TESIS DEFENDIDA POR

Izbelt Citlalli Reyes Hernández

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Ana Denise Re Araujo
Director del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera
Miembro del Comité

Dr. Alexei Fedorovish Licea Navarro
Miembro del Comité

Dra. Maricela Flores Ibarra
Miembro del Comité

M. en C. Luis Humberto Mendoza Garcilazo
Miembro del Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Coordinador del programa de posgrado en Ciencias

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

8 de Diciembre de 2009

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA MARINA

TEMPERATURA PREFERIDA, TERMOTOLERANCIA Y CONSUMO DE OXÍGENO EN JUVENILES DE BOTETE DIANA (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842)

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta:

IZBELT CITLALLI REYES HERNÁNDEZ

Ensenada, Baja California, México, Diciembre de 2009.

RESUMEN de la tesis de **Izbelt Citlalli Reyes Hernández,** presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRA EN CIENCIAS con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. Diciembre 2009.

TEMPERATURA PREFERIDA, TERMOTOLERANCIA Y CONSUMO DE OXÍGENO EN JUVENILES DE BOTETE DIANA (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842)

Resumen aprobado por:

_____

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Tesis

Se evaluaron las respuestas a la temperatura de juveniles de botete diana (*Sphoeroides annulatus*) aclimatados a 19, 22, 25, 28 y 31°C, determinando de la temperatura preferida (TP), el consumo de oxígeno (VO_2), la temperatura óptima de crecimiento (TOC) y la temperatura crítica máxima (TCM).

Las TP obtenidas por el método agudo para las diferentes temperaturas de aclimatación (TA) fueron 28.2, 26.7, 27.8, 23.5 y 26.3 °C, respectivamente. El consumo de oxígeno fue diferente significativamente de acuerdo con la temperatura de aclimatación (α=0.05), los peces aclimatados a 19°C presentaron el mayor VO_2 (78.5 $mgO_2h^{-1}Kg^{-1}$p.h.) y los aclimatados a 31°C presentaron el menor VO_2 (43.3 $mgO_2h^{-1}Kg^{-1}$p.h.). El efecto de la TA sobre la tasa de VO_2 se evaluó a partir de Q_{10}, en el intervalo de 25 - 28°C el valor Q_{10} fue 1.33; a temperaturas de 19-22, 22-25 y 28-31 °C el valor Q_{10} fue 0.62, 0.32 y 0.52. La TP fue independiente de la TA (r=0.462), la TP final fue de 26.7°C, en un intervalo de 25 – 28°C de acuerdo con el VO_2 y la TOC se estimó en 25.93°C. La tolerancia térmica se determinó a través de la TCM, la cuál aumentó conforme la TA de manera significativa (α=0.05) de 37.7 a 41.3°C y la tasa de respuesta a la aclimatación (TRA) fue de 0.22 a 0.38.

El botete diana, *Sphoeroides annulatus,* puede cultivarse en zonas subtropicales o en condiciones controladas de temperatura; se recomienda mantener la temperatura del agua de cultivo a 26 ± 2°C para favorecer el crecimiento y evitar el estrés térmico.

Palabras Clave: *Sphoeroides annulatus*, temperatura preferida, temperatura crítica máxima, consumo de oxígeno, temperatura optima de crecimiento.

ABSTRACT of the thesis presented by **Izbelt Citlalli Reyes Hernández** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree with orientation in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California, México December 2009.

TEMPERATURE PREFERENCE, THERMAL TOLERANCE AND OXYGEN CONSUMPTION IN JUVENILE BULLSEYE PUFFER (*Sphoeroides annulatus*, 1842)

Temperature response was evaluated in *Sphoeroides annulatus* juveniles acclimated at 19, 22, 25, 28 and 31°C by the determination of thermal preference (TP), oxygen consumption (VO_2), optimum growth temperature (OGT) and critical thermal maxima (CTMax).

The TP determined by the acute method at different acclimation temperatures (AT) was 28.2, 26.7, 27.8, 23.5 and 26.3 °C respectively. The oxygen consumption was significantly different according to AT (α=0.05), fish acclimated to 19°C showed the maximum VO_2 (78.5 $mgO_2h^{-1}Kg^{-1}$p.h.) and the fish acclimated to 31°C showed de minimum VO_2 (43.3 $mgO_2h^{-1}Kg^{-1}$p.h.). The effect of AT on VO_2 rate was evaluated by Q_{10}, in the range of temperature 25-28°C the Q_{10} quotient was 1.33, for 19-22, 22-25 and 28-31 °C the Q_{10} quotient was 0.62, 0.32 y 0.52. The TP was independent of acclimation temperature AT (r=0.462), the final TP was 26.7°C in an interval of 25 – 28°C according with the VO_2 and the OGT was estimated in 25.93°C. The thermal tolerance was determined by CTMax; the CTMax increased significantly (α=0.05) with increasing AT from 37.7 to 41.3°C and the acclimation temperature response ratio (ARR) was between 0.22-0.38.

The bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus)* can be cultured in subtropical regions or in temperature controlled conditions; is recommend to maintain the culture water temperature about 26$\pm$2°C for enhance the growth and to avoid the thermal stress.

Keywords: *Sphoeroides annulatus*, thermal preference, oxygen consumption, critical thermal maxima, optimum growth temperature.

A mis padres y hermanos

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el apoyo económico otorgado durante los estudios de maestría.

A CICESE; al programa de posgrado en ciencias, a los departamentos de Biotecnología Marina, Acuicultura, Microbiología y a servicios escolares.

A la Dra. Denise Re Araujo por su apoyo, dirección y confianza depositada en mí para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Díaz por su constante colaboración y asesoría a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A todo el comité por sus aportaciones para el mejoramiento de este trabajo.

Al Dr. Lizárraga y a los integrantes de su laboratorio por su asesoría en bacteriología durante el mantenimiento de los organismos.

A los estudiantes en servicio social o prácticas y a los voluntarios que me auxiliaron durante el mantenimiento de los organismos y durante los experimentos.

A los técnicos Ernesto Lerma y Manuel Parra por su cooperación en la preparación del equipo y durante los experimentos.

A mis compañeros de maestría y amigos que me ayudaron en diferentes momentos para elaboración de esta tesis.

A mis familiares y amigos por apoyar mis decisiones y por estar siempre presentes.

CONTENIDO

	Página
Resumen español	**i**
Resumen inglés	**ii**
Dedicatorias	**iii**
Agradecimientos	**iv**
Contenido	**v**
Lista de Figuras	**vi**
Lista de Tablas	**vii**
I. Introducción	**1**
II. Objetivos	**9**
III. Materiales y Métodos	**10**
III.1 Mantenimiento de los organismos	**10**
III.2 Temperatura Preferida	**10**
III.3 Consumo de Oxígeno	**12**
III.4 Temperatura Crítica Máxima	**14**
III. 5 Análisis Estadístico	**16**
IV. Resultados	**18**
V. Discusión	**22**
VI. Conclusiones	**26**
Bibliografía, Literatura citada o Referencias	**27**
Anexo	**31**

LISTA DE FIGURAS

Figura		**Página**
1	Distribución de *Sphoeroides annulatus*	2
2	Gradiente horizontal térmico	11
3	Marcaje de los juveniles de *S. annulatus*	12
4	Respirómetro semi-abierto con 21 cámaras respirométricas	13
5	Oxímetro YSI 52	14
6	Pérdida del equilibrio en juvenil de *S. annulatus*	15
7	Temperatura preferida de juveniles de *S. annulatus* determinada por el método agudo. La zona delimitada por los puntos representa los intervalos de confianza de las medianas al 95%	19
8	Consumo de oxígeno de juveniles de *S. annulatus* aclimatados a 19, 22, 25, 28 y 31 °C. La zona delimitada por puntos representa los intervalos de confianza de las medianas al 95%.	20
9	Temperatura crítica máxima de S. annulatus aclimatado a diferentes temperaturas. La zona delimitada por puntos representa los intervalos de confianza de las medianas al 95%.	21
10	Bacterias obtenidas de vísceras de *S. annulatus* aisladas en medios Zobell y TCBS. Izquierda bacterias en medio Zobell $1x10^{-1}$, Derecha bacterias en medio TCBS $1x10^{-1}$	33
11	Antibiograma en 16 colonias de bacterias aisladas de botete diana con 0.01mg de Enrofloxacina	34
12	Colección de bacterias tipo vibrio (BTCBS) aisladas de vísceras de Botete diana *S. annulatus*	34

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Peso húmedo de *S. annulatus* utilizados en las determinaciones. Temperatura de aclimatación TA, temperatura preferida TP, Consumo de oxígeno (VO_2), Temperatura crítica máxima (TCM), Media±D.E.	17
II	Longitud total de *S. annulatus* utilizados en las determinaciones. Temperatura de aclimatación TA, temperatura preferida TP, Consumo de oxígeno (VO_2), Temperatura crítica máxima (TCM), Media±D.E.	17
III	Preferendum térmico agudo de juveniles de *S. annulatus*. Temperatura de aclimatación TA; Temperatura preferida TP. Mediana e intervalos de confianza.	18
IV	Consumo de oxígeno y valor Q_{10} en juveniles de *S. annulatus* aclimatados a cinco temperaturas. Temperatura de aclimatación TA, consumo de oxígeno VO_2. Media ± DE	19
V	Temperatura crítica máxima y tasa de respuesta a la aclimatación en juveniles de *S. annulatus.* Temperatura de aclimatación TA, temperatura crítica máxima TCM, tasa de respuesta a la aclimatación TRA. Mediana, intervalos de confianza.	20
VI	Conteo bacteriológico de muestras de agua de los sistemas y acuarios utilizados para el mantenimiento de *S. annulatus* en medios Zobell y TCBS.	35

I. Introducción

La familia *Tretaodontidae* agrupa a más de 120 especies de peces globo, los cuales en su mayoría son marinos, encontrándose principalmente en aguas tropicales y subtropicales de los océanos Índico, Pacífico y Atlántico. Algunas especies habitan aguas dulces de África y el sur de Asia. En esta familia se incluyen 19 géneros con características comunes como carencia de escamas y de aleta pélvica; capacidad de expandir su cuerpo 2 o 3 veces de su tamaño normal; boca pequeña, mandíbula fuerte y los bordes afilados de está actúan como dentición; branquias con apertura limitada y cubiertas por piel continua de cuerpo; algunos poseen además tetrodotoxina (TTX) o neurotoxinas relacionadas principalmente en las vísceras (Bond, 1996; Cavendish, 2001; Tyler y Holcroft, 2007).

En Asia los peces globo son muy apreciados y han sido consumidos durante siglos; más de 20 especies son capturadas en el Mar de Japón, el Mar Amarillo y el Mar del Este de China. *Takifugu rubripes* en Japón y *Takifugu obscurus* en Korea y China son las dos especies más cultivadas a escala comercial. El pez globo tigre, *Takifugu rubripes* se cultiva desde 1960, es de los peces marinos más importantes y con más alto precio en el mercado (Foreign Fishery Developments, 1989; Kikuchi, 2006 y Chávez-Sánchez, 2008).

El botete diana *Sphoeroides annulatus* Jenyns (1842), se distribuye desde el sur de California, hasta Perú, incluyendo el Golfo de California y las Islas Galápagos. Esta especie es tolerante a diferentes salinidades, pudiéndosele encontrar en estuarios o en áreas de agua dulce; en época de reproducción entra a lagunas costeras donde desova, más tarde los juveniles migran a aguas costeras y los adultos migran a zonas neríticas, habitando fondos turbios y arenosos, preferentemente en la plataforma poco profunda entre 20 y

40m, así como en áreas protegidas entre bahías (Sánchez-Cárdenas, et al., 2007; Chávez-Sánchez, 2008; Froese, 2009).

Figura 1. Distribución de la especie *Sphoeroides annulatus*

En México el botete diana es considerado una especie comestible que puede consumirse sin riesgo con un adecuado manejo al remover las vísceras. La explotación comercial se inició en 1972 en Mazatlán; por año se pescan alrededor de 700 toneladas y su consumo se ha dado principalmente en la costa noroeste del país. Actualmente es una especie de alto valor comercial ($125m.n./Kg), debido al color, textura y sabor de su carne, su demanda en el mercado está en aumento y posee potencial para exportación (Arias-Rodríguez, et al., 2004; Ochoa, et al., 2002; Ochoa, et al., 2006; Sánchez-Cárdenas, et al., 2007).

El cultivo e investigación de esta especie de pez globo se inició en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) en Mazatlán, México, en 1996; donde se han realizado estudios referentes a reproducción, crianza, nutrición, enfermedades, entre otros. Los avances logrados en la inducción al desove, calidad de ovocitos, supervivencia larval y de juveniles han resultado en la obtención de densidades cercanas a las requeridas para la producción comercial (Chávez-Sánchez, 2008).

Desde 1997 hasta hoy, anualmente, se ha reproducido botete diana en cautiverio en el CIAD. Recientemente, a mediados de 2008 el Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) obtuvo su primera producción (Chávez-Sánchez, 2008; Aguilera, 2008).

En términos de su biología *Sphoeroides annulatus* es indicado para la acuicultura, es eurihalino (0-35gL^{-1}) con alta tolerancia a la temperatura (25-30°C) en condiciones de cultivo. En estudios realizados en huevos fertilizados, se observó que la temperatura y salinidad afectan significativamente la mortalidad embrionaria y la supervivencia a la cosecha de los peces; la máxima tasa de cosecha se obtuvo a 28°C de temperatura y 35gL^{-1} de salinidad. Sin embargo hacen falta estudios fisiológicos para determinar la tolerancia a cambios de temperatura y temperatura óptima de crecimiento en juveniles para mejorar la acuicultura de esta potencial especie (Chávez-Sánchez, 2008).

La temperatura es uno de los factores ambientales que más afectan el comportamiento animal, la fisiología, el tamaño de la población y la distribución geográfica. En general, las actividades vitales ocurren en un intervalo de 0-40°C y la mayoría de los animales vive entre límites mucho más estrechos. Normalmente durante etapas de desarrollo, el intervalo de temperatura es más limitado que para la supervivencia de los adultos. La termorregulación es un mecanismo que los organismos usan para mantener sus funciones

vitales relativamente estables e independientes de los cambios de temperatura (Prosser, 1991; Díaz *et al.,* 2004; Schaefer y Ryan, 2006).

Los ambientes acuáticos son típicamente heterogéneos y variables en relación a la temperatura, haciendo que esta sea especialmente importante en la biología y ecología de animales acuáticos; este factor controla, limita y activa mecanismos fisiológicos y de comportamiento de los organismos. Por ejemplo, la temperatura influye en la migración, desove, crecimiento, habilidad competitiva, resistencia a parásitos, enfermedades y contaminantes. Los organismos acuáticos deben tolerar cambios de temperatura del agua, a través de procesos de ajuste fisiológico y de comportamiento (Armour, 1991; Díaz *et al.*, 2004).

En el caso de los peces la mayoría son ectotermos es decir, su temperatura corporal se ajusta a la temperatura de su ambiente, esto se debe principalmente a que la mayoría de los peces obtienen oxígeno del agua (respiración branquial). El agua tiene relativamente un contenido bajo de oxígeno disuelto y una enorme capacidad térmica; haciendo que se de un rápido intercambio de calor. Más aún, la ubicación de los vasos sanguíneos en el cuerpo y las branquias facilita el intercambio de calor con el medio. Alternativamente pueden existir variaciones en la temperatura en el curso del tiempo, durante el día (peces intermareales, peces de desierto) y/o estacionales (peces de zonas templadas). Sin embargo muchos peces son capaces de seleccionar un nicho térmico particular a través del comportamiento termorregulatorio (Crockett y Londraville, 2006).

Factores como; la salinidad, el pH, el oxígeno, el fotoperiodo, el tamaño y edad de los organismos, el sexo, el estadio del ciclo de vida, los depredadores, la dieta, entre otros, actúan simultáneamente haciendo que el estudio de la fisiología térmica en ectotermos sea compleja; sin embargo se han desmostrado comportamientos particulares que son regidos solamente por límites fisiológicos de temperatura (tolerancia térmica). Las

respuestas de los peces a la temperatura se dividen en tolerancia, resistencia y preferencia (Jobling, 1981; Armour, 1991; Lutterschmidt y Hutchison, 1997).

El intervalo de temperatura a la cual los organismos se congregan o pasan más tiempo es definido como temperatura preferida o preferencia térmica; y representa el espacio térmico en el cual los procesos que controlan la actividad de un pez son efectivos, por tanto su rendimiento físico es aumentado y optimizado (Luna-Figueroa, 2003).

Utilizando la definición de Fry (1947) se reconocen dos mediciones de preferencia térmica: aguda y final. En la aguda, usualmente determinada entre las primeras dos horas después de la inmersión, los organismos son fuertemente influidos por las temperaturas de aclimatación. La preferencia final es determinada después que los animales han tenido un periodo suficiente de tiempo para gravitar hacia una región de preferencia térmica (Kita *et al*., 1996; Díaz *et al.*, 2004).

La temperatura preferida final coincide con la temperatura óptima para varios procesos fisiológicos, particularmente para el crecimiento (Tsuchida, 1995).

El aumento de temperatura, dentro de ciertos límites, acelera la mayoría de los procesos fisiológicos, lo cuál puede utilizarse en beneficio de la producción acuícola, por ejemplo se puede incrementar la tasa de crecimiento reduciendo el periodo de cultivo. Sin embargo temperaturas más allá del límite óptimo afectarían adversamente la salud de los organismos, produciendo estrés metabólico, incluso promoviendo la proliferación, invasión y virulencia de microorganismos patógenos (Schmidt-Nielsen, 1997; Das, *et al*., 2005; Sarma, *et al*., 2008). La temperatura es el mayor factor que influye directamente sobre el metabolismo afectando todos los procesos fisiológicos en ectotermos, tales como ingestión alimentaria y eficiencia nutricia. De esta manera la temperatura del agua afecta directamente el crecimiento en peces (Das, *et al* 2005).

La tasa metabólica representa la tasa de consumo, transformación y asignación de energía para los procesos biológicos. El conocimiento de la tasa metabólica de un organismo a diferentes temperaturas provee indicios de sus requerimientos energéticos en diferentes ambientes. La tasa respiratoria, medida en términos del consumo de oxígeno ha sido comúnmente usada como una aproximación a la tasa metabólica en animales acuáticos y terrestres. La tasa metabólica estándar corresponde al consumo de oxígeno observado en un individuo en reposo en condición post-absorción. La tasa metabólica de rutina describe un organismo que su alimentación, crecimiento, producción de productos sexuales, actividad espontánea o cualquier otra actividad eleva su tasa metabólica estándar y se presume que representa los niveles característicos del gasto energético en el medio natural. Debido a que el estrés y la actividad son rara vez controlados, usualmente los valores de tasa metabólica estándar de organismos acuáticos encontrada en la literatura es más bien tasa metabólica de rutina (Daoud *et al*., 2007).

Dentro del intervalo de temperatura que un animal puede tolerar, la tasa de consumo de oxígeno se incrementa conforme aumenta la temperatura. Estimar el efecto en la tasa de consumo de oxígeno es una expresión conveniente de la actividad metabólica total de un organismo. Generalmente un aumento de 10°C causa un incremento de alrededor de dos o tres veces sobre la tasa de consumo de oxígeno. Este proceso de aceleración se describe con una ecuación exponencial, que puede expresarse de forma logarítmica (Q_{10}). Cuando se observan tasas a dos temperaturas diferentes se aplica la siguiente ecuación:

$$Q_{10} = (R_2 / R_1)^{(10 / T_2 - T_1)} \quad (1)$$

donde R_1 es la tasa de consumo de oxígeno 1; R_2 la tasa de consumo oxígeno 2; T_1 y T_2 la temperatura 1 y 2 respectivamente. (Schmidt-Nielsen, 1997)

La temperatura preferida final puede ser estimada indirectamente a partir de la relación entre el consumo de oxígeno y la temperatura de aclimatación. El punto donde el valor de Q_{10} comienza a decrecer con el incremento de temperatura de aclimatación es la temperatura preferida (Das, *et al* 2005).

La tolerancia a la temperatura depende ampliamente de la historia de exposición térmica previa o aclimatación. Graficando respuestas a la temperatura a diferentes temperaturas de aclimatación se definen zonas de tolerancia y resistencia. La temperatura crítica máxima (TCM) es el límite superior de la zona de resistencia, por encima de esta la supervivencia es nula. La zona de tolerancia se delimita por la temperatura letal incipiente superior última (UUILT) la cuál es la temperatura más alta a la que se puede aclimatar una especie (Lutterschmidt y Hutchison, 1997).

El método, representado por los conceptos de temperatura crítica máxima (TCM) y mínima, fue introducido por Cowles y Bogert (1944) con TCM definida como "el punto térmico al cuál la actividad locomotora se vuelve desorganizada y el animal pierde la habilidad de escapar de las condiciones que inmediatemente le conducirían a la muerte", esta definición posteriormente fue modificada por Lowe y Vance (1955) y estandarizada por Cox (1974) y Hutchison (1961, 1976) (Lutterschmidt y Hutchison, 1997).

Conforme la temperatura aumenta los animales muestran una secuencia de respuestas como aumento de actividad y desorientación; los peces presentan espasmos operculares usualmente acompañados por sacudidas, distensión de las branquias y boca abierta. La pérdida del equilibrio (LOE) fue designada como el punto final de la TCM por Paladino *et al*. (1980) y Beitenger *et al.* (2000). LOE es un punto subletal; los organismos sobreviven si son removidos inmediatamente y colocados en su ambiente previo. La temperatura crítica máxima (TCM) es un excelente índice para evaluar los requerimientos de la fisiología térmica de los organismos acuáticos siendo establecida por Paladino *et.al*. (1980);

Beitinger y McCaley (1990), como una herramienta poderosa para el estudio de la fisiología del estrés térmico y adaptación en peces (Paladino et al., 1980; Beitinger y McCaley (1990); Lutterschmidt y Hutchison, 1997; Beitenger *et al*., 2000; Sarma, *et al*., 2008).

La temperatura óptima de crecimiento (TOC) es definida como la temperatura a la cuál los peces tienen la mayor tasa de crecimiento cuando son criados bajo condiciones de máxima o excesiva alimentación. Jobling (1981) correlacionó indicadores de requerimiento térmicos (tolerancia térmica, crecimiento óptimo y temperatura preferida final) de diferentes estudios, la temperatura preferida final y la temperatura óptima de crecimiento resultaron tener una buena correlación (r=0.937), es decir la preferencia final (PF) es un buen indicio de la TOC; más tarde Tsuchida (1995) reportó una alta correlación entre TCM y PF (r=0.981). Kita *et al.* (1996) utilizando un respirómetro diseñado para minimizar estímulos externos y con cámaras con espacio suficiente para permitir el desplazamiento de los peces, calcularon la tasa de consumo de oxígeno equivalente al metabolismo de rutina; encontrando que conforme aumentaba la temperatura de aclimatación, la tasa de consumo de oxígeno también se incrementaba, hasta llegar a cierta temperatura donde comenzaba a disminuir gradualmente; está temperatura crítica concidió cercanamente con la PF (Jobling, 1981; Tsuchida, 1995; Kita *et al.*, 1996).

Es por todo esto que un manejo efectivo de los sistemas acuícolas requiere del conocimiento de las temperaturas apropiadas para mejorar la producción y supervivencia los organismos cultivados (Das *et al*., 2005).

II. Objetivos

II.1 Objetivo General

Evaluar el comportamiento termorregulador y respuesta fisiológica de juveniles de Botete diana (*Sphoeroides annulatus*) aclimatados a diferentes temperaturas a través de: la temperatura preferida, el consumo de oxígeno, la temperatura crítica máxima y la temperatura óptima de crecimiento.

II.2 Objetivos Particulares

- Determinar la preferencia térmica aguda con cinco temperaturas de aclimatación
- Evaluar el efecto de temperatura de aclimatación sobre el consumo de oxígeno
- Estimar la temperatura óptima de crecimiento
- Evaluar el efecto de la temperatura de aclimatación sobre la tolerancia térmica determinada a partir de la temperatura crítica máxima (TCM) y calculando la tasa de respuesta a la aclimatación (TRA)

III. Materiales y Métodos

III.1 Mantenimiento de los organismos

Los peces *Sphoeroides annulatus* fueron obtenidos a través del Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) (Convenio Específico de Colaboración CIC 1C.4.2), los cuales fueron transportados vía aérea y terrestre al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE) e instalados en los invernaderos del departamento de Biotecnología Marina. Un total de 500 juveniles con longitud total promedio de 6 cm, se mantuvieron en 12 acuarios de 400 litros y 2 de 2000L a 21 ± 1 °C con recambio constante de agua de mar (ANEXO).

Posteriormente 300 peces se aclimataron a las siguientes temperaturas 19, 22, 25, 28 y 31 ±1 °C distribuidos en 11 acuarios con aireación constante y 35ppm de salinidad. La calidad de agua en estos acuarios se mantuvo en dos modalidades, 5 con recambio de agua constante y 6 con biofiltro. La temperatura se mantuvo con calentadores de 1000W conectados a un controlador térmico Moeller CI-K3-125-M. A cada acuario se le aumentó o disminuyó 1°C cada día para alcanzar las temperaturas experimentales antes mencionadas.

III.2 Temperatura Preferida

La determinación de la temperatura preferida (TP) se hizo a través del método agudo, en el cual se utilizó un gradiente térmico horizontal que consta de un tubo de PVC de 400cm de longitud y 20cm de diámetro dividido en 20 segmentos o cámaras (Díaz *et al*., 2007). El gradiente se forma al colocar un calentador de 1000W en uno de los extremos, al

bombear agua fría desde el extremo opuesto proveniente de un enfriador Neslab HX-150 y eliminando la estratificación en la columna de agua con piedras de aireación en cada extremo y con una manguera de aireación a lo largo de todas las cámaras. La intensidad luminosa se mantiene constante por medio de líneas de focos de luz incandescente y de luz fluorescente. En cada cámara hay un termómetro digital (Figura 2).

Figura 2. Gradiente horizontal térmico

Se utilizaron 100 peces aclimatados a 19, 22, 25, 28 y 31 ± 1 °C; 20 por cada temperatura de aclimatación y divididos en grupos de 5 organismos. Previo al experimento los peces se mantuvieron en ayuno 24 horas, se les midió la longitud total, el peso húmedo (Tabla I y II) y se les marcó individualmente. El marcaje se realizó con tintura haciendo una pequeña marca con un sello de goma sobre el dorso del pez. La posición de la marca indicaba el número de individuo: en medio de los ojos el número 1, a nivel de las aletas pectorales el número 2, sobre la parte media del dorso el número 3, justo antes de la aleta dorsal el

número 4 y entre la aleta dorsal y caudal el número 5. De esta manera el marcaje no alteró la forma de nado y permitió identificar a simple vista a cada individuo (Figura 3).

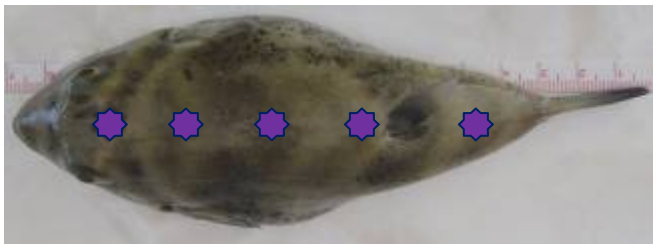

Figura 3. Marcaje de los juveniles de *S. annulatus*

Cada grupo se introdujo al gradiente en la cámara correspondiente a su temperatura de aclimatación. La ubicación individual y las temperaturas de los segmentos fueron registradas cada diez minutos durante dos horas y se hicieron cuatro repeticiones. Para todos los grupos de peces provenientes de la misma temperatura de aclimatación se tomó el valor de la mediana como temperatura preferida.

III.3 Consumo de Oxígeno

Se midió el consumo de oxígeno de 50 peces aclimatados a 19, 22, 25, 28 y 31 ± 1 °C. Para cada temperatura se utilizaron 10 organismos y se realizó una repetición con un intervalo de una hora entre cada medición.

El equipo utilizado fue un respirómetro semi-abierto, descrito por Díaz *et al.* (2007), compuesto por un sistema de circulación que intercambia agua a un máximo de 21 matraces de 2L, los cuales funcionan como cámaras respiratorias que están conectados por medio de un sistema de válvulas y mangueras a un oxímetro YSI 52 provisto de un sensor polarográfico con el cuál se midió la concentración de oxígeno (Díaz *et al*., 2007) (Figura 4 y 5).

Figura 4. Respirómetro semi-abierto con 21 cámaras respirométricas

Los juveniles permanecieron en ayuno por 24 horas. Antes de iniciar el experimento se midió el peso y longitud total (Tabla I y II). Posteriormente fueron colocados en las cámaras respirométricas, mínimo una hora antes de iniciar las mediciones de oxígeno para evitar el estrés por el manejo.

Figura 5. Oxímetro YSI 52

Se tomaron las lecturas de oxígeno disuelto por cada cámara al inicio del experimento y una hora después de haber cerrado el sistema, para obtener por diferencia el consumo de oxígeno de cada pez. Como control se utilizó una cámara sin pez experimental para corregir el consumo de oxígeno debido a la presencia de microorganismos dentro del sistema. El consumo de oxígeno (VO_2) de los organismos se expresó en $mgO_2h^{-1}Kg^{-1}$p.h., donde p.h. es el peso húmedo.

III.4 Tolerancia térmica, temperatura crítica máxima (TCM)

Se utilizaron 75 organismos, 15 por cada temperatura de aclimatación, la cuál tuvo una duración mínima de 25 días. Previo al experimento los peces se mantuvieron en ayuno durante 24 horas, se pesaron y se marcaron en grupos de 5 individuos, de la misma forma utilizada para la determinación de la temperatura preferida (Figura 3).

La temperatura crítica máxima se determinó utilizando una tasa de calentamiento de agua de un grado centígrado por minuto para permitir que la temperatura corporal de los peces se acople a las temperaturas de prueba sin que se produzca un retraso entre la temperatura del medio y la de los organismos (Hutchison, 1976, Lutteschmidt y Hutchison, 1997). Para ello se utilizaron acuarios experimentales de 50L de capacidad con agua a nivel

de 10.5cm provistos con un calentador de 1000W y sujetos a una piedra de aireación; con esto se logró difundir el calor de manera uniforme y mantener una concentración de oxígeno disuelto adecuada.

El experimento se realizó por grupos de 5 peces, hasta completar 15 organismos de cada una de las temperaturas de aclimatación. Una vez colocado un grupo en el acuario experimental (a su temperatura de aclimatación), se espero 20 minutos para evitar el estrés por manejo, antes de comenzar a incrementar la temperatura (Pérez *et al*., 2003). Durante el experimento una persona se encargó de medir el tiempo con un cronómetro y verificar las temperaturas con un termómetro de mercurio; mientras otra persona registraba la temperatura y el comportamiento indicador de estrés térmico que mostraban los peces. La pérdida del equilibrio se consideró como punto final de la temperatura crítica máxima (Paladino, 1980) (Figura 6); al llegar a este punto los organismos se extrajeron e inmediatamente se regresaron a la temperatura de aclimatación de donde provenían.

Figura 6. Pérdida del equilibrio en juvenil de *Sphoeroides annulatus*

Se determinó la TCM con la mediana de cada temperatura de aclimatación y se calculó la tasa de respuesta a la aclimatación (TRA) cambio de tolerancia sobre el cambio térmico total (Díaz *et al.*, 2004).

$$TRA = \Delta TCM / \Delta T \quad (2)$$

donde TCM es la temperatura crítica máxima y T es la temperatura de aclimatación.

III.5 Análisis estadístico

Con los resultados de la temperatura preferida por los juveniles de botete diana se realizó un análisis de correlación simple para determinar dependencia lineal con la temperatura de aclimatación. Los datos del consumo de oxígeno, al igual que los datos de la temperatura crítica máxima se sometieron a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza; se aplicó el análisis de varianza de una vía y la prueba a posteriori de Tukey de comparación múltiple para determinar la diferencia significativa (α = 0.05) entre las temperaturas de aclimatación (Zar, 1996; Dietrich y Kearns, 1989).

Los datos fueron procesados con los programas Excel 2007, Statistica 6, SigmaStat 3.1 y graficados en cajas de paralelo mediante el programa Sigmaplot 11.0.

Tabla I. Peso húmedo de *S. annulatus* utilizados en las determinaciones. Temperatura de aclimatación TA, temperatura preferida TP, Consumo de oxígeno (VO_2), Temperatura crítica máxima (TCM), Media±D.E.

AT	Peso húmedo (g)		
(°C)	TP	VO_2	TCM
19±1	30.9 ± 4.2	18.6 ± 1.5	17.9 ± 2.6
22±1	48.4 ± 6.1	23.8 ± 2.5	23.0 ± 4.6
25±1	73.6 ± 16.7	42.0 ± 6.0	31.7 ± 6.7
28±1	57.6 ± 18.3	33.9 ± 6.6	39.8 ± 6.1
31±1	56.9 ± 13.1	34.8 ± 5.5	34.8 ± 9.9

Tabla II. Longitud total de *S. annulatus* utilizados en las determinaciones. Temperatura de aclimatación TA, temperatura preferida TP, Consumo oxígeno (VO_2), Temperatura crítica máxima (TCM), Media±D.E.

AT	Longitud total (cm)		
(°C)	TP	VO_2	TCM
19±1	10.5 ± 0.6	8.3 ± 0.7	8.1 ± 0.7
22±1	11.8 ± 0.7	9.5 ± 0.4	9.3 ± 0.8
25±1	14.5 ± 1.3	11.3 ± 0.3	12.0 ± 1.0
28±1	13.4 ± 1.3	10.5 ± 0.7	10.5 ± 1.0
31±1	13.0 ± 1.3	10.4 ± 0.6	11.0 ± 1.2

IV. Resultados

IV.1 Temperatura Preferida

Los peces aclimatados a 19, 22 y 25 °C prefirieron temperaturas más altas, mientras que los aclimatados a 28 y 31°C prefirieron temperaturas más bajas, con respecto a sus temperaturas de procedencia. El coeficiente de correlación de Pearson (r=0.462) mostró que no hay correlación entre temperaturas. Las temperaturas preferidas por los juveniles de *S. annulatus* fueron independientes de la temperatura de aclimatación. Por esto se consideró 26.7°C como la temperatura preferida final, la cuál se obtuvo con el valor de la mediana de todos los datos (Tabla III, figura 7).

Tabla III. Preferencia térmica aguda de juveniles de *S. annulatus*. Temperatura de aclimatación TA; Temperatura preferida TP. Mediana e intervalos de confianza.

TA (°C)	**TP (°C)**	25%	75%
19±1	**28.2**	25.0	30.3
22±1	**26.7**	22.9	29.0
25±1	**27.8**	24.6	30.4
28±1	**23.5**	21.4	26.9
31±1	**26.3**	23.6	28.7

A partir de la temperatura preferida final, se estimó la temperatura óptima de crecimiento mediante la ecuación de Jobling (1981):

$$Y = 1.05X - 0.53 \quad (3)$$

donde X es crecimiento óptimo y Y preferencia final.

La temperatura óptima de crecimiento de los juveniles de *S. annulatus* de acuerdo con este cálculo es de 25.93°C.

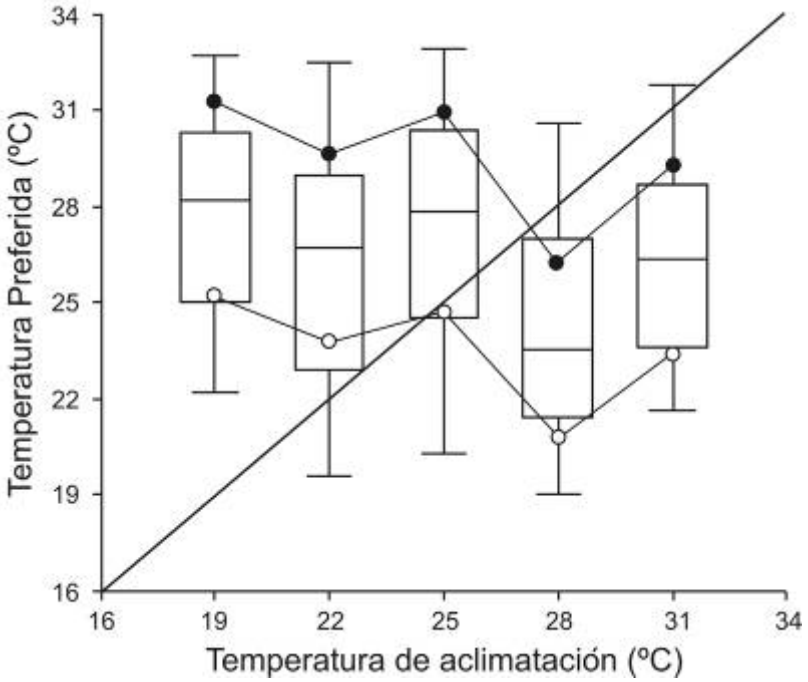

Figura 7. Temperatura preferida de juveniles de *S. annulatus* determinada por el método agudo. La zona delimitada por los puntos representa los intervalos de confianza de las medianas al 95%

IV.2 Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno fue diferente estadísticamente de acuerdo con la temperatura de aclimatación (α = 0.05). El valor de Q_{10} muestra una mejor adaptación del metabolismo entre los 25 y 28°C. Los valores obtenidos se muestran en la tabla IV.

Tabla IV. Consumo de oxígeno y valor Q_{10} en juveniles de *S. annulatus* aclimatados a cinco temperaturas. Temperatura de aclimatación TA, consumo de oxígeno VO_2. Media ± DE

TA (°C)	VO_2($mgO^2h^{-1}kg^{-1}$p.h.)	Intervalo térmico	Q_{10}
19±1	78.5 [a]		
22±1	68.0 [b]	19 – 22	0.62
25±1	48.3 [c]	22 – 25	0.32
28±1	52.6 [c]	25 – 28	1.33
31±1	43.3 [c]	28 – 31	0.52

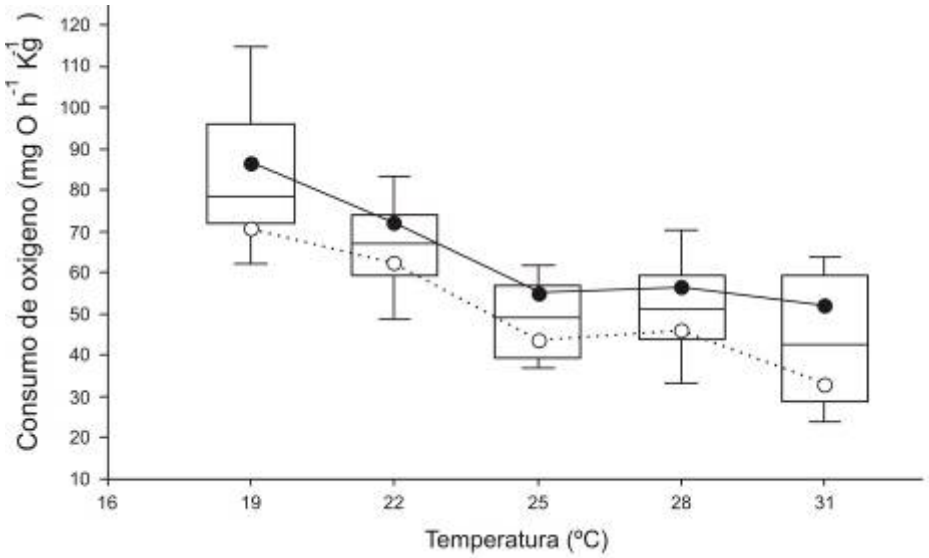

Figura 8. Consumo de oxígeno (VO_2) de juveniles de *S. annulatus* aclimatados a 19, 22, 25, 28 y 31 °C. La zona delimitada por puntos representa los intervalos de confianza de las medianas al 95%.

IV.3 Temperatura Crítica Máxima

La temperatura crítica máxima aumento conforme a la temperatura de aclimatación de 37.7 a 41.3 °C, mientras que la tasa de respuesta a la aclimatación solo aumento de 19 a 22 y de 22 a 25°C. La TCM fue afectada significativamente por la temperatura de aclimatación (α = 0.05). Los datos se muestran en la tabla V y figura 9.

Tabla V. Temperatura crítica máxima y tasa de respuesta a la aclimatación en juveniles de *S. annulatus.* Temperatura de aclimatación TA, temperatura crítica máxima TCM, tasa de respuesta a la aclimatación TRA. Mediana, intervalos de confianza

TA (°C)	TCM (°C)	25%	75%	Intervalo térmico	TRA
19±1	37.7 [a]	37.5	38.1		
22±1	38.8 [b]	38.6	39.1		
25±1	40.0 [c]	39.5	40.3	19 – 25	0.38
28±1	40.9 [d]	40.4	41.0	22 – 28	0.35
31±1	41.3 [e]	41.0	41.7	25 – 31	0.22

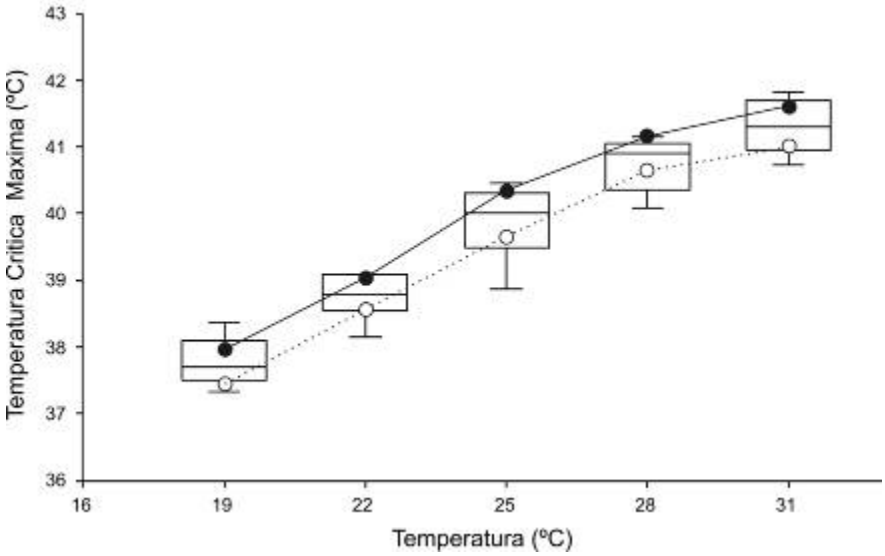

Figura 9. Temperatura crítica máxima (TCM) de S. annulatus aclimatado a diferentes temperaturas. La zona delimitada por puntos representa los intervalos de confianza de las medianas al 95%.

V. Discusión

El intervalo de temperatura preferida final en juveniles de *Sphoeroides annulatus* fue independiente de la temperatura de aclimatación previa. Estos resultados fueron similares a los reportados por Kelsch y Neil (1990) en *Oreochromis mossambicus*; por Tsuchida (1995) en peces marinos japoneses como *Clupea pallasi, Sardinops melanostictus, Oncorhynchus keta, Trachurus japonicus, Pseudocaranx dentex, Lateolabrax japonicus y Sebastes schlegeli*; por Kita *et al.* (1996) en *Sebasticus marmoratus;* por Pérez *et al.* (2003) en *Pterophyllum scalare* y por Díaz *et al.* (2007) en *Micropterus salmoides*. De acuerdo con Johnson y Kelsch (1998) la relación temperatura-preferencia puede ser positiva, independiente o negativa en función de la temperatura de aclimatación.

Los peces están adaptados a las temperaturas del ambiente al que han sido expuestos; la temperatura preferida está relacionada con la magnitud del régimen térmico experimentado por estos. Los peces adaptados a ambientes con poca variación térmica anual o posiblemente con fluctuaciones de temperaturas a lo largo del día o sub-estacionales, exhiben relaciones independientes a la temperatura de aclimatación. Por esto la temperatura preferida final puede usarse como medida de la temperatura seleccionada y como un índice de la magnitud de las temperaturas a las cuales la especie está adaptada (Kita *et al*., 1996; Johnson y Kelsch, 1998; Pérez *et al.*, 2003).

Los organismos ectotermos termorregulan a través de comportamientos, seleccionando hábitats térmicos favorables y evadiendo los desfavorables; la temperatura preferida es probablemente la que permite que los organismos utilicen la mayor cantidad de energía disponible para canalizarse a funciones como reproducción, crecimiento, actividad y supervivencia. Los organismos se encuentran fisiológicamente estables a la temperatura preferida, debido a que la temperatura afecta virtualmente todos los procesos bioquímicos y fisiológicos de los peces, esto considerando además que cada enzima posee una

temperatura óptima y que factores biológicos internos como la reproducción y el mismo crecimiento pueden afectar y cambiar los niveles óptimos de las funciones fisiológicas de los animales (Kita et al., 1996; Pérez *et al*., 2003; Das *et al*., 2004).

El metabolismo es dependiente de la temperatura de aclimatación, así como del periodo de aclimatación y de la especie. La tasa metabólica en peces, se mide indirectamente a través de la tasa de consumo de oxígeno (Das *et al.,* 2005). En este estudio las mayores tasas de consumo de oxígeno se encontraron a las temperaturas de aclimatación de 19 y 22°C, indicando que el metabolismo de los juveniles de *S. annulatus* está alterado y que posiblemente estas temperaturas se acercan al límite inferior de tolerancia de estos peces. Cuando los peces se encuentran a una temperatura que excede el óptimo, se refleja con una disminución en la tasa metabólica (Kita *et al*., 1996). En los juveniles de *S. annulatus* se observó dicha disminución en la tasa metabólica entre los 28 y 31°C.

La temperatura preferida final puede estimarse indirectamente con la relación entre el consumo de oxígeno y la temperatura de aclimatación; esto es expresándola en términos de Q_{10} y asumiendo que el efecto de la temperatura sobre el consumo de oxígeno es determinado por la influencia de la temperatura sobre la velocidad de las reacciones químicas (Kita *et al*., 1996, Das *et al*., 2005, Daoud *et al*., 2007). Los valores de Q_{10} obtenidos indican que entre 25 y 28°C la temperatura no ejerce un efecto significativo sobre el metabolismo, es decir S*. annulatus* se encuentra mejor adaptado en este intervalo térmico, lo cuál coincide con la temperatura preferida obtenida por el método agudo. La temperatura preferida final determinada en otros estudios coincidió también con el valor de Q_{10} en organismos como *Sebastiscus marmoratus* (Kita *et al*., 1996).

El valor Q_{10} a menudo no permanece igual a través de intervalo que un organismo puede tolerar. Si se calcula Q_{10} en intervalos relativamente cortos de temperatura dentro del intervalo de toleracia, se puede observar que por encima de cierta temperatura el valor de

Q_{10} permanece constante y posteriormente disminuye; conforme se alcanza el límite de temperatura letal superior se observaría una pronunciada caída en el consumo de oxígeno (Schmidt-Nielsen, 1997). En los juveniles de *S. annulatus se* observaron valores bajos de Q_{10} por encima y por debajo del intervalo de 25 a 28°C de temperatura, esto indica que fuera de este intervalo la temperatura afecta negativamente al metabolismo.

La temperatura óptima de crecimiento estimada se encuentra en el intervalo de temperatura preferida obtenida con Q_{10}. La temperatura óptima y las preferidas obtenidas están de acuerdo con reportes anteriores. En estudios sobre nutrición de *S. annulatus* se ha obtenido mayor crecimiento a temperaturas medias de: 29.6, 28.7, 27.7 y 25.6°C en organismos con peso inicial de 2.5, 12.7, 31.8 y 53.1 gramos respectivamente (García-Ortega, 2009).

Debido a las propiedades físicas del agua, los ectotermos acuáticos están particularmente en riesgo de estrés térmico (Schaefer, 2006). La temperatura crítica máxima (TCM) es considerada un buen indicador de la tolerancia térmica, que permite la identificación de las temperaturas a las cuales los primeros signos de estrés aparecen y es modificada por temperaturas estacionales y por temperaturas de aclimatación (Pérez *et al.*, 2003).

La temperatura crítica máxima determinada en juveniles de *S. annulatus* fue cercana a 40°C, al igual que muchos peces tropicales marinos como reportó Eme y Bennett (2009).

La temperatura de aclimatación influyó directamente sobre la tolerancia superior a la temperatura de los juveniles de *S. annulatus*. La relación entre las temperaturas de aclimatación y el nivel de tolerancia térmico ha sido demostrado en *Horabagrus brachysoma* (Dalvi *et al*., 2009), *Anabas testudineus* (Sarma et al., 2008), *Labeo rohita, Catla catla, Cirrhinus mrigala* (Das et al., 2004), *Cyprinus carpio* (Chatterjee et al., 2004), entre otros, corroborando así, que la adaptación a la temperatura es un fenómeno

fisiológico esencial en peces y es dependiente de la temperatura de aclimatación (Dalvi *et al*., 2009).

Beitinger y Bennett (2000) cuantificaron el efecto de la temperatura de aclimatación sobre la tolerancia térmica de varias especies de peces, encontrando que la aclimatación juega un rol más importante en la tolerancia a temperaturas bajas; lo cuál coincide los resultados de este trabajo y se puede observar con los valores de TRA.

La tasa de respuesta a la aclimatación (TRA) es un índice conveniente de la dimensión de aclimatación térmica alcanzada. El valor calculado de juveniles de *S. annulatus* fue de 0.22 a 0.38. Rajaguru (2002) en peces de estuario obtuvo valores de TRA de 0.20 en *Therapon jarbua* y 0.25 en *Etroplus suratensis*. Para especies de peces subtropicales Barrionuevo y Fernandes (1995) obtuvieron TRA de 0.38 a 0.47. Los datos existentes de TRA en diferentes especies de peces sugieren que especies subtropicales y tropicales tienen valores más altos y que los valores dependen de las temperaturas existentes en el hábitat (Pérez *et al*., 2003). Las especies de ambientes templados experimentan cambios de temperaturas graduales a largo plazo pudiendo tener tiempo suficiente para realizar cambios metabólicos que resulten en cambios sustanciales en sus intervalos de tolerancia; por otro lado especies subtropicales y tropicales experimentan cambios extremos en poco tiempo, por lo que deben tener un amplio intervalo de tolerancia para sobrevivir sin tener tiempo para aclimatarse (Johnson y Kelsch, 1998; Pérez *et al*., 2003).

VI. Conclusiones

Se obtuvieron los requerimientos térmicos de los juveniles de *S. annulatus* que contribuirá a la definición de las condiciones apropiadas para el cultivo de esta especie. La temperatura preferida fue de 26.7°C y la temperatura óptima de crecimiento se estimó en 25.93°C; ambas temperaturas se encuentran dentro del intervalo de preferencia térmica (25- 28°C) obtenido a partir Q_{10}.

La tolerancia térmica de estos peces es relativamente amplia y pueden adaptarse a cambios térmicos graduales (19-31°C).

El botete diana, *Sphoeroides annulatus,* puede cultivarse en zonas subtropicales o en condiciones controladas de temperatura; se recomienda mantener la temperatura del agua de cultivo a 26±2°C para favorecer el crecimiento y evitar el estrés térmico.

Para obtener mayor información sobre la fisiología térmica de esta especie, se requiere evaluar también la temperatura crítica mínima, la cuál no se consideró para los fines de este estudio. Hace falta además encontrar el óptimo térmico relacionado con tolerancia a la salinidad y con la alimentación para definir más ampliamente los requerimientos fisiológicos del botete diana.

Bibliografía

Aguilera, C. Reportaje 09 junio 2008. En *misPeces.com.* http://www.mispeces.com/ Consultado en Julio 2008

Arias Rodríguez, L., L.E. Roríguez Ibarra y G. del Valle-Pignataro. 2004. Efecto de la radiación UV en la inactivación genética del esperma de botete diana *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842). Ciencias Marinas. 30(3): 391-402 p.

Armour, C. 1991. Guidance for Evaluating and Recommending Temperature Regimes to Protect Fish. Serv. Biol. Rep. 90 (22): 13 p.

Barrionuevo, W.R., M.N. Fernandes. 1995. Critical thermal maxima and minima for curimbata *Prochilodus scrofa* Steindachner of two different sizes. Aquat. Res. 26: 447-450 p.

Beitinger, T.L., R.W. McCauley. 1990 Whole-animal physiological processes for the assessment of stress in fishes exposed to dynamic changes in temperature. J Great Lakes Res 16: 542-575 p.

Beitinger, T.L., W.A. Bennett, R.W. McCauley. 2000. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. Environ Biol Fishes. 58: 237-275 p.

Beitinger, T. L., y Bennett, W. A. 2000. Quantification of the role of acclimation temperature in temperature tolerance of fishes. Environmental Biology of Fishes. 58: 277-288 p.

Bond, C. 1996. Biology of Fishes. J. L. Alexander, Ed. US: Thomson Learning. Segunda Edición. Orlando. 891pp.

Bowser, P.R., G.A. Wooster, J. St Leger, J.G. Babish. 1992. Pharmacokinetics of enrofloxacin in fingerling rainbow trout . J Vet Pharmacol Ther. 15(1): 62-71 p.

Cavendish, M. 2001. Pufferfish. En: M. Cavendish (ed.). Aquatic Life of the World Marshall Cavendish Corporation. 442 p.

Chatterjee, N., A. Pal, S. Manush, T. Das, y S. Mukherjee. 2004. Thermal tolerance and oxygen consumption of *Labeo rohita* and *Cyprinus carpio* early fingerlings acclimated to three different temperatures. Journal of Thermal Bilogy. 29: 265-270 p.

Chávez-Sánchez, M.C., L. Álvarez Lajonchére, M.I. Abdo de la Parra y N. García Aguilar. 2008. Advances in the culture of the Mexican bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*, Jenyns (1842). Aquaculture Research. 39: 718-730 p.

Crockett, E. y R. Londraville. 2006. Temperature. En: D. Evans y J. Claiborne (eds.). The Physiology of Fishes. CRC Press, Taylor and Francis Group. Boca Raton, FL, U.S., 231-269p.

Dalvi, R.S., A.K. Pal, L.R. Tiwari, T. Das y B. Kartik. 2009. Thermal tolerance and oxygen consumption rates of the catfish *Horabagrus brachysoma* (Günther) aclimated to different temperatures. Aquaculture. 295: 116-119 p.

Daoud, D., D. Chabot, C. Audet y Y. Lambert. 2007. Temperature induced variation in oxygen consumption of juvenile and adult stages of the northern shrimp, *Pandalus borealis*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 347: 30-40 p.

Das, T., A.K. Pal, S.K. Chakraborty, S.M. Manush, N. Chatterjee y S.C. Mukherjee. 2004. Thermal tolerance and oxygen consumption of Indian Major Carps acclimated to four temperatures. Journal of Thermal Biology. 29: 157-163 p.

Das, T., A.K. Pal, S.K. Chakraborty, S.M. Manush, N.P. Sahu y S.C. Mukherjee. 2005. Thermal tolerance, growth and oxygen consumption of *Labeo rohita* fry (Hamilton, 1822) acclimated to four temperatures. Journal of Thermal Biology. 30: 378-383 p.

Díaz, F., D. Re, E. Sierra y G. Amador. 2004. Behavioural Thermoregulation and Critical Limits Applied to the Culture of Redclaw Crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens). Freshwater Crayfish. 14: 1-8 p.

Díaz, F., A.D. Re, R.A. González, L.N. Sánchez, G. Leyva y F. Valenzuela. 2007. Temperature preference and oxygen consumption of largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacépède) acclimated to different temperatures. Aquaculture Research. 1-8 p.

Dietrich, F. H. y T. J. Kearns. 1989. Basic Statistics an Infeerencial Approach. Dellen Publishing Company. Tercera edición. San Francisco. 745pp.

Eme, J. y W.A. Bennett. 2009. Critical thermal tolerance polygons of tropical marine fishes from Sulawesi, Indonesia. Journal of Thermal Biology. 34: 220-225 p.

Foreign Fishery Developments. 1989. Japan´s "Fugu" or Puffer Fish Market. Marine Fisheries Review. 51(1): 60-62 p.

Froese, R., y D, P. 2009. *FishBase*. Recuperado el 23 de Agosto de 2009, de www.fishbase.org

García Ortega, A. 2009. Nutrition and feeding research in the spotted rose snapper (*Lujanus guttatus*) and bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), new species for marine aquaculture. Fish Physiol Biochem. 35: 69-80 p.

Jobling, M. 1981. Temperature tolerance and the final preferendum-rapid methods for the assessment of optimum growth temperatures. J Fish Biol. 19: 439-455 p.

Johnson, J. A. y S.W. Kelsch. 1998. Effects of evolutionary thermal enviroment on temperature-preference relationships in fishes. Environmental Bilogy of Fishes. 53: 447-458 p.

Kelsch, S.W. y W.H. Neill. 1990 Temperature preference versus acclimation in fish: selection for changing metabolic optima. Transactions of the American Fisheries Society. 112: 424-430 p.

Kikuchi, K. 2006. Present Status of Research and Production of Tiger puffer Takifugu rubripes in Japan. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León.

Kita, J., S. Tsuchida y T. Segutoma. 1996. Tempetarure preference and tolerance, and oxygen consumption of the marbled rockfish, *Sebastiscus marmoratus*. Marine Biology. 125: 467-471 p.

Luna Figueroa, J., F. Díaz, y S. Espina. 2003. Preferred temperature of the mexican native cichlid *Cichlasoma istlanum* (Jordan and Snyder, 1899). Hidrobiológica. 13(4): 271-275 p.

Lutterschmidt, W.I. y V.H. Hutchison. 1997. The critical thermal maximum: history and critique. Can. J. Zool. 75: 1561-1574 p.

Noga, E. 2000. Fish Disease. Diagnosis and Treatment. Iowa State University Press.Primera Edición. Iowa. 325pp.

Ochoa, J. L., D.U. Hernández Becerril, S. Lluch Cota, B.O. Arredondo Vega, E. Nuñez Váquez, A. Heredia Tapia, J. Pérez Linares y R. Alonso Rodríguez. 2002. Marine biotoxins and harmful algal blooms in Mexico's Pacific Litoral. PICES Scie. Rep. 23: 152

Ochoa, J. L., E.J. Nuñez Vázquez, A. García Ortega e I. Abdo de la Parra. 2006. Inocuidad alimentaria: Estudio acerca de la toxicidad del botete diana (*Sphoeroides annulatus,* Jenyns, 1842), de cultivo. Panorama Acuícola Magazine. 22-27 p.

Paladino, F.V., J.R. Spotila, J.P. Schubauer y K.T. Kowalski. 1980. The critical thermal maximum: a technique used to elucidate physiological stress and adaptation in fish. Rev Can Biol 39: 155-122 p.

Pérez, E., F. Díaz y S. Espina. 2003. Thermoregulatory behavior and critical thermal limits of the angelfish *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein) (Pisces: Cichlidae). Journal of Thermal Bilogy. 28: 531-537 p.

Prosser, L. C. 1991. Environmental and Metabolic Animal Physiology. Wiley-Liss Inc. Cuarta edición. New York. 578pp.

Rajaguru, S. 2002. Critical thermal maximum of seven estuarine fishes. Journal of Thermal Biology. 27(2): 125-128 p.

Sánchez-Cárdenas, R., B.P. Ceballos Vázquez, M. Arellano Martínez, M.C. Valdez Pineda y R. Morán Angulo. 2007. Reproductive aspects of *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842) (Tetradontiformes, Tetraodontidae) inhabiting the Mazatlan coast, sinaloa, Mexico. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 42(3): 385-392 p.

Sarma, K., K. Pal, S. Ayyappan, T. Das, S. Manush, D. Debnath y K. Baruah. 2008. Acclimation of *Anabas testudineus* (Bloch) to three test temperatures influence thermal tolerance and oxygen comsumption. Fish Physiol Biochem. [DOI 10.1007/s10695-008-9293-3]

Schaefer, J., y A. Ryan. 2006. Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*. Journal of Fish Biology. 69: 722-734 p.

Schmidt-Nielsen, K. 1997. Animal Physiology: adaptation and enviroment. Cambridge University Press. Quinta edición. EEUU. 617pp.

Sumano López, H.S. y L. Ocampo Camberos. 1997. Farmacología Veterinara. McGraw-Hill Interamericana. Segunda edición. México. 685pp.

Tyler, James C. y Nancy Holcroft. 2007. Tetraodontiformes. triggerfishes, boxfishes, puffers (fugu), molas and allies. Versión 19 Febrero 2007. http://tolweb.org/Tetraodontiformes/52153/2007.02.19 En: The Tree of Life Web Project, *http://tolweb.org/*

Vargas-Cárdenas, Lizárraga-Partida, Portillo-López. 1999. Manual de prácticas de Laboratorio del curso: "Bacteriología Marina" Otros (Manual) Comunicaciones Académicas, Serie Acuicultura, CICESE 89pp. CTACO9901

Zar, J. H. 1996. Biostatistical Analysis. New jersey, United States of America: Prentice-Hall, Inc. Tercera edición. N.J.

_____

ANEXO

Mantenimiento de los organismos

Los peces *Sphoeroides annulatus* fueron instalados en los invernaderos del departamento de Biotecnología Marina. Un total de 500 juveniles con longitud total promedio de 6 cm, se mantuvieron en 12 acuarios de 400 litros y 2 de 2000L a 21 ± 1 °C con recambio constante de agua de mar (salinidad 35ppm) durante 27 días.

Posteriormente se inició la aclimatación a las siguientes temperaturas 19, 22, 25, 28 y 31 ±1 °C con 344 peces distribuidos en 13 acuarios con aireación constante y 35ppm de salinidad. La calidad de agua en estos acuarios se mantuvo en dos modalidades, 4 con recambio de agua constante y 9 con biofiltro. La temperatura se mantuvo con calentadores de 1000W conectados a un controlador térmico Moeller CI-K3-125-M. A cada acuario se le aumentó o disminuyó 1°C cada día para alcanzar las temperaturas experimentales antes mencionadas. Transcurridos 6 días de aclimatación, esta se interrumpió debido a que los peces mostraban signos clínicos de infección bacteriana. Todos los acuarios experimentales se cambiaron al sistema abierto y los acuarios con biofiltro se mantuvieron con recambio de agua parcial diariamente; pero en mayor proporción. Se dio tratamiento con antibiótico a los peces y adicionalmente se hizo un análisis parcial de las bacterias presentes en los organismos y en el agua de los acuarios.

Preparación de medios

Medio Zobell 500ml

- 375ml agua de mar añejada
- 1125ml agua destilada
- 2.5g bacto peptona
- 0.5g extracto de levadura
- 6.5g agar bacteriológico
- 0.5ml cloruro férrico al 0.01%

Serum fisiológico:
- 225ml agua de mar añejada
- 75ml agua destilada

Medio TCBS
- 500ml agua destilada
- 44.5g Agar TCBS

Bacterias en tejidos de botete diana (*S. annulatus*)

En marzo de 2009 se tomó como muestra un pez de aproximadamente 8 gramos de peso que presentaba signos de septicemia: lesiones epiteliales (enrojecimiento, hemorragia, erosión, necrosis) (Noga, 2000). Con la finalidad de analizar la concentración de bacterias en sus tejidos se realizaron cultivos en medio selectivo TCBS y medio no selectivo Zobell.

Conteo de bacterias:

Al pez muestra se le extrajeron las vísceras en condiciones asépticas; 1 g. de estas fue colocado en 9ml de serum fisiológico y macerado con un asa bacteriológica de plástico estéril; posteriormente se agitó con un vortex por periodos de 20 segundos. Con la finalidad de determinar las concentraciones de bacterias en dichos tejidos se realizaron diluciones seriadas al décimo (10^0, 10^{-1}, 10^{-2}).

De las soluciones 10^{-1} y 10^{-2} se tomó 0.1ml, se puso en cajas petri con los respectivos medios Zobell o TCBS y se esparció de acuerdo con la metodología descrita por Vargas *et al.* (1999). Las cajas fueron colocadas por un periodo de 24 horas a 28°C.

Figura 10. Bacterias obtenidas de vísceras de *S. annulatus* aisladas en medios Zobell y TCBS. Izquierda bacterias en medio Zobell 1x10^{-1}, Derecha bacterias en medio TCBS 1x10^{-1}

La cantidad de bacterias de los tejidos extraídos fueron mayores a 10^3 en ambos medios.

De las bacterias obtenidas de la dilución 10^{-2} en medio TCBS bacterias tipo vibrio, se tomaron 16 colonias y se sembraron en medio Zobell y se realizó una resiembra.

Antibiograma

Con las 16 colonias aisladas se puso a prueba la efectividad de Enrofloxacina para inhibir el crecimiento de estas bacterias. Se utilizaron en 3 concentraciones, partiendo de la dosis de 10mg/Kg de peso que en solución corresponde a 0.01mg/ml (10^0) (Bowser *et al*., 1992; Sumano López y Ocampo Camberos 1997; Noga, 2000).

Se utilizó Baytril tabletas de 150mg por lo tanto se disolvieron 0.028mg de tableta en 10ml de suero fisiológico para la concentración 10^{-1}, 0.28 para 10^0 y 2.8mg para 10^1.

En cajas con medio Zobell se sembraron las 16 colonias de bacterias y se colocó un disco de papel filtro impregnado de antibiótico de la solución correspondiente. La concentración base 10^0 resultó ser la mejor para inhibir el crecimiento de las bacterias aisladas de *S. annulatus*.

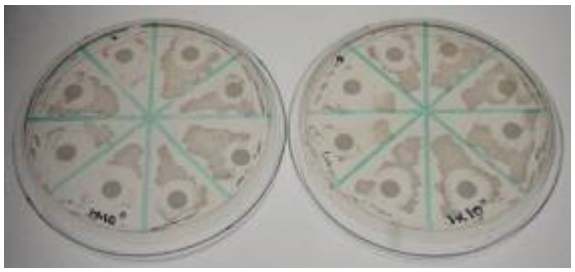

Figura 11. Antibiograma en 16 colonias de bacterias aisladas de botete diana con 0.01mg de Enrofloxacina

Tipos de colonias aisladas

Se resembraron las 16 colonias en medio Zobell y medio TCBS a partir de las cajas del antibiograma para comprobar que crecían en ambos medios. En ambos medios crecieron todas las colonias incubadas a 28°C a las 24 horas. De las 16 colonias, 14 son de color amarillo, es decir fermentan la sacarosa (números: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15 y 16); las número 5 y 12 son de color verde por lo tanto no fermentan la sacarosa.

Finalmente las 16 colonias de bacterias se resembraron, ahora para conservarlas en colección. A partir de las bacterias aisladas anteriormente en medio Zobell en cajas de petri se sembró cada colonia en frascos con este mismo medio de cultivo.

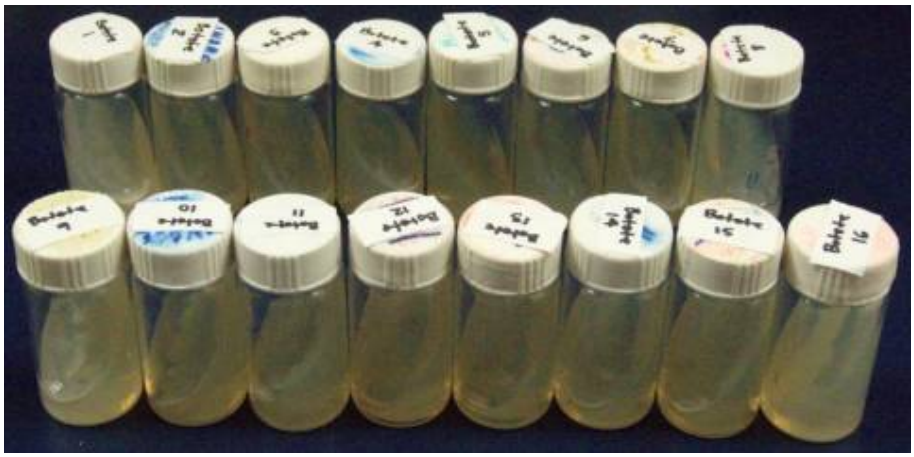

Figura 12. Colección de bacterias tipo vibrio (BTCBS) aisladas de vísceras de Botete diana *S. annulatus*

Bacterias en muestras de agua marina

Se tomaron muestras de agua de los acuarios, de las tomas de agua del sistema cerrado y del sistema abierto en frascos estériles de 30ml. Muestras:

De diluciones de 10^{-1} y 10^{-2} se tomó 0.1ml de cada solución, se esparció en cajas petri con medio Zobell o TCBS respectivamente de acuerdo con la metodología descrita por Vargas *et al.* (1999) y se incubó por 24 horas a 28°C; esto se hizo por duplicado.

Muestras de agua:

S.C. = sistema cerrado
S.A. = sistema abierto
A2 = acuario con biofiltro
C1 = acuario con biofiltro
B2 = acuario sin biofiltro
D1 = acuario con biofiltro

Conteo Bacteriológico

Tabla VI. Conteo bacteriológico de muestras de agua de los sistemas y acuarios utilizados para el mantenimiento de *S. annulatus* en medios Zobell y TCBS

Medio	SC	SA	A2	B2	C1	D1
Zobell UFC/mL	2×10^4	1.6×10^4	9×10^4	3×10^3	2×10^5	2×10^4
TCBS UFC/mL	2×10^1	2×10^1	3×10^3	1×10^3	2×10^4	1×10^3

El agua de recambio del sistema cerrado y el abierto tuvieron un número similar de bacterias totales y de bacterias tipo vibrio en la fecha en que se tomaron las muestras. Los acuarios con biofiltro presentaron más bacterias que el acuario sin biofiltro posiblemente porque en los primeros el recambio de agua tarda más en completarse.

Una vez que los peces superaron la infección se reanudó la aclimatación a cinco temperaturas con 300 organismos aproximadamente.