

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA  
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

---

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA SALINIDAD CONSTANTE SOBRE EL  
CONSUMO DE OXÍGENO, EXCRECIÓN NITROGENADA Y LA  
OSMORREGULACIÓN EN BOTETE DIANA  
(*Spherooides annulatus*, Jenyns 1842).**

**TESIS**

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

Presenta:

**JAVIER PÉREZ ROBLES**

Ensenada, Baja California, México, julio del 2010.

**RESUMEN** de la tesis de **Javier Pérez Robles**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ciencias de la vida con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada Baja, California. Julio del 2010.

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA SALINIDAD CONSTANTE SOBRE EL  
CONSUMO DE OXÍGENO, EXCRECIÓN NITROGENADA Y LA  
OSMORREGULACIÓN EN BOTETE DIANA  
(*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842).**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Fernando Díaz Herrera  
Director de tesis

Se evaluó el efecto de seis salinidades (10, 17, 23, 29, 35 y 41 ppm) sobre la tasa de consumo de oxígeno (TCO), tasa de excreción de amonio (TEA), la relación atómica oxígeno-nitrógeno (O:N), y la osmorregulación en juveniles de botete diana *Sphoeroides annulatus*. Se encontró que la salinidad no ejerció un efecto significativo en la TCO, TEA y la relación O:N ( $p > 0.05$ ), los valores para la TCO fueron de 20.42 a 46.87 mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>, obteniéndose un patrón de respuesta del tipo I de acuerdo a Kinne (1977), la TEA tuvo un intervalo de 0.361 a 0.980 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> h<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>, y la relación atómica O:N de presentó valores de 32.00 a 96.16 indicando que el botete utilizó como sustrato metabólico una mezcla de proteínas y lípidos como sustrato energético. El patrón de osmorregulación del botete fue hiposmótico en las salinidades de 23, 29, 35 y 41 ups e hiperosmótico en las salinidades de 10, 17 ppm. El punto isosmótico de los juveniles del botete diana fue de 356 mmol kg<sup>-1</sup> (10.5 ppm). Se concluyó que *S. annulatus* es un organismo osmorregulador eficiente que puede ser cultivado en bajas y altas salinidades.

**Palabras clave:** Metabolismo respiratorio, excreción de amonio, relación O:N, capacidad osmorreguladora.

**ABSTRACT** of the thesis presented by Javier Pérez Robles as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in life sciences with orientation in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California, México July 2010.

**ANALYSIS OF THE EFFECT ON CONSTANT SALINITY ON OXYGEN CONSUMPTION, NITROGEN EXCRETION AND THE OSMOREGULATION IN BULLSEYE PUFFER (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842).**

Study of osmoregulation in juvenile bullseye puffer *Sphoeroides annulatus* was done to evaluate the effect of six salinities (10, 17, 23, 29, 35 y 41 psu) on the oxygen consumption rate (OCR), ammonium excretion rate (AER), the atomic ratio (O:N) and osmoregulatory pattern. It was not found a significant effect on salinity changes on the OCR, AER and the O:N ratio ( $p > 0.05$ ), the OCR values were from 20.42 to 46.87 mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>, obtained a response pattern, type I according to Kinne (1977). AER had an interval from 0.361 to 0.980 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> h<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>, and the atomic ratio O:N showed levels from 32 to 96 indicating that the puffers use a metabolic substrate mixture of proteins and lipids as energy substrate. The pattern of osmoregulation of puffers was hyposmotic in salinities of 23, 29, 35 and 41 psu and hyperosmotic in salinities of 10, 17 psu. The isosmotic point of juvenile of bullseye puffer was 356 mmol kg<sup>-1</sup> (10.5 psu). It was concluded that *S. annulatus* is an efficient osmoregulator organism and can be grown at low and high salinities.

**Key words:** Respiratory metabolism, ammonia excretion, atomic ratio O:N, osmoregulatory capacity.

*Para la familia Salcedo-Miranda  
Por toda su ayuda*

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca otorgada durante los estudios de maestría.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada CICESE; al programa de posgrado en ciencias, a los departamentos de Biotecnología Marina, Acuicultura, Microbiología y servicios escolares.

Al Dr. Fernando Díaz Herrera por su apoyo, dirección y consejos otorgados para la elaboración de este trabajo de tesis.

A la Dra. Ana Denise Re Araujo por su constante participación, asesoría y revisiones en este proyecto.

A la Dra. Ivone Giffard Mena por su colaboración, consejos y revisiones finales de este trabajo.

Al M. en C. Luis Humberto Mendoza Garcilazo por formar parte del comité evaluador y por participar en las revisiones finales de la tesis.

A los técnicos Ernesto Lerma y Manuel Parra por su cooperación y apoyo logístico durante los experimentos.

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

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>Resumen en español</b>	<b>i</b>
<b>Resumen en inglés</b>	<b>ii</b>
<b>Dedicatorias</b>	<b>iii</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>iv</b>
<b>Contenido</b>	<b>v</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de Tablas</b>	<b>vii</b>
<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>II. Objetivos</b>	<b>12</b>
<b>III. Materiales y métodos</b>	<b>13</b>
<b>III.1 Aclimatación</b>	<b>13</b>
<b>III.2 Consumo de oxígeno y excreción de amonio</b>	<b>13</b>
<b>III.3 Relación atómica Oxígeno:Nitrógeno</b>	<b>18</b>
<b>III.4 Osmorregulación</b>	<b>18</b>
<b>IV. Resultados</b>	<b>20</b>
<b>IV.1 Consumo de oxígeno y excreción de amonio</b>	<b>20</b>
<b>IV.2 Relación atómica Oxígeno:Nitrógeno</b>	<b>24</b>
<b>IV.3 Osmorregulación</b>	<b>26</b>
<b>V. Discusión</b>	<b>32</b>
<b>VI. Conclusión</b>	<b>38</b>
<b>Bibliografía o Literatura citada</b>	<b>40</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática del cuerpo de <i>S. annulatus</i> .	2
2	Distribución geográfica del botete diana.	3
3	Respirómetro utilizado para medir el consumo de oxígeno y excreción de amonio en las salinidades de prueba en <i>S. annulatus</i> .	15
4	Esquema de una de las cámaras del respirómetro.	15
5	Medición de las muestras en el espectrofotómetro para determinar la concentración de amonio.	17
6	Extracción de sangre y branquias de un ejemplar de <i>S. annulatus</i> .	19
7	Consumo de oxígeno de <i>S. annulatus</i> en las seis salinidades de prueba; 10, 17, 23, 29 35 y 41 ppm a temperatura constante 25 °C.	21
8	Excreción de amonio de <i>S. annulatus</i> en las seis salinidades de prueba; 10, 17, 23, 29 35 y 41 ppm.	23
9	Variación de la relación atómica oxígeno:nitrógeno (O:N) en <i>S. annulatus</i> en las seis salinidades de prueba; 10, 17, 23, 29 35 y 41ppm.	26
10	Relación entre la concentración de la sangre y la osmolaridad del medio externo en <i>S. annulatus</i> aclimatado a diferentes salinidades y a temperatura constante de 25 °C.	30
11	Capacidad osmorreguladora de juveniles de <i>S. annulatus</i> aclimatado a 10, 17, 23, 29, 35, 41ppm y a 25 °C.	30

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA</b>		<b>Página</b>
<b>I</b>	Valores de tasa de consumo de oxígeno (TCO) y resultados del análisis de varianza.	20
<b>II</b>	Valores de la tasa de excreción de amonio (TEA) de los peces aclimatados a las salinidades de prueba.	22
<b>III</b>	Resultados de la prueba de análisis de varianza para la TEA.	23
<b>IV</b>	Resultados obtenidos de la relación atómica oxígeno:nitrógeno O:N de <i>S. annulatus</i> en las salinidades de prueba.	24
<b>V</b>	Resultados de la prueba de análisis de varianza para la relación atómica oxígeno:nitrógeno O:N.	25
<b>VI</b>	Valores de la concentración del plasma sanguíneo y resultados del análisis de varianza.	28
<b>VII</b>	Resultado de la prueba de comparación entre medias utilizando el método de Tukey para la concentración del plasma sanguíneo.	29

## I. INTRODUCCIÓN

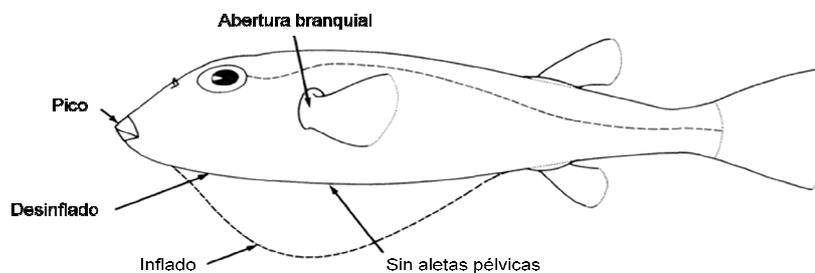
---

Los estuarios son ecosistemas importantes para el ciclo de vida de muchas especies de animales, poseen una gran riqueza de flora y fauna y tienen una gran importancia ecológica y comercial, ya que muchas de estas especies presentan gran potencial para la acuicultura. En México existen diferentes tipos de sistemas lagunares estuarinos (Roldán-Pérez y Ramírez-Restrepo, 2008). Estos ambientes están influenciados por los ciclos mareales, y por el flujo de agua dulce proveniente de ríos o arroyos, esto hace que sean lugares dinámicos en donde ocurren variaciones de temperatura, salinidad y oxígeno. La fauna que habita estos sistemas tiene la capacidad de tolerar las variaciones físico-químicas que se presentan, aquí convergen especies de peces de origen marino (estenohalinos y eurihalinos), estuarinos y dulceacuícolas. Los peces son un grupo de organismos importante para los sistemas lagunares-estuarinos debido a su rol ecológico en las redes tróficas, además, son de gran importancia económica para el hombre, por lo que es necesario conocer su biología, ecología, fisiología y todos los mecanismos que utilizan para habitar este tipo de ambientes (Val *et al.*, 2006).

El botete diana *Sphoeroides annulatus*, (Jenyns 1842) es un teleósteo marino que habita las zonas costeras, se puede encontrar en aguas someras y zonas arenosas, es común encontrarlo dentro de esteros, lagunas costeras, manglares y en áreas cerca de las desembocaduras de ríos (Thompson *et al.*, 2000; Chávez-Sánchez *et al.*, 2008). En su ambiente natural y durante todos sus estadios de vida se enfrenta a fluctuaciones de salinidad, ya que los adultos migran a estos sistemas lagunares-estuarinos de febrero a junio para desovar, los juveniles se mantienen en estas áreas para alimentarse y posteriormente migran hacia aguas

costeras (Duncan *et al.*, 2003). En la zona costera la salinidad relativamente más estable, pero los estuarios se caracterizan por ser zonas donde se presentan fluctuaciones de salinidad y temperatura (Prodocimo y Freire, 2004).

El botete diana pertenece a la familia Tetraodontidae, que agrupa alrededor de 120 especies de peces, la mayoría son marinos y pueden ser encontrados en aguas tropicales y subtropicales de los océanos del mundo. Son peces de talla pequeña a moderada, de cuerpo robusto o romo, son capaces de inflarse inhalando agua o aire. Tienen una cabeza grande y obtusa, mandíbulas en forma de pico (constituida por cuatro dientes grandes y fuertes, dos en cada mandíbula); aberturas branquiales sin opérculos o solapas dérmicas. Las aletas dorsal y anal se encuentran en una posición muy posterior, no tienen espinas, y las aletas pélvicas están ausentes (Figura 1). Los peces de esta familia no presentan escamas dérmicas y las líneas laterales no están bien definidas (FAO 1995).



**Figura 1.** Representación esquemática del cuerpo de *S. annulatus* (Tomado de FAO, 1995).

Esta especie se distribuye desde San Diego California, inclusive el Golfo de California, hasta Pisco, Perú y las islas Galápagos (Figura 2), puede encontrarse en todo el litoral del Pacífico Mexicano. Es comúnmente atrapado en redes de

arrastre sobre sustratos blandos; los juveniles viven en estuarios (FAO 1995; Castro-Aguirre *et al.*, 1999).



**Figura 2.** Distribución geográfica del botete diana (Modificado de Google Maps 2010; US Dept of State Geographer).

En México, el cultivo de botete diana es el más importante en cuanto a peces globo se refiere, la exportación ha aumentado de 33 toneladas en 1993 a 198 toneladas en 1997 tan solo en la Península de Baja California. En el Estado de Sinaloa, en el 2000 se produjeron 147.6 toneladas con un valor superior a los \$226,600 USD, en esta zona los peces se cultivan de manera semi-intensiva utilizando sistemas de recirculación (Chávez-Sánchez *et al.*, 2008).

Desde 1996 se han realizado estudios con esta especie enfocados a su crianza, reproducción, alimentación y desarrollo en el Centro de Investigación y Desarrollo (CIAD) en Mazatlán, México, y el Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES). En el 2008 se logró estandarizar su reproducción en cultivo (Chávez-Sánchez *et al.*, 2008). Actualmente esta especie es considerada de alto valor comercial (\$125.00 m.n. kg<sup>-1</sup>), debido al color, textura y sabor de su carne. Su demanda en el mercado está en aumento y posee potencial para exportación. Además, en el noreste del país existe una gran demanda al igual que algunos países asiáticos como Japón y Corea, en donde esta especie alcanza un valor muy alto en el mercado (Arias-Rodríguez, *et al.*, 2004; Ochoa, *et al.*, 2006; Sánchez-Cárdenas, *et al.*, 2007; Chávez-Sánchez *et al.*, 2008).

Los peces teleósteos que habitan en los estuarios poseen mecanismos fisiológicos para la regulación osmótica de sales, y el balance de agua-sales dentro de los tejidos y fluidos internos. Esta capacidad de regulación osmótica es de suma importancia para evitar deshidratación o dilución de los fluidos corporales en aguas de salinidades bajas. Los fluidos internos de los peces de agua dulce presentan una mayor concentración osmótica con respecto al medio, en cambio los peces de origen marino presentan un medio interno mas diluido con respecto al agua de mar. La regulación de la concentración osmótica en peces adultos es efectuada principalmente por el riñón, las branquias, el tubo digestivo y la piel en menor escala (Bond, 1996).

La osmolaridad de la sangre de la mayoría de los teleósteos marinos va de 370 a 480 mOsm kg<sup>-1</sup>, lo que hace que el agua tienda a salir pasivamente del interior de los peces al medio externo y particularmente los iones de sodio y cloro se difunden en dirección opuesta. Esto requiere una regulación activa para que los peces

puedan mantener sus fluidos internos más diluidos que el agua de mar (Jobling, 1995).

Los peces tienen tres estrategias fundamentales para manejar la composición de los fluidos extracelulares: 1) Osmoconformidad, cuando la osmolaridad del plasma de los peces es igual a la del medio; 2) hiper-osmorregulación, cuando los fluidos corporales son regulados a un nivel más alto con respecto a su medio; y 3) hipo-osmorregulación, cuando el fluido corporal es regulado para mantener un nivel osmótico más bajo con respecto a su medio (Evans y Claiborne, 2006)

La salinidad afecta la tasa de crecimiento debido a que influye sobre el costo energético que el organismo invierte en mantener una regulación iónica y osmótica adecuada (Arjona *et al.*, 2009). Los peces osmorreguladores necesitan consumir energía para efectuar los ajustes osmóticos necesarios, esto es conocido como trabajo osmótico (Tosm). Los osmoconformadores se benefician de no gastar recursos metabólicos en osmorregulación, su medio interno se mantiene en igualdad a la concentración del medio externo presentando una alta permeabilidad osmótica ( $\sim 1.28 \text{ cm s}^{-1} \times 10^{-4}$ ) comparado con los teleósteos marinos ( $\sim 0.074$  a  $0.29 \text{ cm s}^{-1} \times 10^{-4}$ ) (Evans y Claiborne, 2006). Los teleósteos marinos necesitan regular activamente la osmolaridad de su medio interno para poder mantener una concentración interna menor que la del medio exterior, ya que la osmolaridad del agua de mar es de aproximadamente  $1000 \text{ mOsm kg}^{-1}$  y la del medio interno debe mantenerse alrededor de los  $400 \text{ mOsm kg}^{-1}$  (Bond, 1996).

El mantenimiento del equilibrio interno ácido-base implica el balance de los iones  $\text{H}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  que está relacionado con el movimiento de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . En los teleósteos marinos los transportadores apicales de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  de las branquias

mantiene este equilibrio. Mientras que la excreción de sal se efectúa por cotransportadores de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}_2^-$ , y por canales de  $\text{Cl}^-$  que hacen que  $\text{Na}^+$  salga atravesando las uniones celulares. La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa mantiene la concentración intracelular del  $\text{Na}^+$  (Clairbone *et al.*, 2007).

No solo las células branquiales son las responsables de efectuar los procesos de osmorregulación, también existen otros órganos que participan en las funciones osmorreguladoras de los peces marinos y de agua dulce. Estos órganos son: la piel y membrana opercular, el riñón, tracto gastrointestinal, la vejiga urinaria, y la glándula rectal en el caso de los elasmobranquios (Evans y Claiborne, 2006).

En los ambientes acuáticos, la disponibilidad del  $\text{O}_2$  depende de factores ambientales como la temperatura, estación, materia orgánica, pH, y  $\text{CO}_2$  disuelto, afectando a la demanda de  $\text{O}_2$  de los organismos. El oxígeno disuelto disminuye por acción de la respiración de los organismos acuáticos, y es agregado por difusión a partir de la atmósfera, y por la fotosíntesis de los productores primarios. Dependiendo del balance entre la producción de  $\text{O}_2$  y la respiración, el agua poco profunda puede ser hiperóxica (alta saturación de  $\text{O}_2$ ) durante el día, hipóxica (baja concentración de  $\text{O}_2$ ) o totalmente carente de oxígeno (anóxica) durante la noche. Aunque todos los vertebrados requieren el  $\text{O}_2$  para efectuar sus procesos metabólicos, los peces poseen el sistema de adaptación más diverso en cuanto a función y morfología debido a las propiedades del agua (Evans y Claiborne, 2006).

El consumo de oxígeno de los teleósteos depende de las condiciones ambientales; temperatura, pH, salinidad, luz, estadio de vida, alimento disponible, y otros y es una respuesta fisiológica que se puede correlacionar con las variaciones de los factores ambientales, debido a que la tasa respiratoria está

relacionada con el metabolismo y el flujo de energía que los organismos usan en sus mecanismos de control homeostático. La salinidad y la temperatura son los factores abióticos más importantes que influyen en el metabolismo de los organismos acuáticos. Los cambios en la salinidad del medio modifican directamente los mecanismos de osmorregulación de los organismos y su efecto se refleja en el consumo de oxígeno y excreción nitrogenada (Zheng *et al.*, 2008; Salvato *et al.*, 2001).

Se han realizado pocos trabajos de ecofisiología en botete diana, sin embargo se tienen investigaciones relacionadas con su alimentación, reproducción, crecimiento, y cultivo (Duncan *et al.*, 2003; Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2007; García-Ortega 2008; Chávez-Sánchez *et al.*, 2008). Estos trabajos proporcionan la información más actualizada sobre sus condiciones de cultivo y sus necesidades alimenticias que permiten la optimización de su producción. También Komar *et al.* (2004) evaluaron el efecto del agua aireada, filtrada y esterilizada (con UV) sobre la sobrevivencia y viabilidad de los huevos de *S. annulatus*. Encontraron que el agua aireada y esterilizada tuvo un efecto positivo sobre la sobrevivencia de los huevos, determinando que las bacterias y hongos afectan considerablemente su viabilidad.

Reyes-Hernández (2009) realizó un estudio evaluando el efecto de la temperatura de aclimatación, sobre la temperatura preferida, termotolerancia y consumo de oxígeno en *S. annulatus*. Se probaron seis temperaturas de aclimatación (19, 22, 25, 28 y 31 °C), y utilizando el método agudo y la temperatura crítica máxima (TCM) se logró concluir en base a la TCO que la temperatura preferida se encontró en 26 °C.

Se han realizado algunos trabajos ecofisiológicos con otras especies de la familia Tetraodontidae; como el realizado por Yan *et al.*, (2003) en donde se reviso el efecto de la salinidad sobre el crecimiento y sobrevivencia en *Fugu obscurus* a una temperatura constante (22 °C). Posteriormente Freire y Prodocimo (2004) realizaron un estudio con *S. testudineus* y *S. greeley* con el objetivo de determinar su comportamiento osmorregulador cuando estas especies son sometidas a bajas salinidades. Después Kato *et al.* (2005) realizaron un estudio sobre el comportamiento osmorregulador con seis especies de peces globo; *Takifugu obscurus*, *T. rubripes*, *T. niphales*, *T. pardalis*, *T. poecilonotus* y *T. porphyreus*. Más tarde Lee *et al.* (2005) realizaron un estudio sobre la tolerancia a bajas salinidades en *Takifugu rubripes*, esta especie de pez globo tiene gran importancia comercial en Japón. Iwata y Kikuchi (2006) realizaron otro trabajo con *T. rubripes* en donde se reviso el efecto de la temperatura y la densidad de cultivo sobre el crecimiento. También Yang y Chen (2006) evaluaron la tolerancia de embriones de *T. obscurus* a diferentes salinidades. Posteriormente Zhang *et al.* (2010) revisaron el efecto de la salinidad sobre larvas y huevos de *T. flavidus* ya que esta especie tiene gran importancia para la acuicultura en China.

Sin embargo existen otros trabajos importantes en peces estuarinos en donde se revisa el efecto de la salinidad sobre el metabolismo. Ejemplos de estos trabajos son los siguientes: Nordlie (1977) realizó una investigación sobre el efecto de la salinidad sobre el consumo de oxígeno en *Ambassis interrupta*. Después Moser y Hettler (1989) revisaron el efecto de la salinidad y la temperatura sobre el metabolismo de rutina en *Leiostomus xanthurus*. Se determinó la tasa de consumo de oxígeno de rutina (QO<sub>2</sub>), y encontraron que al aumentar la temperatura aumentó el QO<sub>2</sub>. Posteriormente Moser y Gery (1989) evaluaron el efecto de los cambios de salinidad sobre el comportamiento, distribución, y sensibilidad fisiológica en dos especies de peces estuarinos; *Leiostomus xanthurus* y *Micropogonias undulatus*. Más tarde Aristizabal-Abud (1992) reviso el efecto de la

salinidad y el peso sobre el metabolismo en *Micropogonias furnieri* midiendo la tasa de consumo de oxígeno  $QO_2$ . Nordlie *et al.* (1992) realizaron un estudio para comparar el comportamiento de osmorregulación y la tolerancia a diferentes salinidades en poblaciones de *Poecilia latipinna*. Posteriormente Moser y Miller (1994) revisaron el efecto de las variaciones de salinidad sobre el metabolismo en juveniles de *Leiostomus xanthurus*. Wright *et al.* (1995), cuantificaron la excreción de amonio y urea en *Oligocottus maculosus* por efecto de la reducción de la salinidad. Haney y Nordlie (1997) cuantificaron el efecto de la salinidad sobre la tasa metabólica y la tensión crítica de oxígeno en *Cyprinodon variegatus*. Después Swanson (1998) evaluó en *Chanos chanos* el efecto de la salinidad sobre la tasa metabólica, la actividad, y la osmorregulación. Plaut (2000) realizó un estudio con *Aphanius dispar* evaluando el efecto de diferentes salinidades sobre la tasa metabólica y la velocidad de natación. Sampaio y Bianchini (2002) analizaron el efecto de la salinidad sobre la osmorregulación y el crecimiento en el pez eurihalino *Paralichthys orbignyanus*. Posteriormente García-López *et al.* (2006) realizaron un trabajo en juveniles del robalo común (*Centropomus undecimalis*). Fiess *et al.* (2007) evaluaron el efecto de la salinidad y la temperatura sobre la habilidad osmorreguladora, la concentración de osmolitos orgánicos y el perfil de hormonas en plasma sanguíneo en la tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Más tarde Fielder *et al.* (2007) realizaron un estudio con juveniles de *Pagrus auratus* evaluando el efecto de la salinidad sobre la osmorregulación y la morfología de las células de cloro. Después Zheng *et al.* (2008) revisaron el efecto de la temperatura y la salinidad sobre el consumo de oxígeno y excreción de amonio en juveniles de *Miichthys miiuy*. Arjona *et al.* (2009) revisaron el efecto de tres salinidades (15, 25 y 39 ppm) sobre el crecimiento, osmorregulación y metabolismo energético en *Solea senegalensis*.

Como se puede constar, se han realizado diversos estudios sobre la osmorregulación de peces eurihalinos, sin embargo existen escasos trabajos en el

botete diana, el cual posee un gran potencial para la acuicultura en costas del Pacífico mexicano.

Las pesquerías en México enfrentan una crisis por la sobrepesca, cambios ambientales y por la sobrepoblación humana. La maricultura puede ser una opción para minimizar estos problemas y poder incrementar la producción de alimentos para cubrir la demanda. Sin embargo, la maricultura se ha centrado en pocas especies de peces, camarones y bivalvos, pero recientemente ha surgido la necesidad de cultivar otras especies con potencial y de esta forma incrementar la diversificación de los cultivos. Por esta razón es importante evaluar el potencial acuícola de diferentes especies nativas (Chávez-Sánchez *et al.*, 2008).

El desarrollo de toda la tecnología necesaria para cultivar botete requiere tiempo y estudios multidisciplinarios. En este sentido, los estudios fisiológicos aportan información importante para optimizar las condiciones de cultivo, ya que los efectos de la salinidad sobre el consumo de oxígeno se reflejan en la tasa metabólica y por ende en el desarrollo y crecimiento adecuado de los organismos acuáticos (Chávez-Sánchez *et al.*, 2008). La salinidad afecta la tasa de crecimiento debido a que influye sobre el costo energético que el pez invierte en mantener una regulación iónica y osmótica adecuada (Arjona *et al.*, 2009). Medir directamente la tasa de consumo de oxígeno (TCO) en función de la salinidad proporciona información acerca de las consecuencias energéticas que enfrentan estos organismos al habitar en zonas con salinidades variables (Zheng *et al.*, 2008). Es importante conocer la relación de consumo de oxígeno y excreción de amonio (O:N) porque permite conocer que sustratos (carbohidratos, proteínas o lípidos) están siendo usados para la obtención de energía así como también pueden ser utilizados como indicadores de estrés (Zheng *et al.*, 2008). Además, los criterios más importantes para determinar si una especie tiene el potencial para

la acuicultura son; alto valor en el mercado y una alta tolerancia a cambios de salinidad y temperatura (Chávez-Sánchez *et al.*, 2008). A pesar de que esta especie sea considerada como eurihalina, no existe suficiente información ecofisiológica que respalde tal aseveración, por lo tanto es necesario generar el conocimiento de base sobre el efecto de la salinidad sobre diferentes respuestas fisiológicas, para contar con elementos sólidos que permitan optimizar sus condiciones de cultivo y mejorar su producción acuícola.

En este trabajo se pretende determinar el grado de eurihalinidad de *Sphoeroides annulatus* así como identificar específicamente los niveles fisiológicos de su concentración osmótica del plasma sanguíneo. Adicionalmente verificaremos que no existan diferencias significativas en la tasa de consumo de oxígeno y la tasa de excreción de amonio por efecto de la salinidad.

## II. OBJETIVOS

---

### II.1 General:

Analizar diferentes respuestas fisiológicas en juveniles de *Sphoeroides annulatus* aclimatados a diferentes salinidades.

### II.2 Particulares:

- Medir la tasa de consumo de oxígeno (TCO) y la tasa de excreción de amonio (TEA) de *S. annulatus* aclimatado a salinidades constantes y mantenidos en una temperatura constante.
- Determinar la relación atómica Oxígeno:Nitrógeno (O:N) en los juveniles del botete diana aclimatados a diferentes salinidades.
- Cuantificar la osmolaridad del plasma sanguíneo en los juveniles de *S. annulatus* expuestos a salinidades constantes así como determinar su capacidad osmorreguladora.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---

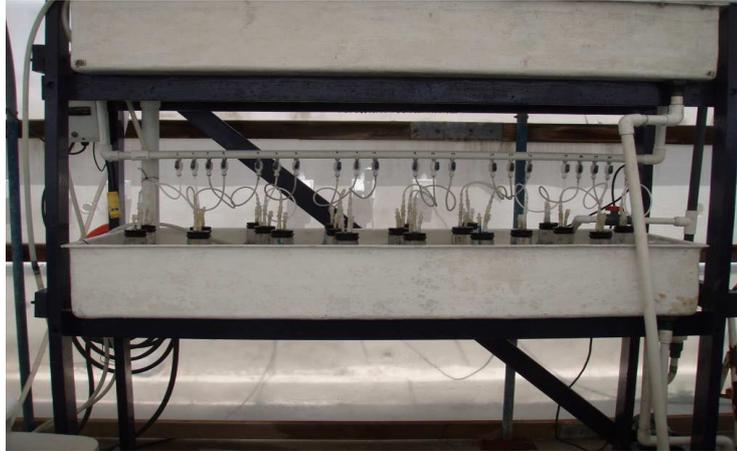
#### III.1 Aclimatación.

Para medir el consumo de oxígeno y la excreción de amonio en salinidades constantes se utilizaron 120 juveniles de botete diana *Sphoeroides annulatus* (128 g de peso promedio) obtenidos del Centro Reproductor de Especies Marinas del estado de Sonora (CREMES), México. Se aclimataron durante 20 días a las salinidades de prueba: 10, 17, 23, 29 35, y 41 ppm y a una temperatura constante de  $25 \pm 2$  °C. El agua de las diferentes salinidades se preparó a partir de agua de mar y agua dulce de clorada que fueron tomadas del sistema de recirculación del CICESE. Los organismos se colocaron en seis estanques de 2000 litros, diariamente se realizaron recambios de agua del 70%, todos los días se registró la salinidad y la temperatura en una bitácora para tener un mayor control sobre las condiciones experimentales. Los organismos fueron alimentados diariamente (por la mañana y por la tarde) a saciedad utilizando una mezcla de alimento comercial balanceado al 45% de proteína y se añadió 50% de calamar congelado y picado para satisfacer el nivel de proteína que requiere esta especie, de acuerdo a las recomendaciones de Reyes-Hernández (2009).

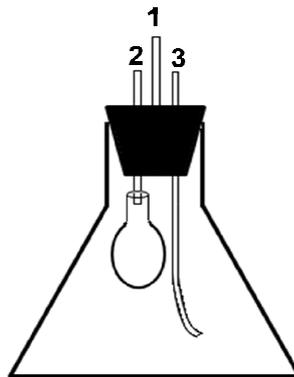
#### III.2 Consumo de oxígeno y excreción de amonio.

Para determinar el consumo de oxígeno del botete diana en cada una de las salinidades de prueba, se utilizó un sistema respirométrico de recirculación como el descrito por Díaz *et al.* (2008) con capacidad para 20 organismos y un control (Figura 3), el respirómetro se llenó con agua a la salinidad correspondiente y se mantuvo a una temperatura constante de 25 °C utilizando calentadores de titanio de 1000W conectados a un controlador térmico Moeller CI-K3-125-M. Previo a efectuar las mediciones los peces fueron pesados y mantenidos en ayuno por 24

horas, 18 horas antes de comenzar el experimento fueron colocados en cada una de las cámaras del sistema dejando una vacía como control. Las cámaras utilizadas constaron de un matraz de 3.0 litros sellado con un tapón de caucho, el cual tiene una válvula en donde se permite la entrada de agua aireada y la salida de agua con baja concentración de oxígeno, además cuenta con una entrada para permitir inflar un globo que desplaza el agua interior del matraz, así, el agua puede salir por la válvula para leer la concentración de oxígeno en la muestra en un oxímetro YSI 52, dotado de un sensor polarográfico (Figura 4). En cada caso se midió el consumo de oxígeno y el porcentaje de saturación inicial. Al finalizar las mediciones iniciales de oxígeno disuelto se iban cerrando en cada cámara el flujo de agua durante 30 minutos ya que de acuerdo a Stern *et al*, (1987) es el tiempo adecuado para que el la disminución de oxígeno disuelto no sea menor a 30%. Pasado este tiempo se realizó la medición final y se reabrió el flujo de agua aireada para la recuperación de los organismos, Nuevamente se dejaron pasar 30 minutos para permitir un recambio de agua en las cámaras, después se realizó una segunda medición del consumo inicial y final como repetición. La cámara veintiunava fue utilizada como control para medir el consumo de oxígeno de los microorganismos presentes para posteriormente hacer las correcciones necesarias. Después de cada experimento los organismos utilizados se regresaron a su estanque de aclimatación.



**Figura 3.** Imagen del respirómetro utilizado para medir el consumo de oxígeno y excreción de amonio en las salinidades de prueba.



**Figura 4.** Esquema de una de las cámaras del respirómetro. 1; entrada de agua aireada, 2; entrada de agua para inflar el globo, 3; salida del agua hacia el oxímetro.

Se creó una base de datos para el análisis de la información y determinar la tasa de consumo de oxígeno (TCO) de los organismos expuestos a cada salinidad de prueba. Para esto se consideró la hora inicial y final, la concentración de oxígeno inicial y final, y el peso húmedo del organismo. La TCO se calculó mediante la ecuación 2:

$$\text{TCO} = (C_t - C_0) V / (W \times T) \quad (2)$$

donde  $C_t$ ,  $C_0$ ; es el cambio en el contenido de oxígeno ( $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ),  $V$  es el volumen de la botella control antes y después de las pruebas,  $W$  fue el peso de *S. annulatus* (g) y  $T$  el tiempo de duración (h), respectivamente (Zheng *et al.*, 2008).

Para realizar las mediciones de excreción de amonio y poder determinar la tasa de excreción de amonio (TEA) se siguió el mismo procedimiento que el descrito para la medición del consumo de oxígeno. Para este caso, en cada medición se tomaron 10 mL de agua de cada cámara para medir la concentración de amonio utilizando el método de azul de indofenol de Rodier (2000). Las muestras de agua se colocaron en tubos de ensayo lavados con ácido clorhídrico al 5% y enjuagados con agua destilada y se etiquetaron previamente. Al mismo tiempo se adicionaron los reactivos necesarios para inducir a la reacción en la que se forma el azul de indofenol el cual fue directamente proporcional a la cantidad de amonio presente en la muestra.

La reacción se llevo a cabo mezclando 10 mL de agua de muestra, 0.4 mL de solución alcohólica de fenol, 0.4 mL de solución de nitroprusiato sódico y 1 mL de solución oxidante. Los tubos de ensayo fueron debidamente cubiertos con PARAFILM® y se dejaron incubar por una hora. Una vez que la reacción produjo el color final, las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro de absorbancia (DR/4000U Spectrophotometer) (Figura 5). La concentración de amonio se determinó mediante una curva de calibración, con cloruro de amonio como indicador. La TEA se cálculo mediante la ecuación 3:

$$\text{TEA} = (C'_t - C'_0) V / (W \times T) \quad (3)$$

donde  $C_t$ ,  $C'_0$ ; es el cambio en la excreción de amonio inicial y final ( $\text{mg NH}_4^+ \text{h}^{-1} \text{kg}^{-1}$ ),  $V$  es el volumen de la botella control antes y después de las pruebas,  $W$  fue el peso de *S. annulatus* (g) y  $T$  el tiempo de duración (h), respectivamente (Zheng *et al.*, 2008).



**Figura 5.** Medición de las muestras en el espectrofotómetro para determinar la concentración de amonio.

Los datos del consumo de oxígeno y de la excreción de amonio se graficaron en cajas en paralelo (SigmaPlot 11.0); dentro de las cajas el 50% de los datos se distribuyeron alrededor de la mediana y los intervalos de confianza. Se utilizó un análisis de varianza de una vía para determinar el efecto de la salinidad sobre estas dos variables previa determinación de normalidad y homoscedasticidad de los datos (SigmaStat 3.1).

### III.3 Relación atómica Oxígeno:Nitrógeno.

La relación atómica oxígeno:nitrógeno (O:N) fue calculada utilizando los valores obtenidos del consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada de los botetes expuestos a las diferentes salinidades. Se calculó mediante la ecuación 4 descrita por Flores *et al.* (2008):

$$\text{O:N} = \text{peso atómico (NH}_4^+) / \text{peso atómico (O}_2) * [\text{QO}_2] / [\text{NH}_4^+] \quad (4)$$

dónde  $[\text{QO}_2]$ , es el consumo de oxígeno, y  $[\text{NH}_4^+]$  es el amonio total excretado por los organismos. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente por medio de una prueba de análisis de varianza de una vía para determinar si existieron diferencias significativas ( $p = 0.05$ ) utilizando el software SigmaStat v. 3.1, los resultados se graficaron en SigmaPlot v. 11.0.

### III.4 Osmorregulación.

Para determinar la presión osmótica de los peces de cada salinidad experimental; se tomaron 10 organismos, se anestesiaron con 2-Phenoxy-ethanol (0.8 mL/litro), se decapitaron, se tomó la sangre con una jeringa de 3 mL (estéril) directamente de la aorta dorsal y se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  (Figura 6), el resto se mezcló con 300  $\mu\text{L}$  de una solución 1:1 de heparina (anticoagulante) para posteriores análisis. Simultáneamente se extrajeron las branquias y se congelaron a  $-70^\circ\text{C}$  para otros estudios. La osmolaridad de la hemolinfa y del agua fue determinada con un osmómetro de vapor Wescor 5520 y los datos se expresan en  $\text{mmol kg}^{-1}$ . Se calculó la capacidad osmorreguladora (CO) como la diferencia entre la osmolaridad de la sangre y la del medio externo, los datos fueron expresados en  $\text{mmol kg}^{-1}$  (Díaz *et al.*, 2001).



**Figura 6.** Extracción de sangre y branquias de un ejemplar de *S. annulatus*. La sangre fue tomada directamente de la aorta dorsal con una jeringa de 3 mL.

## IV. RESULTADOS

---

### IV.1 Consumo de oxígeno y excreción de amonio.

Los resultados de la TCO en las diferentes salinidades de prueba se presentan en la Tabla I, y en la Figura 7 se grafica su nivel de variación y se hace una comparación. Los resultados indican que al aumentar la salinidad el consumo de oxígeno y la excreción de amonio no se vieron afectados, es decir, la salinidad no ejerce un efecto significativo sobre la TCO y la TEA, este resultado se corroboró con el análisis de varianza. Los intervalos de valores para la TCO fueron de 20.42 a 46.87 mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>, para la TEA de 0.361 a 0.980 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> h<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>.

**Tabla I.** Valores de la tasa de consumo de oxígeno de *S. annulatus* (TCO) y resultados del análisis de varianza (N; número de mediciones).

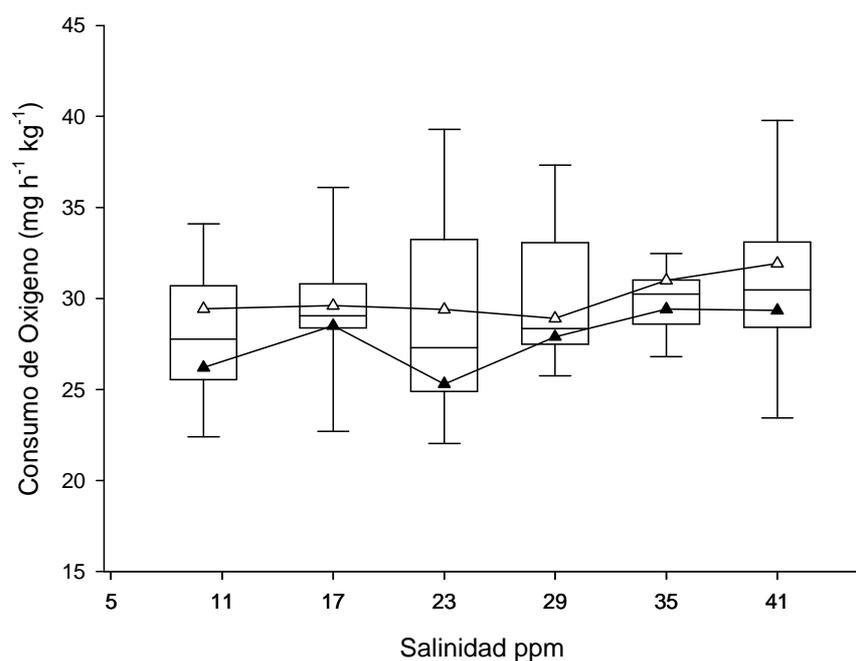
Salinidad ppm	N	TCO (mg O <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup> )	Mediana	Cuartiles	
				25%	75%
10	20	21.65 – 34.64	27.76	25.80	30.50
17	20	21.12 – 39.79	29.04	28.41	30.74
23	20	21.99 – 43.19	27.30	25.24	32.71
29	20	22.83 – 37.85	28.35	27.54	32.72
35	17	24.05 – 32.96	30.24	28.70	31.00
41	19	20.42 – 46.87	30.48	28.65	32.63

Para saber si existieron diferencias significativas entre los tratamientos se realizó un análisis por el método de Kruskal-Wallis debido a que no se presentó igualdad entre las varianzas ( $p < 0.05$ ), se plantearon las siguientes hipótesis y los resultados se muestran en la Tabla I:

Ho:  $\mu = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$

Ha:  $\mu \neq \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_6$ , o al menos una diferente.

No se detectaron diferencias entre los tratamientos ( $H = 5.635$ ,  $p > 0.05$ ), por lo tanto no se rechaza Ho. Es decir, no hay diferencias estadísticamente significativas en el consumo de oxígeno en las diferentes salinidades, y no fue necesario realizar pruebas para la comparación entre medias.



**Figura 7.** Variación del consumo de oxígeno de *S. annulatus* en las seis salinidades de prueba; 10, 17, 23, 29 35 y 41 ppm y a temperatura constante 25 °C. Las barras indican la distribución de los datos alrededor de la mediana, la línea central representa a la mediana. El área delimitada por triángulos representa a los intervalos de confianza al 95%.

Los resultados de la tasa de excreción de amonio en juveniles de *S. annulatus* en las salinidades experimentales se muestran en la Tabla II.

**Tabla II.** Valores de la tasa de excreción de amonio de *S. annulatus* (TEA) aclimatados a las salinidades de prueba (N; número de mediciones).

Salinidad ppm	N	TCO (mg O <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup> )	Mediana	Cuartiles	
				25%	75%
10	20	0.380 – 0.940	0.574	0.528	0.737
17	20	0.361 – 0.954	0.595	0.491	0.764
23	20	0.393 – 0.885	0.587	0.521	0.686
29	20	0.404 – 0.770	0.607	0.493	0.643
35	20	0.401 – 0.953	0.589	0.528	0.700
41	20	0.406 – 0.980	0.693	0.547	0.823

Se utilizó un análisis de varianza de una vía ( $p = 0.05$ ) y se determinó si existe un efecto de la salinidad sobre la excreción de amonio, manejando las hipótesis de trabajo:

$$H_0: \mu = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$$

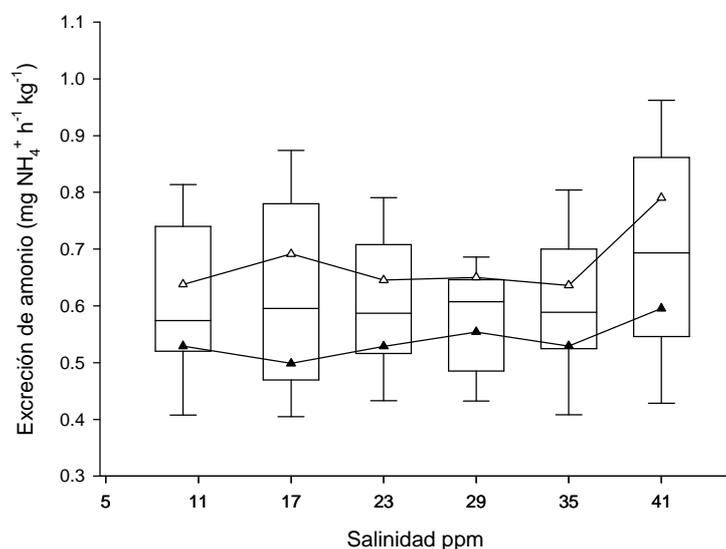
$H_a: \mu \neq \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_6$ , o al menos una diferente.

En la Tabla III se presentan los resultados de esta prueba de análisis de varianza para la TEA y en la Figura 8 el nivel de variación encontrado por salinidad.

**Tabla III.** Resultados de la prueba de análisis de varianza para la tasa de excreción de amonio (TEA). F; estadístico “F” (zonas de rechazo), GL; grados de libertad, MC; media de cuadrados,  $p$ ; probabilidad mínima de rechazo de  $H_0$ , SC; suma de cuadrados.

Nivel de variación	GL	SC	MC	F	P
Entre grupos	5	0.136	0.0273	1.462	0.208
Residual	114	2.128	0.0187		
Total	119	2.264			

En base al resultado del análisis de varianza; no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la TEA en cada una de las salinidades de prueba ( $p > 0.05$ ), por lo que se acepta  $H_0$ . No fue necesario realizar una prueba para la comparación entre medias.



**Figura 8.** Variación de la excreción de amonio de *S. annulatus* en las seis salinidades de prueba; 10, 17, 23, 29, 35 y 41 ppm. Las barras indican la distribución de los datos alrededor de la mediana, la línea central representa la mediana. El área delimitada por triángulos representa a los intervalos de confianza al 95%.

## IV.2 Relación atómica Oxígeno:Nitrógeno.

Los resultados de la relación O:N de los peces aclimatados en cada una de las salinidades de prueba se muestran en la Tabla IV

**Tabla IV.** Resultados obtenidos de la relación atómica oxígeno:nitrógeno O:N de *S. annulatus* en las salinidades de prueba (N; número de mediciones).

Salinidad ppm	N	O:N	Mediana	Cuartiles	
				25%	75%
10	20	33.45 – 81.87	48.594	45.077	60.768
17	20	32.00 – 96.16	60.094	39.958	66.043
23	20	33.40 – 91.78	55.757	46.183	63.488
29	20	44.49 – 92.99	58.089	50.030	65.165
35	20	37.16 – 92.59	59.171	45.423	65.863
41	20	32.77 – 84.37	48.735	38.922	66.386

Se utilizó un análisis de varianza de una vía ( $p = 0.05$ ) para determinar si existen diferencias significativas entre los valores de la relación O:N en cada una de las salinidades, los resultados de la prueba se muestran en la Tabla V; se manejaron las siguientes hipótesis de trabajo:

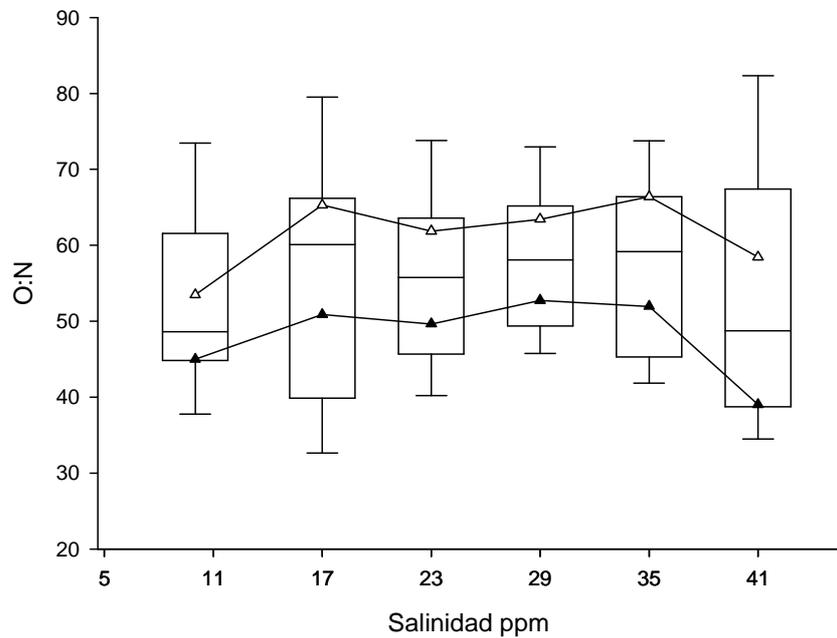
$$H_0: \mu = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$$

$H_a: \mu \neq \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_6$ , o al menos una diferente.

**Tabla V.** Resultados de la prueba de análisis de varianza para la relación O:N. F; estadístico "F" (zonas de rechazo), GL; grados de libertad, MC; media de cuadrados,  $p$ ; probabilidad mínima de rechazo de  $H_0$ , SC; suma de cuadrados.

<b>Nivel de variación</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>MC</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Entre grupos	5	586.17	117.234	0.55	0.738
Residual	110	23440.45	213.095		
Total	115	24026.62			

En general se obtuvieron valores medios para la relación O:N de 48.0 a 60.0 (ver tabla V), sin embargo, en base al resultado del análisis de varianza; no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las relaciones O:N en cada una de las salinidades de prueba ( $p > 0.05$ ), por lo que se acepta  $H_0$ . No fue necesario realizar una prueba para la comparación entre medias. Se observa que al incrementar la salinidad la relación O:N no se ve afectada (Figura 9).



**Figura 9.** Variación de la O:N en *S. annulatus* en las seis salinidades de prueba; 10, 17, 23, 29 35 y 41 ppm. Las barras indican la distribución de los datos alrededor de la mediana, la línea central representa la mediana. El área delimitada por triángulos representa a los intervalos de confianza al 95%.

### IV.3 Osmorregulación.

En la Figura 10 se muestra la relación entre la osmolaridad de la sangre y la osmolaridad de medio externo, en ella se aprecia un comportamiento lineal, el cual fue corroborado con un análisis de regresión, y se obtuvo el siguiente resultado:

$$MI = 300.99 + (0.0570 \times ME), r^2 = 0.90$$

dónde MI es la osmolaridad del medio interno de los peces y ME es la osmolaridad del medio externo. La pendiente con un valor de 0.057 indicó que *S. annulatus* puede ser considerado como un fuerte osmorregulador. La concentración del medio interno de los peces mantenidos en las salinidades de prueba se muestra

en la tabla VI. La capacidad osmorreguladora se esquematiza en la Figura 11 donde se observa que el botete tuvo un patrón de regulación hiposmótico en salinidades de 23 a 41 ppm e hiperosmóticos en salinidades de 10 a 17 ppm.

De acuerdo al análisis de varianza, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la concentración interna de los organismos en las diferentes salinidades, y la prueba de comparación entre medias señaló que la concentración interna de los peces aclimatados a 35 ppm fue estadísticamente diferente que la concentración interna de los mantenidos a 10 y 17 ppm, también los peces mantenidos a 41 ppm presentaron una concentración interna diferente a los peces mantenidos a 10 y 17 ppm. En la Figura 10 se observa que al aumentar la salinidad la concentración del medio interno aumentó ligeramente.

Se realizó un análisis de varianza de una vía por el método de Kruskal-Wallis debido a que no se presentó igualdad entre las varianzas ( $p < 0.05$ ), para verificar si existen diferencias significativas entre las concentraciones del plasma sanguíneo de los peces aclimatados en las diferentes salinidades de prueba, los resultados del análisis se muestran en la Tabla VI. Se manejó el siguiente juego de hipótesis:

Ho:  $\mu = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$

Ha:  $\mu \neq \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_6$ , o al menos una diferente.

**Tabla VI.** Valores de la concentración del plasma sanguíneo y resultados del análisis de varianza (N; número de mediciones).

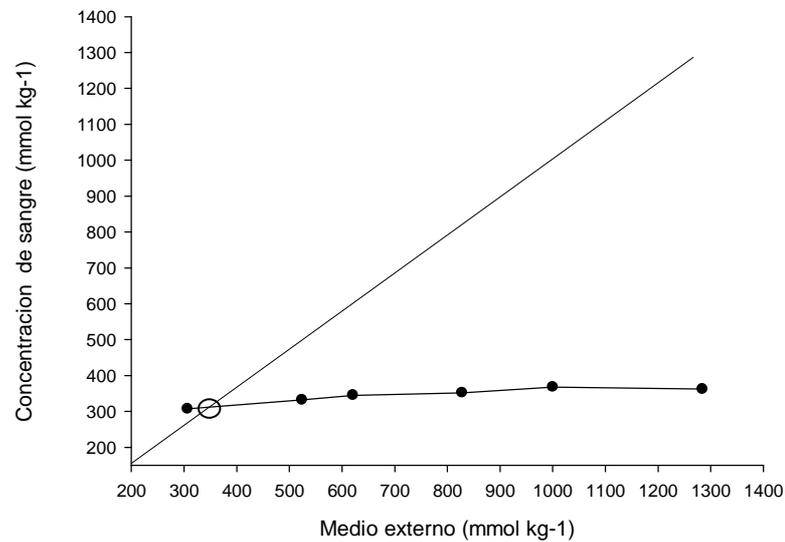
Salinidad ppm	N	Concentración de plasma (mmol kg <sup>-1</sup> )	Mediana	Cuartiles	
				25%	75%
10	10	244 - 347	315.0	266	318
17	10	324 - 359	328.0	325	331
23	10	329 - 367	343.5	337	346
29	10	287 - 443	340.0	336	375
35	10	348 - 385	371.0	359	376
41	10	345 - 395	360.0	349	363

En este caso se detectaron diferencias significativas entre las concentraciones del plasma sanguíneo en los peces aclimatados a las diferentes salinidades de prueba ( $H = 33.032$ ,  $p < 0.001$ ), y se rechazó  $H_0$ . Debido a este resultado, fue necesario realizar una prueba Tukey para la comparación entre medias, y los resultados se muestran en la tabla VII.

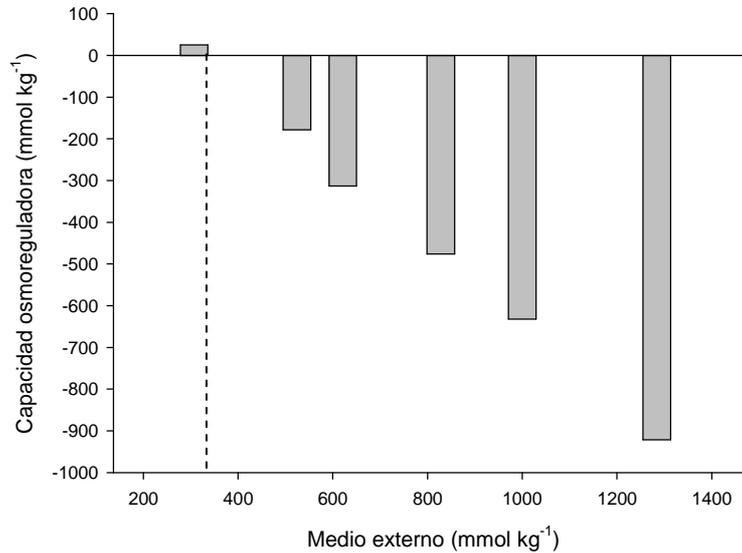
**Tabla VII.** Resultado de la prueba de comparación entre medias utilizando el método de Tukey para la concentración del plasma sanguíneo.  $q$ ; estadístico de prueba “ $q$ ” (zona de rechazo),  $p$ ; probabilidad mínima de rechazo.

<b>Comparación Salinidad ppm</b>	<b>Diferencias entre rangos</b>	<b>q</b>	<b><math>p &lt; 0.05</math></b>
35 vs 10	374.5	6.78	Si
35 vs 17	287.0	5.20	Si
35 vs 23	173.0	3.13	
35 vs 29	161.0	2.92	
35 vs 41	42.5	0.77	
41 vs 10	332.0	6.01	Si
41 vs 17	244.5	4.43	Si
41 vs 23	130.5	2.36	
41 vs 29	118.5	2.15	
29 vs 10	213.5	3.87	
29 vs 17	126.0	2.28	
29 vs 23	12.0	0.22	
23 vs 10	201.5	3.65	
23 vs 17	114.0	2.06	
17 vs 10	87.5	1.58	

En la Tabla VII se muestra que la concentración del plasma sanguíneo en los peces aclimatados a las salinidades de 10 y 35 ppm fue estadísticamente diferente.



**Figura 10.** Relación entre la concentración de la sangre y la osmolaridad del medio externo en *S. annulatus* aclimatado a diferentes salinidades y a temperatura constante de 25 °C. El punto isosmótico se encuentra en 356 mmol kg<sup>-1</sup>. La línea de 45° representa la isoosmolaridad.



**Figura 11.** Capacidad osmoreguladora de juveniles de *S. annulatus* aclimatado a 10, 17, 23, 29, 35, 41 ppm y a 25 °C. El cruce de la línea punteada con las abscisas representa el punto isosmótico.

En base a los resultados obtenidos en las Figuras 10 y 11 se encontró que el punto isosmótico de *S. annulatus* está alrededor de  $356 \text{ mmol kg}^{-1}$  que corresponde a 10.5 ppm.

## V. DISCUSIÓN

---

Se sabe que en los teleósteos marinos el consumo de oxígeno y la excreción de amonio están influenciados por factores externos como la salinidad y la temperatura (Zheng *et al.*, 2008; Salvato *et al.*, 2001; Evans y Claiborne, 2006; García-López *et al.*, 2006). Sin embargo en este trabajo no se detectaron diferencias significativas en la TCO del botete diana aclimatado a las salinidades de prueba, por lo que la salinidad no ejerció un efecto significativo sobre el consumo de oxígeno en *S. annulatus*. Referente al efecto de la salinidad sobre la tasa de consumo de oxígeno en animales acuáticos, Kinne (1967) describió cuatro tipos de respuestas fisiológicas; (1) la tasa de consumo de oxígeno no es influenciada por la salinidad, (2) la tasa metabólica de los organismos se incrementa en salinidades reducidas y disminuye en salinidades altas, (3) la tasa metabólica se incrementa tanto en salinidades altas como en bajas, y (4) la tasa de consumo de oxígeno disminuye en bajas como en altas salinidades.

*S. annulatus* exhibió la respuesta tipo 1. De igual manera Nordlie (1977) al aclimatar peces de la especie *Ambassis interrupta* a diferentes salinidades y a una temperatura constante de 25 °C por dos semanas no encontró diferencias estadísticas en el consumo de oxígeno, sin embargo observó un ligero incremento en el consumo de oxígeno a partir de 70% de agua de mar. Haney y Nordlie (1997) encontraron en *Cyprinodon variegatus* que la tasa de tensión crítica de oxígeno no se afectó por cambios de salinidad de 0 a 40 ppm. En *Aphanius dispar* Plaut (2000) encontró que el consumo de oxígeno no se modificó en las salinidades de <1, 35 y 70 ppm. Zheng *et al.*, (2008) al revisar el efecto de cinco temperaturas y tres salinidades sobre el consumo de oxígeno en *Miichtys miiuy* no detectaron diferencias significativas en la tasa de consumo de oxígeno en las salinidades de 26 a 31 ppm. Moser y Gery (1989) evaluaron el efecto de los

cambios de salinidad sobre la tasa de consumo de oxígeno en dos especies de peces estuarinos, *Leiostomus xanthurus* y *Micropogonias undulatus* y obtuvieron que al aumentar la salinidad no hubo un aumento significativo en la tasa de consumo de oxígeno en ambas especies. Moser y Miller (1994) revisaron el efecto de las variaciones de salinidad sobre el metabolismo respiratorio en juveniles de *Leiostomus xanthurus*. Probaron diferentes salinidades a temperatura constante (25 °C), y encontraron que al aumentar la salinidad esta no afecto de manera significativa el  $QO_2$ . Finalmente Swanson (1998) evaluó en *Chanos chanos* el efecto de diferentes salinidades sobre la tasa metabólica, y encontro que la tasa de consumo de oxígeno fue constante en el intervalo de 15 a 55 ppm. Cabe señalar que estas especies analizadas son consideradas eurihalinas y se encuentran en ambientes con salinidades variables muy similares a los que *S. annulatus* habita.

De acuerdo al efecto de la salinidad sobre la TCO en *S. annulatus* se puede relacionar con características osmorreguladoras típicas de peces eurihalinos, esto contrasta con resultados obtenidos en otras especies de la familia Tetraodontidae. Kato *et al.* (2005) realizaron un estudio sobre el comportamiento osmorregulador con seis especies de peces globo; *Takifugu obscurus*, *T. rubripes*, *T. niphales*, *T. pardalis*, *T. poecilonotus* y *T. porphyreus*. Se probaron tres condiciones de salinidad; agua de mar (100% agua de mar), agua salobre (14% agua de mar) y agua dulce (0% agua de mar), los peces fueron expuestos a estas condiciones con la finalidad de comparar su comportamiento osmorregulador y su sobrevivencia. Encontraron que cuando los peces fueron transferidos a agua dulce únicamente *T. obscurus* sobrevivió más de cuatro días y las otras especies no tuvieron esta capacidad. En este sentido el botete diana posee una mayor capacidad de soportar variaciones de salinidad que estas especies de peces globo que actualmente se cultivan en Asia, en este sentido, solo *T. obscurus* posee características similares ya que puede tolerar bajas salinidades, agua salobre y

altas salinidades, las demás especies analizadas no tienen esta capacidad y son consideradas estenohalinas.

En cuanto a la excreción de amonio se encontró que la salinidad no influyó de manera significativa en esta respuesta fisiológica, por lo que *S. annulatus* no se vio afectado por esta variable. Este resultado contrasta con lo encontrado en otras especies de peces eurihalinos: Wright *et al.* (1995) aclimataron juveniles de *Oligocottus maculosus*, en este caso los peces se mantuvieron por tres días a una salinidad de 31 ppm y una temperatura constante de 12 °C. Encontraron que al disminuir la salinidad (50% de agua de mar y 50% de agua dulce) la excreción de amonio aumentó 2.8 veces más y la de urea 3.5 veces más, pero después de una semana de dejar a los peces a dichas salinidades, los valores de excreción regresaron a los niveles normales. Encontraron que esta especie tiene una gran capacidad de adaptación a los cambios de salinidad, comportamiento muy similar al de otros teleósteos eurihalinos. García-López *et al.* (2006) encontraron en *Centropomus undecimalis* que al disminuir la salinidad la TEA se incrementó significativamente, después de la alimentación (valores máximos de 2 a 4 horas después) y al incrementar la salinidad esta disminuyó, en este sentido el valor máximo de la TEA se observó en las salinidades de 0, 12 y 25 ppm y el mínimo a 35 ppm.

Por los resultados en la TEA se puede inferir que *S. annulatus* posee gran capacidad de adaptarse a diferentes salinidades, ya que su metabolismo nitrogenado no se vio afectado por los cambios de salinidad, esto es similar con los resultados obtenidos por Zhen *et al.* (2008) en *Miichthys miiuy* ya que no detectaron diferencias significativas en la tasa de excreción de amonio al exponerlo a un intervalo de salinidades de 26 a 31 ppm.

Se conoce que la relación O:N es un indicador del sustrato metabólico que los organismos utilizan bajo diferentes condiciones ambientales para la obtención de energía (Mayzaud y Conover 1988; Rocha *et al.*, 2005; García-López *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2008). Valores de O:N de 3 a 16 indican catabolismo de proteínas, valores de 50 a 60 indican un catabolismo mixto de proteínas y lípidos y valores mayores de carbohidratos. Widdows (1978) señala que valores pequeños de la relación O:N pueden ser un indicador de estrés en los organismos. En este trabajo se encontraron valores de la relación O:N para *S. annulatus* mayores a 50 pero menores a 60. En base a esto se puede inferir que bajo las condiciones de experimentación, *S. annulatus* utilizó una mezcla de proteínas y lípidos, para obtener energía, y esto indica que no hubo un estrés al exponerlo a las salinidades de prueba. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Zheng *et al.* (2008) en el pez eurihalino *Miichthys miiuy*, ya que no detectaron diferencias significativas en los valores de O:N por efecto de la salinidad. Por el contrario García-López *et al.* (2006) reportaron en *Centropomus undecimalis*, especie que suele habitar los mismos ecosistemas lagunares estuarinos que *S. annulatus* detectaron diferencias significativas en los valores de O:N, ya que al disminuir la salinidad los valores de O:N disminuyeron, y se concluyó que las bajas salinidades fueron estresantes para *C. undecimalis*. En otro pez eurihalino *Sparus sarba* Woo y Kelly (1995) encontraron que reorganizó su metabolismo a favor del catabolismo de proteínas en bajas salinidades, pero en la salinidad en que es isosmótico utilizó una mezcla de lípidos y carbohidratos como sustrato metabólico.

La osmolaridad del plasma en *S. annulatus* fue relacionada de manera lineal a la salinidad ambiental como se ha descrito para otros teleósteos eurihalinos (Sampaio y Bianchi 2002; Laiz-Carrion *et al.*, 2005; Herrera *et al.*, 2009). El botete diana puede ser considerado como un organismo fuertemente osmorregulador, ya que presentó una pendiente de osmorregulación de 0.057, y concuerda con la obtenida en organismos osmorreguladores, ya que una desviación de la pendiente

de la línea isosmótica refleja el grado de la capacidad de regulación, de tal forma que; pendiente = 0 corresponde a un organismo osmorregulador, pendiente = 1 es un organismo osmoconformador (Evans y Claiborne, 2006; Re *et al.*, 2004).

El patrón de osmorregulación obtenido para *S. annulatus* contrasta con los encontrados por García-López *et al.* (2006) en *Centropomus undecimalis*, ya que la presión osmótica disminuyó al disminuir la salinidad (376 mOsm kg<sup>-1</sup> a 35 ppm y 322 mOsm kg<sup>-1</sup> a 0 ppm) solo se detectaron diferencias significativas entre las salinidades de 35 y 0 ppm. En *Poecilia latipinna* Nordlie *et al.* (1992) encontró que la osmolaridad del medio interno aumentó conforme aumentó la salinidad. Swanson (1998) obtuvo que al disminuir la salinidad, la concentración osmótica en el medio interno de *Chanos chanos* disminuyó, sin embargo después de un tiempo adecuado de aclimatación, la concentración interna regreso a sus valores iniciales y no fueron significativamente diferentes. Sampaio y Bianchini (2002) reportaron que en *Paralichthys orbignyanus* la concentración interna estuvo en función de la salinidad, ya que al aumentar esta, la concentración interna aumentó.

*S. annulatus* tuvo un comportamiento osmorregulador hiperosmótico a bajas salinidades (10 ppm) e hiposmótico a altas salinidades (17, 23, 29, 35 y 41 ppm). Este resultado es similar al obtenido por Prodocimo y Freire (2004) en juveniles de *Sphoeroides testudineus* y *S. greeley*, en este caso se disminuyó la salinidad de 35 a 4 ppm en un periodo de 5 horas, no se detectaron diferencias significativas en el comportamiento osmorregulador de ambas especies. Las dos especies fueron hiposmóticas en salinidades de 14 y 29 ppm e hiperosmóticas a 4 ppm, encontrando el punto isosmótico en 360 mmol kg<sup>-1</sup>. También Kato *et al.* (2005) encontraron que *Takifugu obscurus*, y *T. niphales* presentaron un comportamiento osmorregulador similar, determinaron el punto isosmótico en 392 mmol kg<sup>-1</sup> en *T.*

*obscurus* aclimatado a agua salada y de  $300 \text{ mmol kg}^{-1}$  en *T. nipholes* aclimatado en agua dulce. Lee *et al.* (2005) realizaron un estudio similar, y revisaron la tolerancia a bajas salinidades en *Takifugu rubripes*, para determinar la capacidad de esta especie para adaptarse a los cambios de salinidad, encontraron que el plasma sanguíneo de *Takifugu rubripes* permaneció constante cuando los peces fueron aclimatados a diluciones de agua de mar de 25, 50 y 75%, y el punto isosmótico se obtuvo alrededor de los  $260 \text{ mOsm kg}^{-1}$ . Sampaio y Bianchini (2002) en el pez eurihalino *Paralichthys orbignyanus* analizaron el efecto de la salinidad sobre la osmorregulación. Se estimó el punto isosmótico alrededor de  $328.6 \text{ mOsm kg}^{-1}$  y correspondió a 10.9 ppm de salinidad. Herrera *et al.* (2009) en el pez eurihalino *Dicologlossa cuneata*, obtuvieron que los peces aclimatados a salinidades de 5, 15, 25, 35 y 55 ppm se comportaron como osmorreguladores con un punto isosmótico de  $384 \text{ mOsm kg}^{-1}$  que se encontró a una salinidad de 10 ppm.

En este estudio el punto isosmótico para el botete diana se determinó que estuvo alrededor de los  $356 \text{ mmol kg}^{-1}$  en cual está dentro del intervalo reportado para otras especies de peces eurihalinas. Desde una perspectiva osmorreguladora, el flujo de agua e iones entre el medio interno y el externo puede ser nulo y el trabajo osmótico en esta salinidad isosmótica puede ser mínimo.

## VI. CONCLUSIÓN

---

Se determinaron diferentes respuestas fisiológicas de juveniles de *S. annulatus* aclimatados a salinidades constantes y a temperatura constante, en términos de su tasa de consumo de oxígeno, tasa de excreción de amonio y su patrón de osmorregulación.

- *S. annulatus* tuvo una gran capacidad para soportar un amplio intervalo de salinidad, ya que esta no ejerció un efecto significativo sobre la tasa de consumo de oxígeno y la tasa de excreción de amonio.
- Bajo las condiciones de salinidad a las que estuvo expuesto, *S. annulatus* utilizó una mezcla de proteínas-lípidos, y carbohidratos como principales sustratos energéticos para cubrir su demanda energética, lo que indicó que en ese intervalo de salinidades al que fue expuesto el botete no fueron estresantes.
- En base a este trabajo, *S. annulatus* puede ser considerado como un organismo eurihalino y fuertemente osmorregulador, ya que tuvo un patrón de osmorregulación hiperosmótico en bajas salinidades y hiposmóticos en altas, presentando una pendiente cercana a 0, comportamiento que es típico de los organismos osmorreguladores.
- El punto isosmótico obtenido para *S. annulatus* fue de 356 mmol kg<sup>-1</sup> y concuerda con los puntos isosmóticos encontrados en otras especies.

eurihalinas de la Familia Tetraodontidae como *S. testudineus*, *Takyfugu obscurus*, *T. rubripes*.

- Se recomienda cuantificar la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en *S. annulatus* expuesto a salinidades constantes para evaluar el efecto de la salinidad sobre la expresión de esta enzima, y así complementar la información sobre la capacidad osmorreguladora de esta especie.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Arias-Rodríguez L., Rodríguez-Ibarra L. E., del Valle-Pignataro G., 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.

Aristizabal-Abud 1992. Effects of salinity and weight on routine metabolism in the juvenile croaker, *Micropogonias furnieri* (Desmarest 1823). *Journal of Fish Biology*, 40:471-472.

Arjona F.J., L. Vargas-Chacoff I. Ruiz-Jarabo O., Gonçalves I., Páscoa M.P., Martín del Río J.M., 2009. Tertiary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) to osmotic challenge: implications for osmoregulation, energy metabolism and growth. *Aquaculture*. 287:419-426 p.

Bond C. E., 1996. *Biology of Fishes*. Brooks/Cole. Second edition. Corvallis, Oregon. 750 pp.

Castro-Aguirre J. L., Espinoza-Pérez H., Schmitter-Soto J. J., 1999. Ictiofauna estuarina, lagunar y vicaria de México, Limusa, México. 711 pp.

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

Díaz F., Farfán C., Sierra E., Re A. D., 2001. Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation in juveniles of *Penaeus vannamei*, Boone. *Marine Fish Behavior Physiology*. 34:93-104 P.

Duncan N. J., Rodríguez G. A. de O., Alok D., Zohar Y., 2003. Effects of controlled delivery and acute injections of LHRHa on bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) spawning. *Aquaculture* 218:625–635 p.

FAO, 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental. Volumen III, Vertebrados Parte-2. Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación. Roma, 623 pp.

Fiess J. C., Kunkel-Patterson A., Mathias L., Riley G. L., Yancey H. P., Hirano T., Grau G. E., 2007. Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146:252-264 p.

Flores M., Díaz F., Medina R., Re A. D., Licea A., 2008. The effect of dietary astaxanthin on physiological responses of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* acclimated to low-salinity water. *Journal of fisheries International* 3(3):75-82 p.

García-López V., Rosas-Vázquez C., Brito-Pérez R., 2006. Effects of salinity on physiological conditions in juvenile common snook *Centropomus undecimalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145:340-345 p.

García-Ortega A. 2008. Nutrition and feeding research in the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) and bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), new species for marine aquaculture. *Fish Physiology Biochemistry*, 35:69-80 p.

Haney C. D., Nordlie F. G., 1997. Influence of environmental salinity on routine metabolic rate and critical oxygen tension of *Cyprinodon variegatus*. *Physiological Zoology*, 70(5):511-518 p.

Herrera M., Vargas-Chaco L., Hachero I., Ruíz-Jarabo I., Rodiles A., Navas J. I., Mancera J. M., 2009. Osmoregulatory changes in wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881) after acclimation to different environmental salinities. *Aquaculture Research*, 40:762-771 p.

Jobling M., 1995. *Environmental biology of fishes*. Chapman & Hall. London. 455 pp.

Kato A., Doi H., Nakada T., Sakai H., Hirose S., 2005. *Takifugu obscurus* is a euryhaline fugu species very close to *Takifugu rubripes* and suitable for studying osmoregulation. *BMC Physiology*, 5:18 p.

Kinne O., 1967. *Physiology of estuarine organisms with special reference to salinity and temperature*. En: Lauff G. H. Ed., *Estuaries*. AAAS Publ. No. 53, Washington, DC, 525-540 pp.

Komar C., Turnbull J. F., Roque A., Fajer E., Duncan N. J., 2004. Effect of water treatment and aeration on the percentage hatch of demersal, adhesive eggs of the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*). *Aquaculture*, 229:147-158 p.

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

Lee M. K., Kaneko T., Aida K., 2005. Low-salinity tolerance of juvenile fugu *Takifugu rubripes*. *Fisheries Science* 71:1324-1331 p.

Moser M. L., Gerry R. L., 1989. Differential effects of salinity changes on two estuarine fishes, *Leiostomus xanthurus* y *Micropogonias undulatus*. *Estuaries* 1:35-41 p.

Moser M. L., Hettler W. F., 1989. Routine metabolism of juvenile spot, *Leiostomus xanthurus* (Lacépède), as function of temperature, salinity and weight. *Journal Fish Biology*, 35:703-707 p.

Moser L. M., Miller M. J., 1994. Effects of salinity fluctuation on routine metabolism of juvenile spot, *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Fish Biology*, 45:335-340 p.

Nordlie F. G., 1977. The influence of environmental salinity on respiratory oxygen demands in the euryhaline teleost, *Ambassis interrupta* bleeker. *Biochemical Physiology*, 29:271-274.

Nordlie F. G., Haney D. C., Walsh S. J., 1992. Comparisons of salinity tolerances and osmotic regulatory capabilities in populations of sailfin molly (*Poecilia latipinna*) from brackish and fresh waters. *Copeia* 3:741-746 p.

Plaut, I., 2000. Resting metabolic rate, critical swimming speed, and routine activity of the euryhaline cyprinodontid, *Aphanius dispar*, acclimated to a wide range of salinities. *Physiology Biochemistry and Zoology*, 73(5):590–596 p.

Prodocimo V., Freire C. A., 2004. Estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. greeleyi*) submitted to sea water dilution during ebb tide: a field experiment. *Marine Behavior & Physiology*. 37(1):1-5 p.

Reyes-Hernández I. C., 2009. Temperatura preferida, termotolerancia y consumo de oxígeno en juveniles de botete diana (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842). TESIS para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de Maestra en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Baja California, México, 44 pp.

Roldán-Pérez G., Ramírez-Restrepo J. J., 2008. Fundamentos de limnología neotropical. Segunda edición. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia, 413 pp.

Salvato B., Coumo V., Di Muro P., Beltramini M., 2001. Effect of environmental parameters on the oxygen consumption of marine invertebrates: A comparative factorial study. *Marine biology* 138:659-668 p.

Sampaio L. A., Bianchini A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 269:187-196 p.

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

Swanson C., 1998. Interactive effects of salinity on metabolic rate, activity, growth and osmoregulation in the euryhaline milkfish (*Chanos chanos*). *Journal Experimental Biology* 201:3355-3366 p.

Thompson D. A., Findley L. T., Kerstitch A. N., 2000. Reef fishes of the Sea of Cortez: the rocky shore fishes of the gulf of California. Revised edition. First University of Texas Press Edition, Austin, TX, USA. 353 pp.

Val A. L., Vera M. F. de Almeida-Val, David J. Randall, 2006. Tropical environment. En: Adalberto L. Val, Vera María F. de Almeida-Val, David J. Randall. *The physiology of tropical fishes*. Academic Press, New York. 38 p.

Widdows J., 1978. Physiological indicators of stress in *Mytilus edulis*. *Journal Marine Biology* 58:125-142 p.

Woo N. Y. S., Kelly S. P., 1995. Effects of salinity and nutritional status on growth and metabolism of *Sparus sarba* in closed seawater system. *Aquaculture* 135:229-238 p.

Wright P. A., Part P., Wood C. M., 1995. Ammonia and urea excretion in the tidepool sculpin (*Oligocottus maculosus*): sites of excretion, effects of reduced salinity and mechanisms of urea transport. *Fish Physiology and Biochemistry*, 14:111-123 p.

Yan M., Li Z., Xiong B., Zhu J., 2003. Effects of salinity on food intake, growth, and survival of pufferfish (*Fugu obscurus*). *Journal Ichthyology* 20:146-149 p.

Yang Z., Chen Y., 2006. Salinity tolerance of embryos of obscure puffer *Takifugu obscurus*. *Aquaculture*, 253:393–397 p.

Zhang G., Shi Y., Zhu Y., Liu J., Zang W., 2010. Effects of salinity on embryos and larvae of tawny puffer *Takifugu flavidus*. *Aquaculture* 302:71–75 p.

Zheng Z., J. C. Jin, L. Mingyun, B. Peifeng, D. Shuanglin. 2008. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia excretion of juvenile miiuy croaker, *Miichthys miiuy* (Basilewsky). *Aquaculture*. 16:581-589 p.