIZU

Ensenada, Baja California, México. Agosto, 2009.

RESUMEN de la tesis de **Ma. De la Luz Paola Pérez Arvizu**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con Orientación en Acuicultura.

Ensenada, Baja California, México. Agosto, 2009.

EFFECTO DE LA DENSIDAD DE SIEMBRA EN JUVENILES DE LENGUADO DE CALIFORNIA *Paralichthys californicus* EVALUADO MEDIANTE INDICADORES DE ESTRÉS.

Resumen aprobado por:

Mónica Hernández Rodríguez
Co-Director del Comité

Juan Pablo Lazo Corvera
Co-Director del Comité

El lenguado de California (*Paralichthys californicus*) es una especie de alto valor comercial, con un buen potencial demostrado para su cultivo a escala comercial. Sin embargo, aunque hasta la fecha se tiene lograda la producción controlada de juveniles en laboratorio, se desconocen aún muchas variables de los aspectos relacionados con las condiciones óptimas de cultivo durante la etapa de engorda. Entre estas variables, la densidad óptima de siembra que resulte en un mayor crecimiento y producción total es de suma importancia, permitiendo así lograr un cultivo más eficiente, rentable y sustentable. Por lo tanto, en esta investigación se evaluaron cuatro densidades de siembra; 25%, 50%, 75% y 100% de la cobertura del área del tanque (CAT), analizando el crecimiento, la sobrevivencia y la biomasa de los organismos, así como algunos indicadores de estrés tales como la glucosa, índice hepatosomático y concentraciones de cortisol en la sangre.

Para poder llevar a cabo éste experimento se utilizaron organismos de 2.6 g de peso promedio colocando 38, 75, 112 y 149 organismos para las densidades de 25, 50, 75 y 100% CAT respectivamente. Los organismos fueron colocados dentro de jaulas de malla plástica de 0.16 m² de superficie de fondo la cual fue colocada dentro de tanques circulares de fibra de vidrio de 220 L de capacidad los cuales estuvieron conectados a un sistema de recirculación semi-cerrado. Los resultados obtenidos demuestran que estadísticamente no se registraron diferencias significativas entre las cuatro densidades de siembra en el crecimiento de los organismos, aunque si existe una tendencia a un mejor crecimiento y a obtener organismos más grandes en la densidad de 75% de CAT. La sobrevivencia fue mayor en las densidades de siembra más altas, 75% y 100% de CAT y también logran obtener las mayores biomásas a final del cultivo. En relación a los indicadores de estrés, los niveles de cortisol fueron menores en las densidades más altas evaluadas (75% y 100% CAT), al igual que el índice hepatosomático, lo cual sugiere que en éstas densidades de siembra se experimentó un menor grado de estrés. Así mismo, la menor concentración de glucosa se observó en la densidad de siembra del 75% de CAT, lo que indica que en ésta densidad los organismos presentan un menor grado de estrés. Con base en estos resultados, se recomienda utilizar una densidad de siembra de 75% CAT para un cultivo más productivo, eficiente y rentable.

Palabras Clave: *Paralichthys californicus*, densidad, crecimiento.

ABSTRACT of the thesis presented by **Ma. De la Luz Paola Pérez Arvizu** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree with guidance in Aquaculture.

Ensenada, Baja California, México. August, 2009.

EFFECT OF SOWING DENSITY ON JUVENILE OF THE SOLE OF CALIFORNIA
Paralichthys californicus EVALUATED BY INDICATORS OF STRESS

ABSTRACT

The California halibut (*Paralichthys californicus*) is a high value species with a good potential for commercial aquaculture production. Although, successful spawning in captivity and larval rearing techniques has been developed with good growth and survival, many grow-out culture conditions are still unknown. Of particular importance is the knowledge of the initial fish stocking density that would result in higher growth and survival and thus result in higher and more efficient production systems. Therefore, in the present study the effect of four stocking densities were evaluated in terms of growth, survival and three indicators of stress condition in fish (cortisol and glucose concentrations in blood and the hepatosomatic index, HSI). 38, 75, 112 and 149 juvenile California halibut with an initial weight of 2.6 g and a body surface area of 10.77 cm², were stocked in cages of 0.16 m² to provide 25, 50, 75 and 100% of the tank coverage area (TCA), respectively. Cages were suspended inside twelve 220-L circular fiberglass tanks connected to a marine recirculating system. Fish were fed 5% of their body weight per day during 10 weeks with a commercial floating diet containing 45% protein. Although there was a clear trend of increase growth with increasing stocking density (in particular at the 75% TCA), no significant effect of stocking density on final weight was found at the end of the experiment. However, significantly higher survival was found in the 75 and 100% TCA treatments which resulted in higher final biomass compared to the two lower stocking densities.

Blood cortisol levels and HSI values were lower in the 75 and 100% TCA, indicating that the fish in the higher stocking densities were less stressed than the two lower densities. Similarly, blood glucose levels were lower in the fish stocked at 75% TCA. Based on the results from this study, it is recommended to initially stock juveniles California halibut at 75% TCA to obtain higher final biomass and raised the fish in an apparent less stressful condition.

Keywords: *Paralichthys californicus*, density, growth.

DEDICATORIAS

A Dios por dejarme existir y vivir ésta experiencia tan maravillosa.

A mis papas porque sin ellos nada de esto sería posible, por su amor incondicional y su confianza, por creer en mí y apoyar todas mis locuras, porque me dejaron crecer a pesar del dolor y por motivarme a seguir adelante. Este también es su logro. Gracias por ser mis papás y estar siempre ahí.

A mi Papa, porque siempre fuiste y seguirás siendo mi ejemplo a seguir, porque con tu amor y cariño hiciste a la persona que ahora soy, porque siempre me has apoyado en todo y nunca me has limitado, gracias por creer en mí y por ser mi Papa. Te quiero mucho Papito. No creas que se me olvida tu rancho.

A mi Mamá, por ser mi mejor amiga y porque sin su amor nada de esto sería posible, porque siempre has estado a mi lado y siempre me has ayudado a conseguir mis objetivos, por ser mi cómplice y mi fuente de esperanza porque con tu alegría y optimismo, nos has enseñado a superar los problemas más difíciles. Te quiero mucho Cocuelo, gracias por ser mi Mamá.

A mi esposo Luis, por ser el eje y el amor de mi vida. Porque me has enseñado el significado del verdadero amor, y por ser el compañero, el amigo, el novio y el esposo que siempre soñé. Gracias amor por éste tiempo y por tu apoyo, éste también es tu logro!!

A Paty, Brenda, Federico, Jorge y Ulises, por ser mis hermanos y porque siempre han estado ahí, por apoyarme en todos los aspectos de mi vida y por todos buenos momentos y locuras que hemos pasado juntos. Los quiero mucho y gracias por creer en mí.

A mis sobrinos Ulises hijo y Brenda Daniela, por ser la alegría de mi vida!!

A mi abuelito Federico y a mi abuelita Lucha, por ser nuestro principal apoyo, por su amor y su confianza hacia nosotros.

A mis tíos y primos, por preocuparse y estar siempre al pendiente de mí.

AGRADECIMIENTOS

Al CICESE por abrirme sus puertas y permitirme desarrollar como persona y como profesional.

A la Dra. Mónica Hernández Rodríguez y al Dr. Juan Pablo Lazo Corvera, por dirigir éste proyecto, por su tiempo, su experiencia y su apoyo.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla y al Dr. Oscar Sosa Nishisaki por ser miembros de mi comité de tesis, por su tiempo y por los comentarios y aportaciones hechas para la realización de éste proyecto.

Al Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez, por su conocimiento y experiencia, por dejarme trabajar con él y por ser un gran apoyo durante mi estancia en Ensenada.

Al personal técnico del departamento de Acuicultura, José Carlos Carballo Bastidas, Adrián Celaya Ortega, José Espinoza Ibarría, Norberto Flores Acevedo, Yanet Guerrero Rentería, Francisco Valenzuela Buriel y Luis Murillo Valenzuela por ser mis compañeros de trabajo, por su experiencia, sus consejos y por todas los momentos agradables.

A mis compañeros de grupo, Luis, Fernando, Catalina, Marisol, Getsemaní, Ana, Socorro, Pablo y Marcel, por los buenos momentos que pasamos juntos en clase.

A Marco Antonio Anzueto, por ser un gran amigo para mí y para mi esposo.

A los investigadores del departamento de Acuicultura del CICESE, por sus conocimientos, sus consejos y sus comentarios.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Estrés.....	3
II. ANTECEDENTES	9
III. JUSTIFICACIÓN	13
IV. OBJETIVOS	14
IV.1. Objetivo General.....	14
IV.2. Objetivos Específicos.....	14
V. HIPÓTESIS	14
VI. MATERIALES Y METODOS	15
VI.1. Sistema de cultivo.....	15
VI.2. Alimentación y mantenimiento de organismos.....	16
VI.3. Crecimiento y supervivencia.....	17
VI.4. Índice hepatosomático.....	18
VI.5. Estrés.....	18
VI.5.1. Cuantificación de glucosa.....	19
VI.5.2. Cuantificación de cortisol.....	19
VI.6. Análisis estadístico.....	21
VII. RESULTADOS	21
VII.1. Crecimiento.....	21
VII.2. Longitud.....	23
VII.3. Peso.....	24
VII.4. Índice hepatosomático.....	27
VII.5. Glucosa.....	28
VII.6. Cortisol.....	29
VII.7. Calidad del agua.....	30
VII.8. Factor de condición.....	30

CONTENIDO (continuación)

	Página
VIII. DISCUSIÓN	31
VIII.1. Crecimiento.....	31
VIII.2. Supervivencia.....	35
VIII.3. Cortisol.....	36
VIII.4. Glucosa.....	39
VIII.5. Índice hepatosomático.....	40
IX. CONCLUSIONES	43
X. APÉNDICE	45
X.1. Obtención de la curva estándar.....	45
X.1. Extracción de cortisol en plasma.....	47
XI. BIBLIOGRAFIA	49

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Longitud total final de <i>Paralichthys californicus</i> mantenidos en las diferentes densidades	23
2	Peso total final de <i>Paralichthys californicus</i> mantenidos en las diferentes densidades	24
3	Tendencia del crecimiento de <i>Paralichthys californicus</i> mantenido bajo diferentes condiciones de densidad de cultivo	26
4	Índice hepatosomático de <i>Paralichthys californicus</i> mantenidos en las diferentes densidades	27
5	Concentración de glucosa en sangre de <i>Paralichthys californicus</i> mantenidos en las diferentes densidades	28
6	Cuantificación de la concentración de cortisol en la sangre de <i>Paralichthys californicus</i> cultivado durante 8 semanas en diferentes densidades (25%, 50%, 75% y 100% CAT. La concentración se expresa como absorbancia	29

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Resultados de los parámetros evaluados durante 8 semanas de experimento	22
II	Análisis de Covarianza realizado a los datos de crecimiento en peso de <i>Paralichthys californicus</i> cultivado en diferentes densidades	25
III	Valores de las regresiones lineales efectuadas al peso y longitud de <i>Paralichthys californicus</i> cultivado en diferentes densidades.	26
IV	Medias y desviación estándar de la calidad del agua mantenida en las cuatro densidades de cultivo de <i>Paralichthys californicus</i> . Oxígeno (O ²), salinidad (‰), temperatura (T°) y nitrógeno amoniacal total (NAT).	31

I. INTRODUCCIÓN

Los océanos han sido considerados fuente ilimitada de recursos, capaces de alimentar a la población mundial, sin embargo, la demanda por estos recursos se ha incrementado a tal grado que supera significativamente la producción mundial de productos pesqueros dedicados al consumo humano. Es en éste punto donde se tiene que recurrir a la Acuicultura la cual es el cultivo de especies acuáticas en condiciones controladas (Avilés *et al.*, 2005). En el año 2004, la acuicultura representaba el 32.4% de la producción mundial de los productos pesqueros mundiales destinados a la alimentación (FAO, 2007).

México se identifica como un país con gran potencial de desarrollo acuícola debido al clima, los recursos naturales y a las especies nativas con potencial de cultivo. Para la acuicultura, el noroeste de México, por su productividad acuícola es la región más importante del país, ya que cerca de 65% de la producción nacional proviene de esta zona. Sonora y Sinaloa aportan cerca de 40% de la producción total, con más de 300 granjas de cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), mientras que los principales laboratorios de producción de postlarvas de camarón se encuentran en el estado de Sinaloa. Baja California Sur es una entidad que alberga especies de peces marinos de alto valor comercial, como el pargo rojo, el atún aleta amarilla, el robalo y el lenguado, los cuales son susceptibles de cultivo (Avilés *et al.*, 2005).

El lenguado de California es un pez plano del género *Paralichthys* que se distribuye desde el Río Quillayute en Washington EE.UU. hasta Bahía Magdalena en Baja California Sur, México. Su pesquería comercial y

deportiva se concentra principalmente en el centro y sur de las costas de California y de Baja California. De los peces planos que se capturan en California, el lenguado de California, *P. californicus* es la especie de mayor importancia en la pesca comercial y deportiva (Allen, 1988), debido, entre otras cosas, a que alcanza grandes tallas de hasta 1.5 m de longitud total y 32 kg de peso (Miller y Lea, 1972). La captura comercial de esta especie ha disminuido desde principios del siglo pasado. La explicación sobre el descenso de la pesquería se debe a la sobre explotación de las poblaciones de reproductores, y a la destrucción y alteración de los hábitat de resguardo (Ish y Stroman, 2006).

La acuicultura comercial de los peces planos se practica desde hace décadas con gran éxito. Por las causas antes mencionadas se considera al Lenguado de California como un excelente candidato para su cultivo. Algunos estudios realizados con esta especie (Kramer, 1990) demuestran que son tolerantes a las densidades elevadas y su crecimiento es rápido. Debido a que los adultos pasan su vida en el fondo de los tanques sin moverse, el costo metabólico es relativamente bajo (Piedrahita *et al.*, 2004).

En la acuicultura intensiva, ciertos factores biológicos y ambientales, como las altas densidades de siembra, las alteraciones químicas del agua, los procedimientos de manejo y el tratamiento de enfermedades, entre otros, son factores típicos que sobrepasan las capacidades biológicas normales de los peces. Estos factores pueden afectar la capacidad de los organismos, ocasionando bajas tasas de crecimiento y altas mortalidades. Los peces como otros animales, pueden sobrevivir bajo condiciones desfavorables durante tiempos limitados empleando mayor cantidad de energía y ciertos nutrientes (Wedemeyer, 1996).

1.1. ESTRES

El estrés se define como la respuesta endógena de un organismo a una demanda fisiológica ejercida sobre él, la cual causa un incremento de su estado fisiológico óptimo, al punto que las posibilidades de sobrevivencia pueden ser reducidas. El estrés se refiere al estado alterado del pez mientras que la respuesta al estrés es aquella manifestación fisiológica o comportamiento que puede ser medida para indicar el grado de estrés experimentado (Stickney, 2000)

Los efectos adversos causados en la salud de los peces por las alteraciones ambientales (por ejemplo, densidad, calidad del agua, oxígeno, salinidad, amonio, nitritos, nitratos) incrementan rápidamente el grado de estrés, sobre todo cuando los límites de la tolerancia son alcanzados o excedidos. Los efectos asociados al estrés pueden conducir rápidamente a altas mortalidades, sin embargo, muchos de estos factores están bajo control durante las prácticas de cultivo. En relación a las altas densidades de siembra o al manejo excesivo de los organismos, el estrés agudo o crónico puede producir que en el organismo se excedan los límites de la tolerancia fisiológica, lo que podría reducir rápidamente la sobrevivencia. La densidad de cultivo es uno de los estresores más importantes en un sistema de cultivo, debido a que influye en el crecimiento y la mortalidad de los organismos. Generalmente esta situación no se toma en cuenta por los productores ya que se encuentran influenciados por la implacable presión económica (Wedemeyer, 1996).

Durante la década pasada los acuicultores incrementaron su interés acerca del estudio del estrés en los peces, y muchos de ellos ahora reconocen que el manejo del estrés debe ser una parte importante para entender y poder

llevar a cabo de manera exitosa la alimentación, el control de enfermedades, la selección genética y las prácticas de cultivo. Mientras la respuesta de un pez al estrés es considerada un comportamiento adaptativo, el estrés es un problema en la acuicultura debido a sus efectos negativos en el rendimiento de los organismos, el metabolismo, el crecimiento, la resistencia a enfermedades y en su capacidad reproductiva (Stickney, 2000).

Por lo general, los organismos tienen una respuesta similar al estrés, independientemente de cuál es el factor que lo cause, ya sea; (1) el manejo de los organismos durante el cultivo (uso de redes, confinamiento durante el transporte, uso de tratamientos profilácticos, biometrías); (2) cambios en la química del agua (turbidez, pH, temperatura); o (3) factores de interacción biológica, jerarquías dominantes, entre otros (Wedemeyer, 1996), y es en éste punto donde se desarrolla el Síndrome General de Adaptación (GAS) o Ley de Selye el cual se refiere a los cambios y las manifestaciones atípicas que se producen como respuesta al estrés.

El Síndrome General de Adaptación tiene distintas etapas según la duración del agente estresor:

- Reacción inicial de alarma: La primera reacción del animal es intentar huir o enfrentar el peligro lo cual activa un amplio rango de funciones fisiológicas: 1) Activación motora, ritmo cardiaco, flujo sanguíneo hacia los órganos más activos: cerebro, corazón y músculo esquelético, 2) Flujo sanguíneo hacia las branquias y estímulo de la captación de oxígeno y 3) Aumento de la tasa metabólica. (Barandica y Tort, 2008). A nivel hormonal el eje

pituitaria-interrenal es activado liberando las hormonas catecolaminas y los corticoesteroides. Estas hormonas inician una serie de compensaciones cardiovasculares y cambios en la química sanguínea (Wedemeyer, 1996).

- Etapa de resistencia: Continúa el estrés, el animal trata de adaptarse a la nueva situación y los niveles de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) vuelven a valores normales y se libera el cortisol (Barandica y Tort, 2008). Los sistemas fisiológicos han compensado exitosamente el estado de estrés y se ha alcanzado la aclimatación. Este evento tiene un costo energético por la compensación, por lo que el crecimiento puede ser reducido (Wedemeyer, 1996).
- Estado de agotamiento: Se mantiene la situación de estrés y los niveles de cortisol durante un largo periodo y la activación del metabolismo interfiere con los demás procesos fisiológicos y pueden llegar a ser letales para el organismo (Barandica y Tort, 2008). La duración o la intensidad de los factores estresantes han excedido los límites de tolerancia. La protección que el sistema inmune podía ofrecer se encuentra dañada y pueden aparecer en los peces las enfermedades (Wedemeyer, 1996).

Los peces pueden o no seguir estas manifestaciones, por lo que se han sugerido otros marcos conceptuales para investigar las respuestas al estrés considerando los cambios compensatorios presentados por los organismos, los cuales se han dividido en respuestas primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria (Wedemeyer, 1996).

- La respuesta primaria ocurre a nivel del sistema endocrino, inmediatamente después de la percepción de un estímulo estresor, se libera corticotropina del hipotálamo, la cual estimula a la pituitaria a liberar la hormona adrenocorticotropica (ACTH). La ACTH circula a las células interrenales en la región anterior del riñón y estimula la secreción de cortisol. Así mismo, el riñón es estimulado por el sistema nervioso simpático para liberar adrenalina y otras hormonas catecolaminas.
- La respuesta secundaria se manifiesta como cambios adaptativos en la química de la sangre y en los tejidos. Por ejemplo, el incremento en la perfusión branquial, el incremento en la circulación de azúcar en la sangre (hiperglucemia) y la reducción del tiempo de coagulación. Eventualmente pueden ocurrir cambios más severos, tales como linfopenia, hemorragia del timo e hipertrofia interrenal. En la sangre se pierden electrolitos debido a la diuresis lo que podría provocar un fallo ionorregulador y el colapso del sistema circulatorio (Wedemeyer, 1996). Existe una disminución de leucocitos, proteínas musculares, glucógeno y ácidos grasos, al mismo tiempo que aumenta el lactato (Barandica y Tort, 2008).
- La respuesta terciaria se observa a nivel del organismo en la reducción del crecimiento, disminución de la resistencia inmunitaria y cambios de comportamiento reproductivo.

- La respuesta cuaternaria es cuando el estrés llega a ser crónico y su efecto acumulativo se manifiesta a nivel de población y en el ecosistema. A este nivel el reclutamiento puede disminuir provocando una reducción en el tamaño de la población y una alteración en la composición de la especie (Wedemeyer, 1996).

La respuesta del organismo a condiciones estresantes se produce en el eje adrenocortical hipotálamo-hipófisis para restablecer la homeostasis y también el control de las enfermedades (Goldstein, 1977). En los peces éste mismo eje se denomina Eje Hipotálamo-Pituitario-Interrenal (HPI) ya que los peces no poseen un glándula adrenal como tal, sino un conjunto difuso de células interrenales. Los estresores son primero percibidos por los sensores del sistema nervioso central, específicamente en el hipotálamo donde se origina y se regula al eje Hipotálamo-Pituitario-Interrenal (HPI). La primera hormona en el eje HPI de los teleósteos es la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y es liberada por las neuronas hipotalámicas. La CRH estimula la liberación de la ACTH de la pituitaria la cual induce la producción y liberación del cortisol, por las células interrenales. Las catecolaminas (cortisol) se originan en las células interrenales del riñón y activa varias respuestas cardiovasculares, respiratorias, inmunes y metabólicas dirigidas a aliviar los efectos perjudiciales asociados con los estresores agudos. El riñón de los peces es un órgano mixto compuesto por elementos hematopoyéticos, retículo-endoteliales, endócrinos y excretores que participan en la osmorregulación, hematopoyesis, metabolismo e inmunidad del organismo (Barandica y Tort, 2008).

El propósito principal de los mecanismos de defensa es localizar el problema y generar una barrera para controlarlo. En ocasiones, la enfermedad es

causada por los mecanismos de defensa propios y su supresión puede ser una ventaja si el agente externo es inofensivo para el organismo (respuestas alérgicas). Los mecanismos reguladores de los sistemas de defensa en el que se incluyen a las hormonas (corticoides), se modifican durante el estrés ocasionando la aparición de las enfermedades (Goldstein, 1977).

En los estudios donde se evalúa el efecto del estrés en los peces, se han utilizado varias respuestas ocasionadas por diversos estresores. Por ejemplo, la evaluación histopatológica que cuantifica la actividad del tejido interrenal, utilizando el diámetro nuclear, el tamaño de la célula o la cantidad de RNA celular. Sin embargo, el indicador utilizado con mayor frecuencia es la concentración de cortisol, la hormona mayormente secretada por el tejido adrenocortical (Goldstein, 1977).

El estrés, dependiendo del tiempo de duración, se clasifica en estrés agudo, en el cual el estresor tiene un tiempo de acción corto; y en estrés crónico, generado por un tiempo mayor de acción del estresor. El efecto a largo plazo del estresor incide sobre el metabolismo del organismo, debido a las altas concentraciones de cortisol presentes, resultando en una disminución en el crecimiento. Esto se debe a que los nutrientes normalmente utilizados para crecer (proteínas y ácidos grasos disminuyen) son desviados para mantener un nivel alto de azúcar en la sangre, la cual es utilizada por los tejidos para mantener la demanda en el incremento del metabolismo causado por el estresor (Rankin y Jensen, 1993).

El cortisol tiene un efecto supresor sobre el sistema inmune, dejando a los organismos expuestos a infecciones por la reducción en la producción de anticuerpos, linfocitos circulantes e interfiriendo con la producción de

linfocina, la cual es una sustancia producida por los linfocitos para regular diversas reacciones inmunológicas (Rankin y Jensen, 1993). También se puede predisponer a los peces a enfermedades debido a la disminución de la quimiotaxia, fagocitosis y producción de óxido nítrico en los leucocitos, las cuales son actividades importantes en los procesos inflamatorios (Flores, 2002). Por otro lado, los niveles bajos de estrés podrían resultar en un incremento transitorio en la concentración de cortisol plasmático, seguido por una aclimatación y un descenso del cortisol a niveles basales conforme la hormona es metabolizada por el hígado y sus metabolitos son excretados en la bilis (Rankin y Jensen, 1993).

II. ANTECEDENTES

En los peces teleósteos, se han realizado diferentes estudios donde se analiza el efecto de la densidad de cultivo sobre el crecimiento, la sobrevivencia y el comportamiento de los organismos. Por ejemplo en juveniles de salmón *Oncorhynchus kisutch*, la densidad de siembra es un factor importante en el desarrollo de los organismos debido a que a mayor densidad de siembra, el crecimiento en peso y longitud disminuye significativamente así como el factor de condición, además de que la mortalidad se incrementa. En esta misma especie se encontró que los peces pequeños mantenidos a altas densidades tenían el diámetro del núcleo de las células interrenales significativamente más grande que los peces de mayor tamaño en la misma densidad (Faguerlund *et al.*, 1981).

En el salmón Japonés (*Plecoglossus altivelis*), se encontró que el estrés producido por las altas densidades de siembra predispone a los peces a desarrollar enfermedades debido a que se debilita el sistema inmune,

además de tener una mayor concentración de cortisol en el suero (Iguchi et al., 2003).

Otra especie donde se han realizado estudios con el mismo enfoque es en el tambor rojo (*Sciaenops ocellatus*), donde se determinó que los niveles de glucosa en el plasma de los animales mantenidos en densidades altas y bajas fueron similares, sin embargo, los peces mantenidos a densidades más altas, tenían mayor concentración de cortisol, el cual retorno a los niveles iniciales después de 48 días (Robertson et al., 1987). Un estudio realizado con la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss*, menciona que la densidad de siembra no tiene un efecto negativo en el crecimiento de los organismos siempre y cuando la calidad del agua se mantenga en óptimas condiciones (Kebus et al., 1992).

En relación a las especies de peces planos, en *Solea solea* se estimó la tasa de crecimiento específico y el coeficiente de variación para un intervalo de densidad de 0.56 a 12.6 kg/m². Durante los 55 días que duro el experimento, la mortalidad incremento significativamente con el aumento en la densidad de siembra, sin embargo, el pico de producción se estimó en la densidad de 7.4 kg/m² (Schram et al., 2005). En juveniles del lenguado de invierno (*Pseudopleuronectes americanus*), se estudió el efecto de la densidad de cultivo sobre el crecimiento, la sobrevivencia y el comportamiento en cuatro diferentes densidades. Durante las 12 semanas que duró el experimento, no se encontraron diferencias en el crecimiento de los organismos. Sin embargo, conforme aumento la densidad, la sobrevivencia disminuyó, pero este efecto solo fue significativo en las densidades más altas. La cosecha final (peso por tratamiento) fue mayor en la densidad más alta (Fairchild and Huntting., 2001).

En juveniles de turbot (*Scophthalmus maximus*) se evaluó el efecto de la densidad de cultivo sobre el crecimiento durante 45 días. La densidad tuvo un efecto significativo sobre la tasa de crecimiento y el peso final de los organismos. Los peces en las densidades más altas tuvieron una tasa de crecimiento menor comparado con los que se mantuvieron a densidades más bajas. Con base en estos resultados, el crecimiento de los juveniles de turbot puede incrementarse y alcanzar pesos más homogéneos cuando se trabaja con densidades bajas (Irwin *et al.*, 1999).

Con el lenguado de California (*Paralichthys californicus*) se estudió el efecto de la densidad de siembra entre 100 y 300% de cobertura del área del tanque (CAT) sobre el crecimiento en juveniles de 11.6 gr, durante un periodo de 10 semanas. En este experimento se determinó que el crecimiento máximo de los organismos se alcanzó en la densidad de 100% CAT (Merino *et al.*, 2007). Sin embargo, con base en los crecimientos obtenidos hasta el momento en nuestro laboratorio es probable que aun a la densidad más baja evaluada en el estudio anterior (100 %), se tenga ya un efecto negativo sobre el crecimiento.

En diversas especies de peces se ha evaluado el efecto del estrés sobre su condición fisiológica. La diversidad de respuestas entre las diferentes especies a nivel de hematología y química sanguínea está ampliamente documentada (Bolasina *et al.* 2006, 1981, Flores 2002, Iguchi *et al.*, 2003, Robertson *et al.*, 1987). Por ejemplo, en el género *Paralichthys*, uno de los trabajos más recientes fue realizado en el lenguado Japonés (*P. olivaceus*) donde se evaluó el efecto de la densidad sobre el crecimiento y la

concentración de cortisol. Entre los resultados se destaca que los animales que se encontraban nadando, tenían un crecimiento en peso y longitud menor, con altas concentraciones de cortisol en comparación con los animales asentados (Bolasina *et al.*, 2006).

Selye (1939) estableció algunos índices morfológicos para evaluar el estrés. Por ejemplo en mamíferos sometidos a condiciones de estrés, observó un aumento en la glándula adrenal, atrofia de los órganos linfoides y úlceras gastrointestinales. Dichos resultados coinciden con otro estudio realizado para observar la respuesta de los peces inyectados con cortisol, revelando problemas a nivel gástrico, ya que los organismos desarrollaron atrofia de la mucosa gástrica, la cual provocó una disminución de la absorción de nutrientes, por lo tanto una menor eficiencia de conversión alimenticia y finalmente una considerable pérdida de peso (Flores, 2002). Adicionalmente, el autor observó que el cortisol era responsable de la disminución en la inmunocompetencia de los peces más estresados. El incremento de las concentraciones basales, de menos de 2 ng ml^{-1} a niveles superiores a 10 ng ml^{-1} , son suficientes para predisponer a los peces a ciertas enfermedades. Este efecto es explicado en parte, por la disminución de la quimiotaxia, fagocitosis y producción de óxido nítrico en los leucocitos, actividades importantes en los procesos inflamatorios (Flores, 2002). Los antecedentes sobre los estresores y la condición fisiológica de los organismos ponen de manifiesto que no se puede ignorar el efecto de la densidad sobre el crecimiento y otros parámetros sanguíneos en los peces cultivados.

En este trabajo se estudió el estrés producido por efecto de la densidad en juveniles del lenguado de California *Paralichthys californicus*, una especie de importancia económica en México.

III. JUSTIFICACIÓN

Con el objeto final de obtener mayores ganancias económicas, comúnmente los acuicultores se olvidan de la importancia del bienestar de los organismos bajo cultivo y las repercusiones que esto tiene en el advenimiento de enfermedades y la disminución considerable del crecimiento y la sobrevivencia. Dadas las altas densidades de siembra utilizadas en los sistemas de cultivo intensivo, no es ilógico pensar que fácilmente se exceden los límites de tolerancia fisiológica de los peces bajo estas condiciones. Con la intención de entender los efectos de la densidad de siembra en los organismos bajo cultivo y así poder determinar la densidad que resulte más favorable para el cultivo de juveniles del lenguado de California (*Paralichthys californicus*), se evaluó el efecto de la densidad de siembra utilizando el crecimiento, la sobrevivencia y el grado de estrés que los organismos desarrollaron durante el cultivo como variables de respuesta.

IV. OBJETIVOS

IV.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la densidad de siembra en juveniles del lenguado de California, *Paralichthys californicus*, utilizando el crecimiento, la supervivencia y algunos indicadores fisiológicos de estrés como variables de respuesta.

IV. 2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el crecimiento y supervivencia del lenguado de California sembrado a densidades de 25, 50, 75 y 100% de cobertura del área del tanque (CAT).
- Evaluar el grado de estrés en el lenguado de California cultivado a las diferentes densidades utilizando la concentración de glucosa y cortisol, así como el índice hepatosomático como indicadores.

V. HIPÓTESIS

La densidad de siembra superior al 75% de cobertura del área del tanque tiene un efecto negativo en la fisiología del lenguado de California, lo cual se verá reflejado en una disminución del crecimiento y la supervivencia así como un aumento en el grado de estrés.

VI. MATERIALES Y METODOS

Los juveniles de lenguado se obtuvieron de desoves naturales de reproductores mantenidos en cautiverio y cultivados en el Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos del CICESE. Los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Nutrición de Peces Marinos del Departamento de Acuicultura del CICESE en Ensenada, Baja California, México.

Se utilizaron 1122 lenguados con una talla promedio de 6.4 ± 0.97 cm de longitud y un peso promedio de 2.6 ± 0.2 g. El área total promedio del lado ciego (ATS) estimada por pez fue de 10.77 cm^2 y fue calculada según Merino *et al.* (2007):

(1)

$$\text{ATS} = 7.08 * (\text{g})^{0.6056}$$

(g) = peso del organismo

Durante 8 semanas se evaluó el crecimiento de los organismos cultivados en cuatro diferentes densidades: 25, 50, 75 y 100% de la cobertura del área del tanque (CAT).

VI.1. Sistema de cultivo

Las densidades de siembra se evaluaron en jaulas cuadradas fabricadas con malla de plástico con apertura de 4mm y con una superficie de fondo de 0.16 m^2 . Se sembraron 38, 75, 112 y 149 organismos para los tratamientos 25, 50, 75 y 100% CAT respectivamente; cada tratamiento con tres repeticiones.

Cada jaula de plástico se colocó dentro de uno de los 12 tanques de fibra de vidrio circulares de 220 L de capacidad conectados a un sistema semi-cerrado de recirculación. Dicho sistema contó con un biofiltro de cuentas de plástico de 2 ft³, de retrolavado hidráulico, el cual soportó una alimentación de hasta 908 gr de alimento por día, una lámpara de luz UV, 2 filtros de cartucho, de 5 y de 10 micras respectivamente. El agua fue recirculada a través del sistema con el empuje de una bomba eléctrica de ¼ hp. Estos tanques contaron con un flujo de agua de mar proveniente de un sistema semi-cerrado, con una tasa de recambio de 1.8 veces/hora, y se mantuvieron a una temperatura promedio de 22°C ± 0.38.

VI.2. Alimentación y mantenimiento de organismos.

La alimentación se realizó con la ayuda de alimentadores automáticos durante 12 horas. La ración de alimento inicial fue del 5% del peso corporal del organismo durante las tres primeras semanas del experimento, por medio de la observación se ajustó ésta ración hasta suministrar finalmente el 4% a partir de la semana cuatro hasta el final del experimento. El alimento que se proporcionó a los organismos fueron pellets flotantes de 1.5 mm de diámetro con un contenido proteico del 45% (Steel Head, Alimentos el Pedregal, Toluca, México).

La limpieza de los tanques se realizó cada día manualmente con la ayuda de un sifón. Los parámetros de calidad del agua que se evaluaron diariamente fueron la concentración de oxígeno, la temperatura y la salinidad, y semanalmente la concentración de amonio. Para medir la concentración de amonio se empleo un kit colorimétrico comercial (0.1 mg/L de precisión) marca Nutrafin.

VI.3. Crecimiento y supervivencia

Para evaluar la supervivencia de los organismos en las diferentes densidades, se extrajeron los peces muertos de cada uno de los tanques y se tomaron en cuenta para los resultados finales. Para evaluar el crecimiento en peso y longitud de los peces, se realizaron biometrías semanales empleando una balanza analítica marca Ohaus modelo Scout Pro con una precisión de 0.01 g y un Vernier con una precisión de 0.1 mm. Se tomaron 12 organismos de cada tanque para realizar el análisis. Una vez que se obtenían los valores de peso y talla, se calculaba la ración de alimento correspondiente a cada uno de los tratamientos. Después de cada biometría se colocaban los organismos en su respectivo tanque y se les alimentaba.

Uno de los aspectos que se evaluaron en cuanto al crecimiento de los organismos fue el Factor de Condición (K), el cual es un parámetro que indica el estado morfológico o anatómico de los peces por medio de las relaciones existentes entre la alimentación y el crecimiento del pez durante su desarrollo (Gallardo-Cabello, 1983) y se estimó utilizando la siguiente fórmula:

$$K = \frac{W * 100,000}{L^3} \quad (2)$$

Dónde:

(W) = peso en gramos

(L) = longitud en mm

VI.4. Índice Hepatosomático

Para determinar el índice hepatosomático se extrajeron 12 organismos de cada densidad y se pesaron, posteriormente a cada uno se le extrajo el hígado y se pesó en una balanza analítica marca Ohaus modelo Scout Pro con una precisión de 0.01 g. Para obtener el índice hepatosomático se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{IHS} = \frac{\text{W del hígado}}{\text{W del organismo}} * 100 \quad (3)$$

(W) = Peso en gramos

VI.5. Estrés

Para determinar el grado de estrés, al finalizar el experimento a las diferentes densidades, se extrajo una muestra de sangre de 12 organismos de cada tratamiento y se midió la concentración de glucosa y cortisol. Estos parámetros sanguíneos se compararon entre los diferentes tratamientos para evaluar si los peces estaban estresados.

VI.5.1. Cuantificación de glucosa

Para la determinación de glucosa se tomaron muestras sanguíneas de 12 organismos de cada tratamiento, mantenidos previamente en ayuno de 17 horas. La muestra se obtuvo por medio de punción directa al corazón con jeringas para insulina. La muestra obtenida se colocó cuidadosamente en viales para hematología los cuales contenían un gel de mantenimiento para separar el suero. De manera inmediata la muestra fue colocada dentro de un recipiente con hielo para su posterior envío a un laboratorio especializado en el cual utilizaron la técnica de Glucosa Oxidasa.

VI.5.2. Cuantificación de cortisol

Para la determinación del cortisol se extrajo una muestra de sangre de 12 peces de cada tratamiento. Estas muestras se colocaron dentro de viales para hematología, los cuales a su vez, se colocaron dentro de una centrífuga para obtener el suero de la muestra. Una vez separado el suero (100 µL), se mantuvo en congelación a - 40°C para su posterior análisis, el cual se realizó con un Kit para determinar cortisol mediante la prueba de ELISA (Cortisol ELISA Kit, Neogen Corporation. C.N. 402710, USA).

La técnica de ELISA (Enzyme-Link InmunoSorbent Assay) se basa en la detección de un [antígeno](#) inmovilizado sobre una fase sólida mediante [anticuerpos](#) que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente. Los ensayos inmunológicos son procedimientos en los cuales se utilizan anticuerpos como reactivos enlazantes específicos y

tienen aplicación universal para la determinación o cuantificación de fármacos terapéuticos y no terapéuticos, diversas sustancias biológicas, sustancias infecciosas o anticuerpos de respuesta del huésped en el suero, en la orina, en el líquido cefalorraquídeo, en saliva y en cualquier líquido biológico donde se encuentre la sustancia a investigar (Guzmán-Vázquez, 2004).

Para ésta investigación, la prueba de ELISA se basa en el principio de la competencia entre el conjugado de cortisol del Kit y el cortisol en la muestra por un número limitado de sitios de unión del anticuerpo.

Una cantidad de muestra o la solución estándar es colocada en la micro placa, posteriormente el conjugado de la enzima es añadido y la mezcla es agitada e incubada a temperatura ambiente durante una hora. Durante la incubación se lleva a cabo la competencia por los sitios de unión y posteriormente la micro placa es lavada con el buffer para lavado removiendo todo el material no unido al anticuerpo. El conjugado de enzimas unidas es detectado por la adición del sustrato el cual genera el color después de 30 minutos. La prueba cuantitativa puede ser obtenida midiendo y comparando la absorbancia leída de las celdillas de las muestras contra el estándar. La intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la cantidad de Cortisol en la muestra o en los estándares. La ausencia de cortisol en la muestra podría resultar en un color azul brillante, mientras que la presencia de Cortisol resulta en el decremento o la ausencia en el desarrollo de color.

VI.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de longitud, peso, índice hepatosomático y glucosa se efectuaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. En la prueba de ANOVA del índice hepatosomático se encontraron diferencias significativas por lo que se efectuó la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey. Se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) para saber si en algún momento del cultivo, las curvas de crecimiento de los organismos fueron diferentes.

VII. RESULTADOS

VII.1. CRECIMIENTO

El crecimiento de los organismos se cuantificó en relación a la ganancia de peso y longitud. La ganancia de peso varió dependiendo de la densidad en la que los organismos se encontraban. Los peces del tratamiento de 25% CAT fueron los que obtuvieron menor ganancia en peso (10.59 g) con respecto a los otros tratamientos, mientras que los organismos del tratamiento de 75% CAT tuvieron la mayor ganancia en peso al final del experimento (Tabla I). El ATS es un valor que corresponde al área de cada organismo, por lo tanto mientras más grande es el valor que describe el ATS, mayor es el área o tamaño del organismo. En esta investigación, los organismos que obtuvieron el menor valor en el ATS fueron los del tratamiento de 25% CAT (33.61 cm²), y los animales más grandes con el mayor ATS fueron los del tratamiento 75% CAT (37.03 cm²) (Tabla I).

El incremento del CAT final fue mayor en el tratamiento con la densidad de 75% CAT con un valor de 324.53%, mientras que el tratamiento con el menor incremento fue la densidad de 25% CAT con 266.4% (Tabla I). La sobrevivencia fue similar en los tratamientos con CAT del 50, 75 y 100% con valores entre 93 y 94%, mientras que en el tratamiento con 25% CAT la sobrevivencia fue de 84.21%, sin embargo, estadísticamente no existen diferencias significativas entre ellas ($P= 0.79$) (Tabla I). En relación a la biomasa final, los mejores valores se encontraron en los tratamientos con el CAT más alto (75% y 100%) (Tabla I).

Tabla I. Resultados de los parámetros evaluados durante 8 semanas de experimento.

	25%	50%	75%	100%
PESO INICIAL PROMEDIO (g)	2.8 ± 1.26	3.5 ± 1.40	3.1 ± 1.03	3.4 ± 1.35
PESO FINAL PROMEDIO (g)	13.39 ± 3.76	15.01 ± 4.89	16.48 ± 5.03	16.15 ± 4.69
INCREMENTO EN PESO (g)	10.59 ± 3.13	11.52 ± 2.77	13.39 ± 2.29	12.76 ± 4.66
ATS INICIAL (cm ²)	10.77 ± 0.91	10.77 ± 0.20	10.77 ± 0.53	10.77 ± 0.47
ATS FINAL (cm ²)	33.61 ± 5.07	34.58 ± 3.49	37.03 ± 1.01	34.12 ± 1.52
CAT INICIAL (%)	25.0	50.5	75.4	100.3
CAT FINAL (%)	66.60 ± 4.84	152.07 ± 30.58	244.72 ± 13.19	300.71 ± 13.43
INCREMENTO CAT (%)	266.4	301.1	324.5	299.7
% SOBREVIVENCIA	84.21 ± 7.89	93.33 ± 9.42	94.34 ± 2.57	94.6 ± 0
BIOMASA/TRATAMIENTO (g)	416.22 ± 68.07	971.365 ± 257.50	1625.82 ± 116.94	1893.58 ± 139.83
FACTOR DE CONDICIÓN	0.99	1.07	1.07	1.01

VII.2. LONGITUD

En la biometría final los organismos que alcanzaron las mayores longitudes fueron los del tratamiento de 100% CAT con 116.82 ± 11.35 mm. Los peces del tratamiento que tuvieron el menor crecimiento en longitud fueron los del tratamiento de 25% CAT con 110.7 ± 10.40 mm. El análisis de varianza muestra que no existen diferencias significativas ($P = 0.7943$) en la longitud de los peces entre los diferentes tratamientos (Fig. 1).

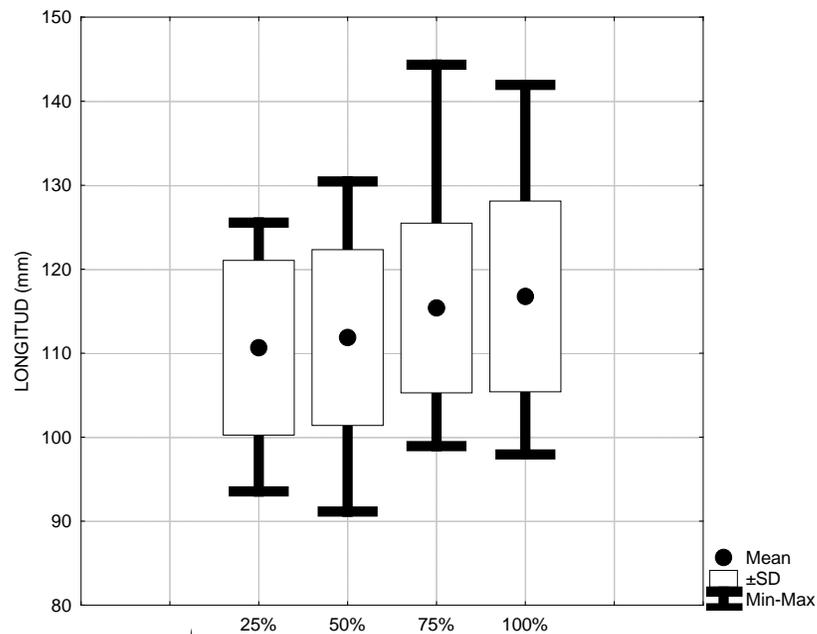


Figura 1. Longitud total final de *Paralichthys californicus* mantenidos en las diferentes densidades.

VII.3. PESO

Los organismos expuestos al tratamiento de 75% CAT, alcanzaron los mayores pesos finales con 16.48 ± 5.03 g en comparación con los tratamientos de CAT 25, 50 y 100%. Los organismos con menor ganancia en peso fueron aquellos expuestos al tratamiento de 25% CAT y 50% CAT con 13.39 ± 3.76 y 15.01 ± 4.89 g respectivamente. En el análisis de varianza efectuado para el peso se observa que no existen diferencias significativas ($P = 0.6605$) entre ninguno de los tratamientos (Fig. 2).

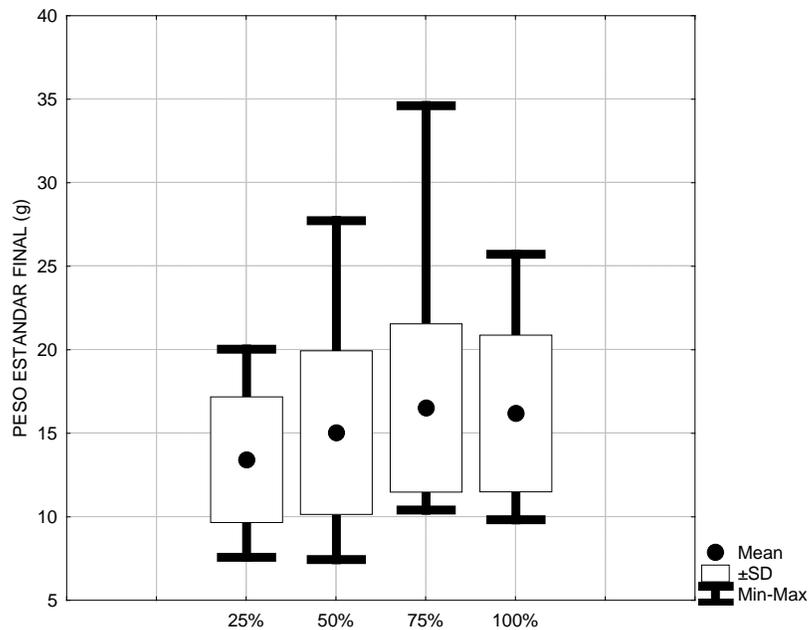


Figura 2. Peso total final de *Paralichthys californicus* mantenidos en las diferentes densidades

El análisis ANCOVA se realizó para saber si en algún momento del cultivo, las curvas de crecimiento de los organismos fueron diferentes. Dicho análisis debe cumplir dos supuestos: a) la Covariante *Tiempo* debe estar correlacionada con la variable dependiente *Crecimiento*, b) y no interactuar con la variable independiente *Densidad*. Los datos cumplen con estos supuestos (Tabla II).

Tabla II. Análisis de Covarianza realizado a los datos de crecimiento en peso de *Paralichthys californicus* cultivado en diferentes densidades.

	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Intercept	58.71	1.00	58.71	85.33	0.000
Densidad	0.70	1.00	0.70	1.02	0.314
Tiempo	1245.78	1.00	1245.78	1810.60	0.000
Densidad*Tiempo	2.25	1.00	2.25	3.28	0.073
Error	66.05	96.00	0.68		

En la Tabla II se observa que la Covariante *Tiempo* está relacionada con la variable dependiente *Crecimiento* ($P= 0.000$) y no existe interacción con la variable independiente *Densidad* ($P= 0.073$). En la Fig. 3 se observa el efecto de la densidad sobre el crecimiento de los organismos en el tiempo. La distancia entre las rectas de regresión (Tabla III) indica que a mayor distancia, mayor es el efecto de la densidad sobre el crecimiento de los organismos. En la gráfica se observa que las distancias entre las rectas son similares, por lo tanto, el efecto de la densidad en el crecimiento de los organismos es similar en todos los tratamientos ($P= 0.314$).

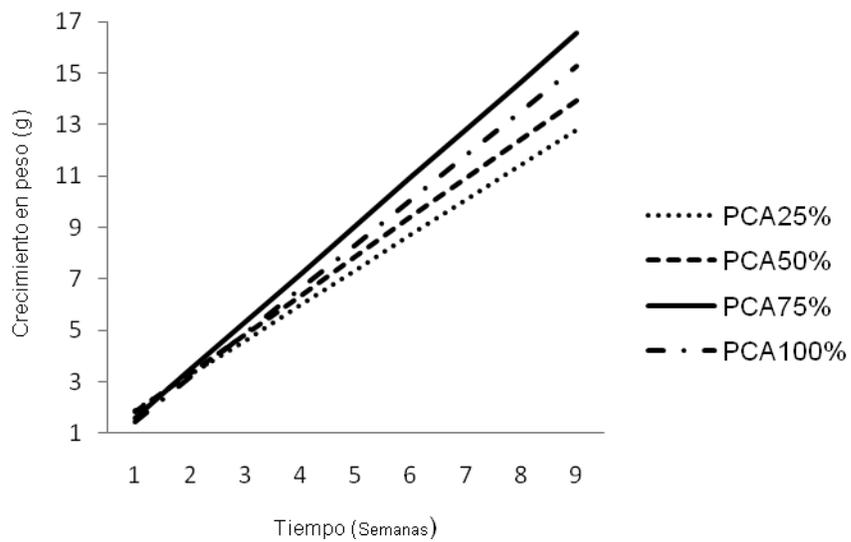


Figura 3. Tendencia del crecimiento de *Paralichthys californicus* mantenido bajo diferentes condiciones de densidad de cultivo.

Tabla III. Valores de las regresiones lineales efectuadas al peso y longitud de *Paralichthys californicus* cultivado en diferentes densidades.

Densidad	Peso				Longitud			
	α	β	P	R ²	α	β	P	R ²
25%	1.36	1.90	0.00	0.73	64.52	5.62	0.00	0.81
50%	1.84	1.51	0.00	0.91	65.03	5.98	0.00	0.94
75%	1.61	1.87	0.00	0.94	64.51	6.85	0.00	0.95
100%	1.42	1.73	0.00	0.91	63.06	6.88	0.00	0.94

VII.4. INDICE HEPATOSOMATICO

Los valores estimados para el índice hepatosomático indican que los organismos mantenidos en los tratamientos con las densidades de 75% y 100% CAT tienen el valor más bajo (1.9 ± 0.3) con respecto a los peces de las densidades de 50% (2 ± 0.5) y 25% (2.5 ± 0.8) (Fig. 3). En éste análisis se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.016$) por lo que se tuvo que realizar la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey (Fig. 4).

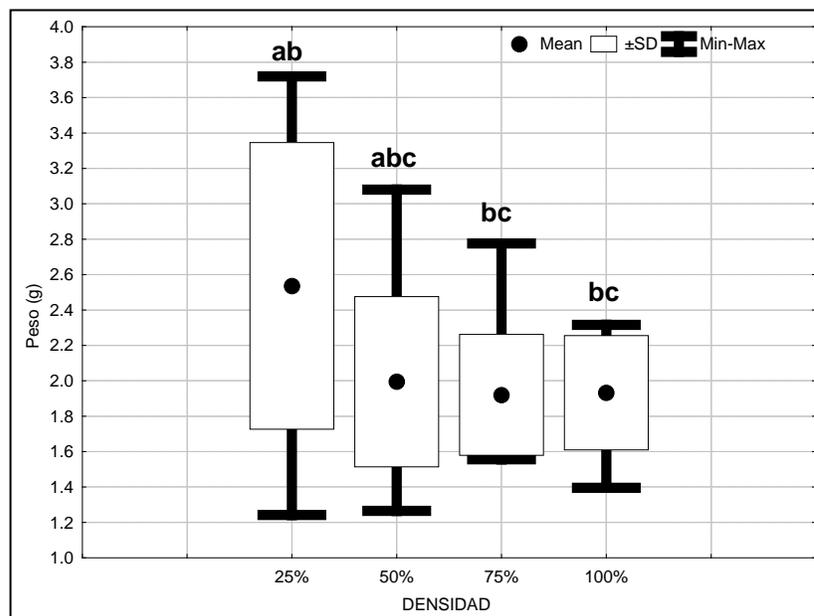


Figura 4. Índice hepatosomático de *Paralichthys californicus* mantenidos en las diferentes densidades.

VII.5. GLUCOSA

Los niveles más bajos de glucosa en la sangre de los organismos se obtuvieron en el tratamiento de 75% CAT con una concentración de 31.6 ± 8.6 mg/100 ml, mientras que los peces del tratamiento con 100% CAT tienen la mayor concentración de glucosa con 55 ± 23.6 mg/100 ml (Fig. 5). Estadísticamente se encontraron diferencias significativas ($P = 0.001$) entre las densidades de 75% CAT con respecto a 25% y 100% CAT.

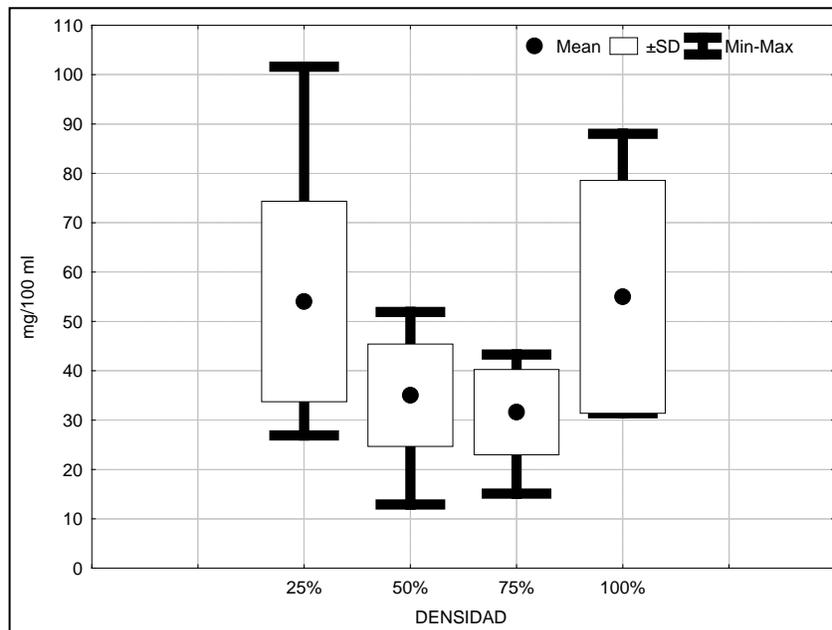


Figura 5. Concentración de glucosa en sangre de *Paralichthys californicus* mantenidos en las diferentes densidades.

VII.6. CORTISOL

Las concentraciones de Cortisol sanguíneo se expresan normalmente en ng/ml, sin embargo, en este estudio se expresan en Promedios de Absorbancia, debido a problemas técnicos. No obstante, cuando se reporta en absorbancia a menor valor, la concentración de cortisol es mayor. En esta investigación se encontró que los organismos del tratamiento de 25% CAT tienen una concentración mayor de cortisol que los organismos del tratamiento de 100% CAT (Fig. 6).

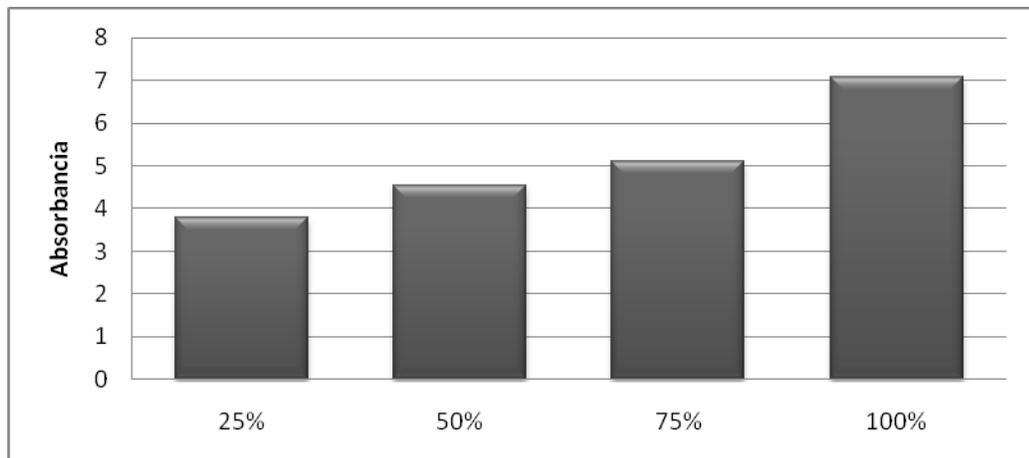


Figura 6. Cuantificación de la concentración de cortisol en la sangre de *Paralichthys californicus* cultivado durante 8 semanas en diferentes densidades (25%, 50%, 75% y 100% CAT. La concentración se expresa como absorbancia.

VII.7. CALIDAD DEL AGUA

Durante el periodo que duró el experimento se obtuvieron los valores de los siguientes parámetros de la calidad del agua:

Tabla IV. Medias y desviación estándar de la calidad del agua mantenida en las cuatro densidades de cultivo de *Paralichthys californicus*. Oxígeno (O²), salinidad (‰), temperatura (T°) y nitrógeno amoniacal total (NAT).

	O ²	‰	T°	NAT
Media ± Dev. Est.	4.04 ± 0.316	32.30 ± 0.383	22.42 ± 0.3891	0.25 ± 0

Debido a que cada estanque manejó diferente densidad de siembra, se tuvo el cuidado para que todos y cada uno de los tanques mantuviera condiciones similares en la calidad del agua. Todo esto se logró gracias a que cada estanque contó con diferentes válvulas para regular la cantidad de oxígeno, el flujo de agua entrante y la saliente, además de que se controló la concentración de oxígeno y de amonio.

VII.8. FACTOR DE CONDICION

En el factor de condición de *P. californicus* cultivados a diferentes densidades se encontraron valores entre .99 y 1.07 (Tabla 2). Estadísticamente no existen diferencias significativas entre los tratamientos (P= 0.59).

VIII. DISCUSION

VIII.1. Crecimiento

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la densidad de cultivo del lenguado de California *Paralichthys californicus* sobre su crecimiento, la concentración de glucosa y cortisol, así como el índice hepatosomático. Algunas de las respuestas se utilizaron para establecer el grado de estrés de los peces durante las 8 semanas del cultivo en el laboratorio.

Fairchild y Huntting (2001) sugieren que las altas densidades de cultivo producen tasas bajas de crecimiento. Sin embargo, en el lenguado *Hippoglossus hippoglossus* cultivado en estanques circulares, se estimó que la densidad de siembra óptima se encuentra entre 100 y 200% de cobertura (Bjornsson, 1994). Howell (1998) menciona que el crecimiento de *Solea solea* disminuye con el incremento de la densidad debido al incremento de la competencia por el alimento. Así mismo, los estudios realizados con la Solla Roja (*Pseudopleuronectes americanus*) indican que esta especie puede ser cultivada en densidades altas de 200% y posiblemente 300% sin afectar el crecimiento, sin embargo, a estas densidades los peces pueden estar más estresados y por lo tanto incrementar el riesgo de infecciones (Fairchild y Huntting, 2001).

En el presente estudio, los peces cultivados en las densidades de 75% y 100% CAT, tuvieron un crecimiento mayor comparado con los tratamientos de menor densidad (25 y 50% CAT). Otros estudios han reportado resultados similares, por ejemplo, Fairchild y Huntting (2001) con la Solla Roja (*Pseudopleuronectes americanus*) y Bolasina et al. (2006) con *Paralichthys*

olivaceus, destacaron que el peso de los organismos al final del experimento fue mayor conforme aumentó la densidad de cultivo. El crecimiento de los juveniles del lenguado de invierno no fue significativamente diferente entre los tratamientos, lo cual indica que no hay un efecto entre las densidades de cultivo, de 50 a 300% de cobertura, sobre el crecimiento (Fairchild y Huntting, 2001).

Estudios como los anteriores mencionan que el efecto de la densidad de siembra en peces, muestra una relación inversa en el crecimiento a lo que normalmente sucede en diversas especies, es decir, que hay un efecto positivo de la densidad sobre el crecimiento de los organismos (Bjornsson, 1994). El impacto positivo de la densidad de siembra sobre el crecimiento se atribuye al incremento de las interacciones sociales entre los individuos (Papst et al. 1992).

La tolerancia de algunas especies de peces planos a las densidades altas de cultivo podría estar relacionada con su hábitat bentónico, con la baja actividad que tienen y con los bajos requerimientos de oxígeno (Jones et al., 1981). Los juveniles de *P. californicus* en su hábitat natural (principalmente en las bahías) refleja una preferencia por las densidades altas al congregarse un mayor número de organismos, lo que se considera como el ambiente óptimo (Kramer, 1990). Álvarez et al. (2005) demostraron que las altas densidades de *Paralichthys olivaceus* favorecen su crecimiento en peso.

En la presente investigación con el lenguado de California, los peces expuestos a la densidad 25% CAT tuvieron el menor incremento en peso, lo cual podría explicarse por el efecto de las hormonas corticoesteroides

(cortisol) junto con las hormonas catabolizadoras de la gluconeogénesis, que ocasionan la reducción del crecimiento y la resistencia a enfermedades cuando el estrés es permanente (Wedemeyer *et al.*, 1990). Dicho efecto puede deberse a que el cortisol tiene actividad proteolítica en músculo blanco y tal vez en el hígado, interfiere en los centros neurales de saciedad, disminuye la absorción de nutrientes por el intestino y el número de receptores celulares para la hormona del crecimiento (Mommensen *et al.* 1999).

El trabajo de Irwin *et al.* (1999) con el *Scophthalmus maximus* menciona que el cultivo realizado a altas densidades puede intervenir en la interacción entre individuos y de ese modo afectar la ganancia en biomasa ya sea de manera positiva o negativa. Dicho estudio nos revela lo sucedido con los resultados obtenidos con el lenguado de California los cuales demuestran que en las densidades de 75 y 100% CAT se obtuvieron las mayores biomásas de $1625.82 \pm 11\text{g}$ y $1893.58 \pm 13\text{g}$, respectivamente.

Cuando el crecimiento de los subordinados (los peces de menor tamaño) es afectado de manera negativa por los organismos dominantes, debido al número, espacio o la talla de los individuos, la diferencia de tallas entre los miembros de la población usualmente se incrementa y comienza a presentarse un comportamiento agresivo de canibalismo (Álvarez, 2005). Probablemente este comportamiento es una estrategia adaptativa para optimizar la sobrevivencia en un espacio restringido (Volpato *et al.*, 1994). En el presente trabajo, no se observó ningún comportamiento agresivo durante el día, ni al momento de la alimentación, e incluso los organismos de menor tamaño (aproximadamente el 3.35% en la densidad del 100%), se alimentaban al mismo tiempo que los peces más grandes.

Los juveniles del lenguado *Hipoglossus hipoglossus* cultivados en densidades bajas, comúnmente se colocan uno sobre otro formando un "parche" o "parches" en el fondo del tanque. Conforme la densidad se incrementa los parches crecen hasta cubrir el fondo del tanque (Björnsson, 1994). Se puede mencionar un comportamiento similar en el lenguado de California para las densidades de 25% y 50% de cobertura, donde el espacio entre los individuos era mayor al inicio del experimento, lo cual enfatiza el comportamiento observado por Kramer (1990) en el medio natural, donde la interacción entre los individuos y las altas densidades favorece el crecimiento de los organismos, por lo tanto se podrían considerar como las condiciones óptimas para ésta especie.

Los organismos en cultivo se pueden ver afectados por la calidad del agua, siendo posible que en fondo del tanque donde normalmente se encuentran los peces, el agua se deteriore con el incremento del número de organismos, limitando el suficiente recambio tanto de oxígeno como de agua. Por ejemplo, un pez colocado en la parte más baja de la pila o del "parche" puede estar expuesto a una concentración de oxígeno más baja. Si la concentración de oxígeno cae por debajo de cierto nivel, el organismo puede dejar el fondo en busca de agua oxigenada cerca de la superficie, por lo que se puede pensar que la actividad de nadar puede ser más constante con el incremento de la densidad de cultivo, si no existe un buen intercambio de gases (Björnsson, 1994). Teniendo en cuenta este comportamiento y con los valores registrados durante el periodo experimental, se puede llegar a la conclusión que la calidad del agua (oxígeno, salinidad, temperatura y amonio) del sistema donde se cultivaron los organismos, se mantuvo en condiciones adecuadas para el cultivo de

esta especie (Conklin *et al.*, 2003) ya que en ningún momento se observó a los organismos nadando en la columna de agua. Los tanques contaban con un flujo continuo y circular que abarcaba toda la columna de agua (de una profundidad no mayor a 15 cm), donde no existieron áreas con concentraciones bajas de oxígeno. El Lengüado de California (*Paralichthys californicus*) selecciona áreas de crianza en aguas someras y protegidas como el de las bahías y/o esteros, sugiriendo que estos hábitat presentan un gran potencial para el bienestar de la especie aumentando las oportunidades de encontrar alimento y crecer mejor, así como disminuir el riesgo de mortalidad por depredación (Kramer, 1990). Con estas observaciones y con los resultados obtenidos en ésta investigación se puede mencionar la capacidad de éstos organismos para desarrollarse en columnas de agua poco profundas.

VIII.2. Sobrevivencia

La densidad de siembra es un factor que puede tener un efecto positivo o negativo en la sobrevivencia de los organismos bajo cultivo. Por ejemplo, en el lengüado de invierno (*P. americanus*), cultivado en cuatro densidades diferentes (50, 100, 200 y 300 % CAT), la sobrevivencia disminuyó conforme aumento la densidad (Fairchild y Huntting, 2001). Así mismo, la vulnerabilidad a las enfermedades y la mayor tasa de mortalidad se presentó en las densidades más altas (200 y 300% CAT). En el Sol Europeo (*Solea solea*), la tendencia fue similar, es decir, a mayor densidad la mortalidad incrementó (Schram *et al.*, 2005). Estos resultados indican que estas especies son poco tolerantes al cultivo a densidades altas, ya que los peces se estresan en estas condiciones, alterando su homeostasis y como

consecuencia reduciendo su capacidad inmune y su sobrevivencia. En contraste, en el lenguado de California la tendencia fue inversa, es decir, el porcentaje de sobrevivencia aumentó conforme aumentó la densidad del cultivo, ya que en la densidad de 25% CAT fue de 84.21% mientras que en las densidades de 75 y 100% CAT fue de 94.34 y 94.63% respectivamente. Esto sugiere que *P. Californicus* puede ser cultivado en densidades relativamente altas (i.e., entre 75 y 100% CAT), mejorando la sobrevivencia de los organismos conforme la densidad se incrementa y por lo tanto la producción total final. Esto podría explicarse nuevamente por la preferencia de la especie de permanecer en áreas con mayor densidad en el medio natural, la cual podrían ser consideradas como óptimas para su desarrollo.

VIII.3. Cortisol

En la típica respuesta de los organismos, el estresor induce la activación de los ejes hormonales simpático-cromafín o hipotálamo-pituitaria-interrenal ocasionando cambios a diferentes niveles desde bioquímicos hasta fisiológicos, así como en el sistema inmune, ya sea actuando como activadores o como supresores de este (Tort, 1996).

Un parámetro considerado buen indicador de estrés en organismos bajo condiciones de cultivo es el cortisol, el cual es el principal corticoesteroide de los teleósteos y el cambio en las concentraciones plasmáticas indican la activación de la respuesta neuroendocrina al estrés.

Los valores pueden incrementar más de 100 ng/ml bajo situaciones de estrés agudo y retornar a valores cercanos a los normales de 10-20 ng/ml,

aunque el estresor persista (Pickering, 1981). La relación del cortisol con el crecimiento de los organismos ha originado diferentes puntos de vista. Pickering y Duston (1983) indicaron que el cortisol suministrado en el alimento o en implantes, reduce el crecimiento y el factor de condición de los peces. Sin embargo, Pickering y Stewart (1984) sugieren que la reducción en el crecimiento, puede no estar directamente mediada por los corticoesteroides, sino por la reducción en la ingesta de alimento o por la disminución de la eficiencia en la asimilación del alimento, producto de la interacción social ocasionada por el hacinamiento. En la presente investigación, los resultados de crecimiento de los peces no coinciden con lo reportado por Pickering y Stewart (1984) debido a que el tratamiento que tuvo la menor tasa de crecimiento fue el de menor densidad, por lo tanto no existía un comportamiento jerárquico que favoreciera la mayor o la menor ingesta de alimento que pudiera afectar el crecimiento de los organismos; en adición a esto se puede mencionar que se observó un mejor comportamiento alimenticio en las densidades más altas de 75% y 100% CAT en comparación con las densidades más bajas de 25% y 50% CAT, ya que en éstos tratamientos de menor densidad se observó alimento desperdiciado en el fondo de los tanques, a diferencia de los tratamientos de mayor densidad dónde no había alimento en el fondo de los tanques.

Bolasina *et al.* (2006) estudiaron el efecto del hacinamiento sobre el comportamiento de *P. olivaceus*. La concentración de cortisol en los peces que denominaron subordinados en el día cero de experimentación era considerablemente elevada comparada con aquellos organismos dominantes. Cuatro días después de haber transferido a los subordinados a condiciones de menor densidad y sin la presencia de los dominantes, los niveles de cortisol disminuyeron incluso más que al inicio del experimento,

su coloración cambio y su crecimiento en longitud también se vio favorecido. Sus resultados demostraron que la falta de espacio para asentarse causa importantes incrementos en el nivel de cortisol en los tejidos, lo que indicó que existía estrés agudo por interacción social. Sin embargo, en el presente trabajo con el lenguado de California, el comportamiento observado no coincide con las observaciones de Bolasina *et al.* (2006), es decir, las densidades más elevadas resultaron más favorables para el crecimiento y bienestar fisiológico de los organismos, indicado por las bajas concentraciones de cortisol encontradas en los peces.

La duración del experimento fue de 8 semanas por lo tanto se considera que el estrés en los organismos es crónico. Davis *et al.* (1985) concluyeron que durante el estrés crónico, la glucosa almacenada en el hígado se agota rápidamente y el incremento de corticoesteroides (cortisol) en el plasma, inducen la gluconeogénesis resultando en una disminución en el crecimiento, debido a que se produce el catabolismo de proteínas para sintetizar más glucosa como fuente de energía metabólica. Es probable que para el lenguado de California cultivado a bajas densidades se haya presentado este fenómeno ya que se observaron menores tasas de crecimiento, una de las mayores concentraciones de glucosa en sangre y mayor concentración de cortisol en sangre. Con esta información se puede concluir que los peces de las densidades más altas estuvieron menos estresados lo que no afectó de manera importante su crecimiento y sobrevivencia comparado con los tratamientos con menor densidad de organismos cuyas concentraciones de cortisol fueron más elevadas.

VIII.4. Glucosa

Otro de los parámetros más utilizados en el estudio del estrés son los cambios en la concentración de glucosa plasmática. La hiperglucemia observada durante el estrés es resultado de la glucogenólisis y gluconeogénesis, estando implicados en este efecto tanto las catecolaminas como el cortisol (Flores, 2002). Estos niveles elevados de glucosa en la sangre son generados principalmente para proveer la energía metabólica para un sin número de reacciones metabólicas y procesos fisiológicos en respuesta a la condición estresante. La glucosa aumenta lentamente y permanece elevada por períodos más prolongados que el cortisol (Schreck, 1981).

En la presente investigación, la concentración de glucosa en la sangre de los lenguados se mantuvo en niveles más elevados en los tratamientos de 25 y 100% CAT. Si tomamos al nivel de glucosa en la sangre como un buen indicador del estrés de los organismos, podríamos utilizar estos resultados como guía para establecer la densidad mínima y máxima de siembra adecuada para el lenguado de California. Por ejemplo, en el caso de las bajas densidades (25% CAT) el estrés experimentado por los peces se puede deber a la baja densidad, hecho que Kramer (1990) mencionó como una condición no óptima para esta especie y los mecanismos de acción que producen ésta respuesta son los mencionados por Schreck (1981) donde describe que los niveles elevados de glucosa en sangre son generados para proveer energía metabólica para los procesos de respuesta al estrés. En cuanto a las altas densidades (100% CAT), se podría pensar que los niveles óptimos en la siembra están excedidos, causando condiciones de estrés. Uno de los mecanismos de acción de respuesta al

estrés es el incremento de la glucosa en la sangre debida a la acción de la epinefrina. La fuente primaria de glucosa en la sangre, es el glicógeno almacenado en el hígado y el músculo. La utilización del glicógeno para producir glucosa, reduce las reservas de energía disponibles en el organismo y puede reducir el crecimiento. Unido a éste concepto, pueden existir casos en los cuales los niveles elevados de glucosa en la sangre son alterados por la acción del cortisol, ya que estimula la gluconeogénesis en el hígado y puede modificar la acción de otras hormonas glucémicas (Wedemeyer *et al.*, 1990). Por otro lado el alcance y la dinámica de la respuesta al estrés puede ser fuertemente influenciada por el estado de desarrollo del animal, la gravedad y la duración del estresor, entre otros factores, por ejemplo los factores de la respuesta primaria y secundaria al estrés, pueden manifestar diferentes patrones entre peces maduros o inmaduros expuestos a algún estrés generalizado (Barandica y Tort, 2008)

VIII.5. Índice Hepatosomático

Algunos estudios han utilizado el índice hepatosomático para evaluar el efecto de la densidad de cultivo (Montero *et al.*, 1999, 2001). Por lo general, cada órgano de un organismo representa un porcentaje más o menos fijo del peso total del pez, independiente de su tamaño. Sin embargo, dependiendo de la especie y de las características nutricionales del alimento, los altos niveles de carbohidratos y/o lípidos son los responsables de modificar el tamaño del hígado (Shearer, 1994).

En el presente trabajo, la densidad de siembra tuvo un efecto sobre el índice hepatosomático de los organismos, con el valor más alto y la mayor variabilidad en la densidad más baja (25% CAT) con un valor estimado de 2.54 ± 0.81 .

En un estudio realizado por Montero *et al.* (2001) se menciona que las altas densidades de cultivo producen una disminución en el peso del hígado y por consiguiente un menor índice hepatosomático, fenómeno que ha sido asociado con una mayor utilización de los lípidos contenidos en este órgano. En el lenguado de California se obtuvo una respuesta similar al trabajo mencionado anteriormente, donde la menor densidad de siembra es la que tuvo el mayor índice hepatosomático (2.54) a diferencia de los tratamientos de 50, 75 y 100% de cobertura. Dichos resultados indican que en los tratamientos con menor densidad, los organismos desarrollan mayor estrés. Como se ha mencionado con anterioridad, dicho efecto se cree que está relacionado con la afinidad de la especie a las densidades altas, las cuales ofrecen un ambiente menos estresante.

En condiciones de estrés crónico, el cortisol promueve la actividad de la enzima glucógeno sintetasa, aumentando la deposición de glucógeno en el hígado y no su disminución, lo cual puede ser detectado con el análisis de índices somáticos, tal como el índice hepatosomático (Pereira *et al.*, 1995). Con base en este razonamiento, se sugiere que los lenguados de la especie *P. californicus* mantenidos en densidades más bajas, tienen mayores niveles de estrés crónico (favoreciendo la liberación de cortisol) desencadenando una mayor síntesis de glucógeno, a partir de otros nutrientes, y que se deposita en el hígado. Como consecuencia el hígado aumentó de peso y se obtuvo un mayor índice hepatosomático (c.a., 2.54)

en los peces cultivados a 25% CAT. Similarmente, en la trucha *Salvelinus fontinalis*, la movilización de triglicéridos compensa el incremento en la demanda de energía asociada con el estrés ocasionado por el incremento de la densidad de siembra, lo que sugiere un aumento de la capacidad gluconeogénica del organismo (Vijayan *et al.*, 1990).

Los resultados de las investigaciones que han evaluado el efecto del estrés sobre el índice hepatosomático son contradictorios. Por ejemplo, un estudio realizado con la trucha arcoíris, donde se buscaba explicar la posible interacción de las condiciones de cultivo (densidad de siembra) y la dieta (aporte de las vitaminas E, C y de los ácidos grasos polinsaturados, HUFAs por sus siglas en inglés), utilizando el IHS como variable de respuesta, mostró que la densidad más alta solo tenía efecto negativo en las dietas que tenían altos contenidos de vitamina E, incrementando el tamaño del hígado. También se observó que las altas densidades afectaron el metabolismo de los lípidos, incluyendo el índice hepatosomático. (Trenzado *et al.*, 2000).

Por el contrario, Barton *et al.* (1987) mencionaron que en un grupo experimental de trucha arcoíris (alimentado con cortisol) y en un grupo de organismos expuestos a un manejo elevado de estrés, después de la semana 10 de cultivo, el glucógeno del hígado y el índice hepatosomático resultaron reducidos, este resultado es inusual, ya que investigaciones previas muestran incrementos en el glucógeno después del tratamiento con cortisol o en peces con elevadas concentraciones de cortisol endógeno (Lidman *et al.*, 1979). Sin embargo, el bajo contenido de glucógeno hepático, observado en los peces alimentados con cortisol, puede ser resultado de un incremento crónico de la tasa metabólica. Estos

reportes sugieren que existen diferencias en el efecto del cortisol sobre el metabolismo de los carbohidratos, y que posiblemente varía, dependiendo del estado fisiológico del pez, de las dosis de cortisol utilizadas o de la interacción del cortisol con otras hormonas glucorreguladoras (Barton et al., 1987).

La relevancia de ésta investigación radica en que las diferentes densidades utilizadas y evaluadas con respuestas fisiológicas específicas permitieron inferir la condición óptima para el cultivo del lenguado de California *Paralichthys californicus*.

IX. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en la presente investigación se puede concluir lo siguiente:

- La densidad de siembra es un factor de vital importancia en los centros de producción de lenguado de California *Paralichthys californicus*.
- Aunque estadísticamente no existen diferencias significativas en el crecimiento de *Paralichthys californicus* entre los tratamientos, existe una tendencia a un mejor crecimiento en la densidad de 75% de CAT, en la cual se tuvieron los peces de mayor tamaño en peso.
- Los peces del tratamiento con 75% de CAT desarrollaron el mayor ATS final, lo cual indica que son los organismos de mayor tamaño.

- En relación al CAT, 75% es el tratamiento en el cual la cobertura tuvo su mayor incremento con 324.4%.
- La sobrevivencia más alta es similar en 75% y 100% de CAT. Es de gran importancia enfatizar que son las dos densidades más altas las que tienen los mejores registros en éste parámetro.
- El cortisol, mostró una tendencia creciente con las densidades más bajas, por lo tanto, las densidades más altas exhiben el menor grado de estrés en los organismos, lo cual se traduce en un mejor crecimiento.
- La glucosa analizada en los organismos mantenidos en este estudio revela que 75% de CAT presenta el valor más bajo, por lo tanto el menor grado de estrés.
- Con los valores obtenidos en el análisis del Índice Hepatosomático se puede afirmar que las densidades de 75% y 100% de CAT son las que tienen los valores más bajos, por lo tanto el menor grado de estrés.

X. APÉNDICE

X.1. OBTENCION DE LA CURVA ESTANDAR

Para realizar la curva estándar y determinar la concentración de cortisol se siguió el siguiente procedimiento:

1.- Preparación de soluciones estándar:

SOLUCIÓN ESTANDAR	PREPARACION
A	Colocar 1 µg/ml de la solución stock (agua deionizada)
B	Tomar 20 µL de A y adicionar 980 µL de buffer EIA y mezclar
C	Tomar 200 µL de B y adicionar 1.8 mL de buffer EIA y mezclar
D	Tomar 200 µL de C y adicionar 1.8 mL de buffer EIA y mezclar

En 8 tubos de ensayo se prepararon diferentes estándares agregando las soluciones estándar de la siguiente manera:

ESTANDARES	ng/mL	Buffer EIA (μL)	ESTANDAR B (μ)	ESTANDAR C (μ)	ESTANDAR D (μ)
S₀	0	Como está	-	-	-
S₁	0.04	800	-	-	200
S₂	0.1	500	-	-	500
S₃	0.2	-	-	-	Como está
S₄	0.4	800	-	200	-
S₅	1	500	-	500	-
S₆	2	-	-	Como está	-
S₇	10	-	500	-	-

2.- Se determinó el número de celdillas a utilizar (16 celdillas)

3.- El conjugado de la enzima de cortisol se diluyó adicionando 1 μL del conjugado de ésta enzima en 50 μL del buffer EIA para cada celdilla utilizada.

4.- Se agregaron 50 μL de las soluciones estándar en cada celdilla por duplicado (S₀- S₇).

5.- Se agregaron 50 μL del conjugado de la enzima diluida en cada celdilla y se agitó la placa cuidadosamente para realizar la mezcla.

7.- Posteriormente se cubrió la placa con parafilm y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora.

8.- Durante el período de incubación se preparó el buffer de lavado diluyendo el concentrado del buffer de lavado con agua deionizada (1:10).

9.- Después de la incubación, se eliminó el contenido de las celdillas de la placa dando pequeños golpes sobre una toalla.

10.- Cada una de las celdillas se lavó con 300 μL de buffer de lavado, este procedimiento se repitió dos veces más.

11.- Una vez lavada cada celda se agregaron 150 μL de sustrato a cada una y se agitó cuidadosamente.

12.- Se incubó nuevamente la placa a temperatura ambiente por 30 minutos.

14.- Finalmente la placa fue leída en un lector para micro placas multipozo ADL200 marca Beckman Coutler (espectrofotómetro) a una longitud de onda de 650 nm.

X.2. EXTRACCION DE CORTISOL EN PLASMA:

1.- 100 μ L de plasma de los organismos de cada tratamiento se colocó en tubos de ensayo para agregarles 1 mL de Éter etílico.

2.- Los tubos se agitaron por 30 segundos y se dejó reposar hasta que se separaron las fases.

3.- La fase orgánica (sobrenadante) fue transferida a un tubo de ensayo limpio y se evaporó el solvente mediante la inyección de N_2 gaseoso.

4.- Una vez evaporado el Éter etílico se agregaron 100 μ L de buffer de extracción (previamente diluido 10:1) y se agitó vigorosamente.

5.- De la mezcla anterior se tomaron 10 μ L y se diluyeron en otros 990 μ L de buffer de extracción. Se agitó nuevamente la mezcla y se tomaron muestras de 50 μ L por duplicado, colocándolas dentro de las celdas de la placa.

6.- Se agregaron 50 μ L de la dilución del conjugado de la enzima en cada celdilla con muestra y se agitó la placa cuidadosamente.

7.- Se cubrió la placa con papel parafilm y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora.

8.- Durante el período de incubación se preparó el buffer de lavado diluyendo el concentrado del buffer de lavado con agua deionizada (1:10).

9.- Después de la incubación, se eliminó el contenido de las celdillas de la placa y con una toalla seca se quitó el contenido restante de las celdillas.

10.- Cada una de las celdillas se lavó con 300 μ L de buffer de lavado; este procedimiento se repitió dos veces más.

11.- Una vez lavada cada celda se agregaron 150 μ L de sustrato a cada una y se agitó cuidadosamente.

12.- Se incubó nuevamente la placa a temperatura ambiente por 30 minutos.

14.- Finalmente la placa fue leída en un lector para micro placa (espectrofotómetro) a una longitud de onda de 650 nm

XI. BIBLIOGRAFIA

- Alvarez M.C., Pérez-Domínguez R., Tanaka M. 2005. Social stress recuperation in newly-metamorphosed Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Editorial Manager(tm) for Environmental Biology of Fishes.
- Allen, L. G. 1988. Recruitment, distribution and feeding habits of young-of-the year California halibut (*Paralichthys californicus*) in the vicinity of Alamitos Bay-Long Beach Harbor, California, 1983-1985. Bulletin South California Academic Science. 87:19-30
 - Avilés Q.S., Vázquez H.M., 2005. Fortalezas y Debilidades de la Acuicultura en México. Comisión de Pesca de la Cámara de Diputados. México.
 - Barandica L.M. y Tort L. 2008. Neuroendocrinología e inmunología de la respuesta al estrés en peces. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 32(123): 267-284.
 - Barton B.A., Schreck C.B., Barton L.D. 1987. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. Diseases of Aquatic Organisms Vol. 2:173-185.
 - Bjørnsson, B. 1994. Effects of stocking density on growth rate of Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) reared in large circular tanks for three years. Aquaculture 123, 259-270.

- Bolasina, S., Tawaqa, M., Yamashita, Y. y Tanaka M. 2006. Effect of stocking density on growth, digestive enzyme activity and cortisol level in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 259: 432-443.
- Conklin D.E., Piedrahita R.H., Merino G.E., Muguet J.B., Bush D.E., Gisbert E., Rounds J. y Cervantes-Trujano M. 2003. Development of California Halibut, *Paralichthys californicus*, Culture. *Journal of Applied Aquaculture* 14:3-4.
- Davis K.B., Torrance P., Parker N.C., Suttle M.A. 1985. Growth, body composition and hepatic tyrosine aminotransferase activity in cortisol-fed channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Fish Biol.* 27: 177-184
- Faguerlund U. H. M., McBride J. R., Stone E. T. 1981. Stress-Related Effects of Hatchery Rearing Density on Coho Salmon. *Transactions of the American Fisheries Society* 1981;110:644-649
- Fairchild, E. y Huntting, W. 2001. *Optimal Stocking Density for Juvenile Winter Flounder Pseudopleuronectes americanus*. *Journal of the world aquaculture society.* 32(3).
- Flores, C. 2002. Respuestas neuroendocrinas al estrés en peces teleósteos. *Revista Ictiológica* 10: 57-78.

- Gallardo-Cabello, M. 1983. Consideraciones bioecológicas durante el crecimiento de *Phycis blennoides* (Brunnich, 1768), en el Mediterráneo Occidental (Pisces:Gadidae)
- Goldstein, L. 1977. *Introduccion to Comparative Physiology*. Brown University Ed. 426-437
- Guzmán-Vázquez E., 2004. Las pruebas de ELISA. Gaceta Médica México. Vol. 140, Suplemento No. 3
- Howell, B. R. 1998. The effect of stocking density on growth and size variation in culture Turbot, *Scophthalmus maximus*, and sole, *Solea solea*. ICES-CM-1998/L:10
- Iguchi K., Ogawa K., Nagae M., Ito F. 2003. The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture* 220: 515-523
- Irwin, S., O'Halloran, J. y FitzGerald R.D. 1999. Stocking density, growth and growth variation in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). *Aquaculture* 178: 77-88
- Ish, T. y Stroman, F. 2006. California Halibut *Paralichthys californicus*. Sustainable Fishery Advocates. Seafood Report. Final Report. Pag. 28.

- Jones, A., Brown, A.G., Douglas, M.T., Thompson, S.J., Whitfield, R.J., 1981. Progress towards developing methods for the intensive farming of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) in cooling water from a nuclear power station. In: Coche, A.G. (Ed), Proceedings of World Symposium on New Developments in the Utilisation of Heated Effluents and of Recirculation Systems for Intensive Aquaculture, Vol. 2, Tech. Pap. FAO European Inland Fisheries Commision, No. 39. FAO, Rome, pp. 481-496.
- Kebus M.J., Collins M.T., Brownfield M.S., Amundson C.H., Kayes T.B., Malison J.A. 1992. Effects of Rearing Density on the Stress Response and Growth of Rainbow Trout. *Journal of Aquatic Animal Health* 1992;4:1-6
- Kramer. S.H., 1990. Distribution and abundance of juvenile California halibut, *Paralichthys californicus*, in shallow waters of San Diego county. The California Halibut, *Paralichthys californicus*, Resource and Fisheries. Fish bulletin 174: 99-126.
- Laurel B., Stoner A., Hurst T. 2007. Density-dependent habitat selection in marine flatfish: the dynamic role of ontogeny and temperature. Marine Ecology Progress Series. Vol. 338: 183-192
- Lidman U., Dave G., Johansson-Sjobeck M., Larsson A., Lewander K. 1979. Metabolic effects of cortisol in the European eel, *Anguilla anguilla*. Comp. Biochem. Physiology. 63A: 339-344.

- Merino, G., Piedrahita R. y Conklin D. 2007. The effect of fish stocking density on the growth of California halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles. *Aquaculture* 265: 176-186
- Miller, D. y R. Lea. 1972. Guide to coastal marine fish of California. Department of fish and Game. Fish Bulletin. 157 (235)
- Montero D., Izquierdo M.S., Tort L., Robaina L., Vergara M. 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* 20: 53-60
- Montero D., Robaina L., Socorro J., Vergara J.M., Tort L., Izquierdo M.S. 2001. Alteration of liver and muscle fatty acid composition in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles held at high stocking density and fed an essential fatty acid deficient diet. *Fish Physiol. Biochem.*, 24: 63-72.
- Mommsen T.P., Vijayan M.M. Moon T.W. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9: 211-268
- Papst, M. H., Dick, T.A., Arnason, A.N., Engel, C.E., 1992. Effect of rearing density on the early growth and variation in growth of juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Aquacult. Fish. Manage.* 23, 41-47.

- Pereira C., Vijayan M., Storey K., Jones R., Moon T. 1995. Role of glucose and insulin in regulating glycogen synthase and phosphatylase activities in rainbow trout hepatocytes. *Journal Comparative Physiology*. 165B:62-70.
- Pickering A.D., Duston J. 1983. Administration of cortisol to brown trout, *Salmo trutta* L., and its effects on the susceptibility to Saprolegnia infection and fumunculosis. *J. Fish Biol.* 23: 163-175
- Pickering A. D., Stewart A. (1984). Acclimation of the interrenal tissue of the brown trout, *Salmo trutta* to chronic crowding stress. *Journal of Fish Biology* 24: 731-740
- Pickering, A.D., 1981. *Stress and Fish*. Academic Press Ed. 149-158, 296-307
- Piedrahita R., Conklin D., 2004. Development of Halibut Aquaculture University of California, Davis. California Sea Grant College Program.
- Rankin, C. y Jensen, F. 1993. *Fish Ecophysiology*. Chapman & Hall Ed. 276-280
- Robertson L., Thomas P., Arnold C.R., Trant M. 1987. Plasma Cortisol and Secondary Stress Responses of Red Drum to Handling, Transport, Rearing Density, and a Disease Outbreak. *The Progressive Fish-Culturist* 1987;49:1-12

- Schram, E., Van del Heul, J.W., Kamstra, A. y Verdegem, M.C.J. 2005. *Stocking density-dependent growth of Dover sole (Solea solea)*. *Aquaculture* 252: 339-347
- Schreck C. 1981. Stress and compensation in teleostean fishes: Response to social and physical factors. *Stress and Fish*, Pickering ed. 295-321.
- Selye. 1950. Stress and the General Adaptation Syndrome. *British Medical Journal*: 1383-1392
- Shearer K. 1994. Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture* 119: 63-88.
- Stickney, R. 2000. *Encyclopedia of Acuaculture*. Ed. John Wiley and Sons. Wedemeyer, G., 1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Ed. Chapman and Hall. 5-8
- Sulikowski J., Fairchild E., Rennels N., Howell W.H., Tsang P. The Effects of Transport Density on Cortisol Levels in Juvenile Winter Flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol. 37:1:107-112
- Tort L., Sunyer J.O., Ghmez E., Molinero A. 1996. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 51: 179-188

- Trenzado C., Morales A.E., De la Higuera M. 2000. Interacción entre densidad de peces y niveles de vitamina E, C y HUFAs de la dieta en la Trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Influencia sobre el crecimiento y conversión del alimento. *Dpto. Biología Animal y Ecología. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada*.
- Vijayan M.M., Ballantyne J.S. Leatherland J.F. 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture* 88: 371–381.
- Volpato G. y Fernandes M. 1994. Social Control Growth in Fish. *Braz. Journal Med. Biol. Res.* 27:797-810.
- FAO. 2007. [The State of World Fisheries and Aquaculture 2006 \(SOFIA\)](#)
Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- Wedemeyer, G.A., Barton, B.A. and McLeay, D.J. 1990. Stress and acclimation. Pag.451-489 In: B.C. Schreck and B.P Moyle. Ed. *Methods for fish biology*. American Fisheries Society. U.S.A.