



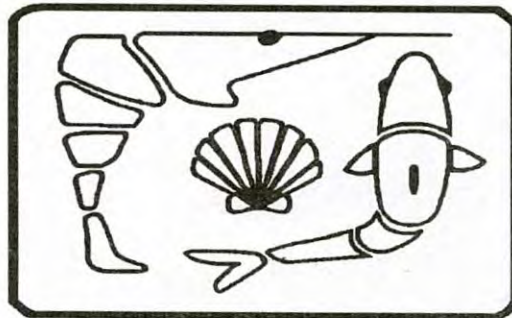
"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS.

PROGRAMA DE POSTGRADO EN ACUACULTURA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ACUACULTURA.



**EFFECTO DE DIFERENTES SALINIDADES Y DENSIDADES
DE ALIMENTACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO,
SUPERVIVENCIA Y MALFORMACIONES DE COLUMNA
EN EL BOTETE DIANA *Sphoeroides annulatus* JENNYNS
(1842)."**

T E S I S

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

Presenta:

LAURA REBECA JIMÉNEZ GUTIÉRREZ

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



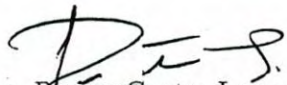
**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis de Laura Rebeca Jiménez Gutiérrez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



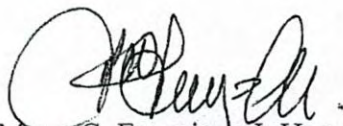
Dra. Reyna Castro Longoria

Nombre
Presidente



Dr. José Manuel Grijalva Chon

Nombre
Sinodal Secretario



M. en C. Francisco J. Hoyos Chairez

Nombre
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, por el apoyo tanto de enseñanza como económico para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico para la formación académica y la realización del proyecto.

A mi directora de tesis, Dra. Reina Castro Longoria, por su apoyo y conocimiento.

A mi comité de tesis, los sinodales, Dr. José Manuel Grijalva Chon y M. en C. Francisco J. Hoyos Chairez.

Al Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora, por el apoyo al proporcionar las larvas, especialmente al M.C. Francisco J. Hoyos Chairez.

Al laboratorio de análisis de metales pesados del CIAD.

A los maestros que ayudaron en mi formación dentro de esta institución y a las secretarías, por todo el apoyo en todo momento, sobre todo a Fátima H. Montijo Espinoza. A mis compañeros, Norma, Venecia, Ovidio, Javier, Fernando, Manuel y a los biologuitos de la licenciatura.

Se agradece a las personas que colaboraron en la realización de este proyecto de investigación, con energía entusiasmo, apoyo físico y moral:

Carolina Ortega Montaña
Martín Rodrigo Acedo Valdez
Sergio David Moreno Velásquez
Ana María Pérez Villalba

A mi marido Rafael T. Serrano Quiñónez por su apoyo y comprensión en todos estos años.

Y sobre todo a Dios YHVH, por permitirme llegar con bien a este momento, por las personas con las que me ha permitido compartirlo, y todas las experiencias vividas.

RESUMEN

El botete diana, *Sphoeroides annulatus*, es una especie con potencial para la acuicultura ya que se cuenta con algunos avances sobre los requerimientos en cautiverio, madurez y cultivo de larvas. Las instalaciones del Centro Reproductor de Especies Marinas son propiedad del estado de Sonora y su objetivo es proporcionar larvas y juveniles de moluscos y peces a los granjeros artesanales y privados de ostiones y peces. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la salinidad y densidades de alimentación sobre el crecimiento, mortalidad, deformidades de la columna vertebral y el desarrollo histológico del intestino. Se probaron cinco salinidades (15, 25, 35, 40 y 45 mg/L) y dos densidades de *Artemia* (baja y alta) con larvas de 28 días de edad en un bioensayo de 23 días de duración. La alta salinidad (45 mg/L) y baja densidad de *Artemia* causaron un bajo crecimiento (12.6 mm de longitud total en promedio), mayor susceptibilidad a la inanición y deformidades en la columna vertebral. Contrariamente, la baja salinidad (15 mg/L) conjuntamente con una alta densidad de *Artemia* favoreció un óptimo crecimiento (18 mm), una mejor resistencia a la inanición y una total ausencia de deformidades en la columna. Se concluye que *S. annulatus* bajo condiciones de laboratorio es susceptible de cultivo, por su amplia tolerancia a los cambios en salinidad, así como a la fácil adaptación a los diferentes esquemas alimenticios.

ABSTRACT

The bullseye puffer, *Sphoeroides annulatus*, is a species with potential for culture with some advances in knowledge regarding aspects like captivity requirements, maturity, and larvae culture. The Centro Reprodutor de Especies Marinas is a state-owned facility that provides larvae of mollusks and fishes to oysters- and fish farmers. The objective of this study was to determine the effect of salinity and feeding densities on growth, mortality, dorsal spine deformities and gut histology. There were tested five salinities (15, 25, 35, 40 and 45 mg/L) and two *Artemia* densities (low and high) on 28 days old larvae on a bioassay. High salinity (45 mg/L) and low *Artemia* density caused low growth (12.6 mm total length) and staurved susceptibility with deformed dorsal spine. Conversely, the lower salinity (15 mg/L) and high *Artemia* density favored and optimal growth (18 mm), a better resistance to starvation and total absence of spine deformities. *Sphoeroides annulatus* is a species that is easily cultured in laboratory conditions because has a wide tolerance to salinity changes as this was observed with its adaptative behavior to different feeding strategies.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS.	
RESUMEN.	i
ABSTRACT.	ii
I.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.	1
I.1. Generalidades del botete diana <i>Sphoeroides annulatus</i> .	2
I.2. osmorregulación en peces.	5
I.3. Punto de no retorno (PNR).	6
I.4. Alimentación del botete diana.	7
I.5. Anormalidades morfológicas de peces cultivados.	8
II. HIPÓTESIS.	11
III. OBJETIVOS.	12
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.	13
IV.1. Aclimatación de las larvas.	13
IV.2. Diseño experimental.	13
IV.3. Procedimiento experimental.	15
IV.4. Muestreos.	16
IV.5. Histología.	17
IV.6. Transparentación.	18
IV.7. Punto de no retorno.	19
IV.8. Análisis estadístico.	20
V. RESULTADOS.	21

V.1. Crecimiento.	28
V.2. Mortalidad.	35
V.3. Deformidades de la columna.	37
V.4. Histología.	46
V.4.1. Desarrollo de los epitelios intestinales.	46
V.4.2. Actividad digestiva.	46
V.5. Punto de no retorno.	54
VI. DISCUSIONES.	56
VII. CONCLUSIONES.	61
VIII. RECOMENDACIONES.	62
IX. LITERATURA CITADA.	63
X. APÉNDICE.	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Vista dorsal de <i>S. annulatus</i> .	4
2	Mapa de distribución de <i>S. annulatus</i> .	4
3	Ejemplo de una unidad experimental con una salinidad determinada para el bioensayo de PNR.	20
4	Promedios de Temperatura, pH y oxígeno disuelto en conjunto de todos los tratamientos, en todas las unidades experimentales para el botete diana en condiciones de laboratorio.	22
5	Concentraciones de calcio (Ca^{++}) en larvas de botete.	23
6	Concentraciones de magnesio (Mg^{++}) en larvas de botete.	23
7	Concentraciones de sodio (Na^+) en larvas de botete.	25
8	Concentraciones de potasio (K^+) en larvas de botete.	25
9	Promedio de la concentración de sodio (Na^+), en muestras de agua a diferentes salinidades y densidades de alimentación al final del experimento.	26
10	Promedio de la concentración de potasio (K^+), en muestras de agua a diferentes salinidades y densidades de alimentación al final del experimento.	26
11	Promedio de la concentración de cloruros en muestras de agua a diferentes salinidades y densidades de alimentación al final del experimento.	27
12	Promedio de la concentración de sulfuros, en muestras de agua a diferentes salinidades y densidades de alimentación al final del experimento.	27
13	Longitud estándar promedio y desviación estándar por tratamientos.	29
14	Crecimiento promedio en longitud estándar (mm) a lo largo del experimento para los tratamientos del 1 al 5.	30
15	Crecimiento promedio en longitud estándar (mm) a lo largo del experimento para los tratamientos del 6 al 10.	31
16	Peso promedio y desviación estándar por tratamientos.	32
17	Crecimiento promedio en peso (g) a lo largo del experimento para los tratamientos del 1 al 5.	33

Figura		Página
18	Crecimiento promedio en peso (g) a lo largo del experimento para los tratamientos del 6 al 10.	34
19	Porcentaje de mortalidad final de los organismos por tratamientos con sus respectivas réplicas de testigos.	36
20	Porcentaje de deformidades en conjunto al final del experimento para larvas de botete para cada tratamiento.	38
21	Porcentaje para cada deformidad en cada uno de los tratamientos de salinidad y densidad de alimentación.	39
22	Larva de botete transparentada con desarrollo de la columna normal proveniente del tratamiento de 35mg/L.	40
23	Larvas de botete diana con lordosis.	41
24	Larva de botete diana con escoliosis severa en vértebras de la parte media.	42
25	Larva de botete diana con escoliosis severa en vértebras de la parte media.	43
26	Larva de botete diana con combinación de deformidades, lordosis y escoliosis en vértebras de la parte media.	44
27	Dos larvas de botete diana con cifosis de tipos distintos.	45
28	Corte histológico sagital de <i>S. annulatus</i> donde se muestra el tracto digestivo.	47
29	Estadio 1. Desarrollo inicial del sistema digestivo de botete.	48
30	Estadio 2. Con mayor ramificación entre epitelios intestinales.	49
31	Estadio 3. Epitelio intestinal con grado de actividad digestiva 2.	50
32	Porcentaje de larvas de botete diana en cada estadio de desarrollo intestinal para todos los tratamientos.	51
33	Porcentaje de larvas de botete diana en cada grado de actividad digestiva para todos los tratamientos.	53
34	Punto de no retorno PNRS, mostrando los tratamientos por salinidades.	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I	Descripción de los tratamientos (T1-T10) experimentales de salinidad y densidad de alimentación con <i>Artemia</i> y alimento particulado.	14
II	Horario de cada ración de alimentación por día.	15

I. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.

La acuicultura ha sido practicada por algunas sociedades por muchos siglos, pero la transición de cultivos de subsistencia a los cultivos intensivos con métodos industrializados se ha dado solamente en las últimas décadas (Zohar y Mylonas, 2001). Sin embargo los avances que se han logrado ha llevado a que esta sea la actividad de mayor crecimiento en los últimos años y dentro de ella el cultivo de peces representa la mayor producción en volumen a nivel mundial (FAO, 2004).

En México la maricultura se limita a pocas especies, principalmente a camarón y ostión mientras que en agua dulce predomina el cultivo de tilapia y bagre de canal; recientemente se ha incrementado la demanda de proporcionar otras especies y diversificar la acuicultura. Basado en esto, desde hace dos décadas, diferentes instituciones nacionales de investigación han estudiado varias especies con posibilidades de cultivo, como lo es el cultivo de pargo y botete diana en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Mazatlán y lenguado y jurel por el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada Baja California (CICESE) en Baja California (Chávez-Sánchez *et al.*, 2008). Las bases para el cultivo de pargo y mero se han desarrollado por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR).

Probablemente una de las especies con un fuerte potencial de cultivo para el Pacífico Mexicano es el botete diana, *Sphoeroides annulatus*, del cual existen avances sustanciales en el conocimiento del manejo de esta especie en cautiverio enfocados hacia la reproducción, cultivo larval, fisiología, alimentación, desarrollo, larvicultura, enfermedades y toxicología (Chávez-Sánchez *et al.*, 2008; Aguilera-Jiménez, Com. Pers.¹).

Desde 1997 en el CIAD, unidad Mazatlán, se han realizado las primeras investigaciones sobre el cultivo de botete diana logrando tener desoves exitosos mediante un ciclo cerrado. Se determinó que el cultivo de esta especie es sustentable, ya que este es posible en un intervalo de salinidad de 0 a 35 mg/L y una temperatura de 25 a 30° C; aunque el óptimo de cada uno de estos factores para un buen desarrollo no ha sido determinado (Chávez-Sánchez *et al.*, 2008).

¹.- Aguilera-Jiménez, C. IRTA, España. Bahía de Kino, abril de 2008.

También se ha observado que el cultivo larvario tiene un exitoso desarrollo con rotíferos, copépodos y *Artemia* combinados con diferentes alimentos peletizados. Aunque se tenga un gran avance en el cultivo de esta especie, es necesario más investigación en cada una de las áreas y etapas de su producción, sobre todo para incrementar la sobrevivencia (Chávez-Sánchez *et al.*, 2008).

Actualmente se están dando los primeros pasos para lograr escalar su cultivo en el Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES), ya que en mayo del 2008 se logró obtener las primeras larvas, producto de la maduración en cautiverio de éstos peces. En el presente estudio de las larvas obtenidas en CREMES durante el año 2008, se pretende contribuir con aspectos relacionados al alimento y condiciones de salinidad en la fase postlarval en condiciones experimentales de laboratorio.

I.1. Generalidades del botete diana *S. annulatus*.

Por su carne de alta calidad y sabor el botete diana *S. annulatus* es altamente apreciado en el oeste del país, así como en países orientales. México se ha reportado como uno de los exportadores de botete más importantes a nivel mundial. El cultivo de esta especie es recomendado por varios factores como lo son: Su alta tolerancia a la salinidad y la temperatura, la calidad y sabor de su carne, su alto precio en el mercado local y extranjero, así como su alto potencial de exportación (Chávez-Sánchez *et al.*, 2008).

Con relación a su biología y ecología, la Familia Tetraodontidae son organismos de talla pequeña a moderada, de cuerpo robusto y romo, su cabeza es grande y obtusa, con la característica de la familia donde la boca se ha transformado en una especie de pico con cuatro dientes predominantes, dos en cada mandíbula, los ojos se encuentran en posición alta, aletas dorsal y anal en posición muy posterior sin espinas, aletas pélvicas ausentes y aleta caudal trunca. Con respecto al color, en la mayor parte de las especies los flancos son jaspeados y a veces presentan manchas de distintos colores y tamaños. Su más predominante característica es que son capaces de inflarse rápidamente por aspiración de agua (o aire), además de que no presentan escamas típicas, pero a menudo con numerosas espínulas en el vientre, costados y ocasionalmente en el dorso, todas estas características probablemente lo ayudan a escapar de depredadores (Fischer *et al.*, 1995).

Todas las especies de la familia son carnívoras; además estos peces son conocidos porque su consumo ha ocasionado envenenamientos graves (en ocasiones la muerte) debido a la toxina tetradontoxina que parece localizarse en ciertos órganos viscerales, pudiendo contaminarse la carne por el contacto con los órganos, descuidos de evisceración o almacenaje muy prolongado antes del consumo (Fischer *et al.*, 1995).

De acuerdo con Fischer *et al.* (1995), el género *Sphoeroides* se caracteriza por presentar papilas nasales con un par de aberturas pequeñas, sin órganos olfatorios visibles y en particular la especie *S. annulatus* se caracteriza de las demás por no presentar espínulas ni en dorso ni vientre, a menudo son sobresalientes en los flancos, numerosas manchas oscuras, la distancia desde el extremo superior de la abertura branquial hasta el borde posterior del ojo es menor que la longitud del hocico por medio diámetro ocular, posee un diseño concéntrico de las manchas del dorso (Fig. 1), no alargado, con una línea transversal abrupta por delante de la mancha central. Esta especie es común en aguas costeras someras de mares tropicales y templados, a veces penetra aguas salobres y dulces. Llega a alcanzar tallas máximas de 44 cm de longitud total, común hasta 18 cm. Su distribución va desde San Diego California, Golfo de California hasta Pisco, Perú, y las Islas Galápagos (Fig. 2). Con frecuencia se captura con redes de arrastre sobre sustratos blandos y sus juveniles viven en estuarios (FAO, 2004; Fischer *et al.*, 1995).

Los trabajos sobre fisiología del botete indican que la temperatura y la salinidad (0-60 gL⁻¹) juegan un papel muy importante en el desarrollo de los huevos (Chávez-Sánchez *et al.*, 2008). Sin embargo a pesar de este conocimiento, se sabe que los juveniles viven en estuarios y este punto no está estudiado en relación con la composición de iones en el proceso de la osmorregulación. Tampoco la posible presencia de metales pesados en el agua donde se desarrollan, dado que se ha observado que elementos como el mercurio (Hg), cadmio (Cd) y plomo (Pb), no tienen función esencial en los organismos, pero pueden llegar a ser tóxicos si son ingeridos por largos periodos (Tansel-Sireli *et al.*, 2006), lo cual resultaría muy interesante de estudiar paralelamente con la alimentación en sistemas productivos para protocolizar el cultivo en esta fase y así eficientizar la producción larval basada en esta premisa.

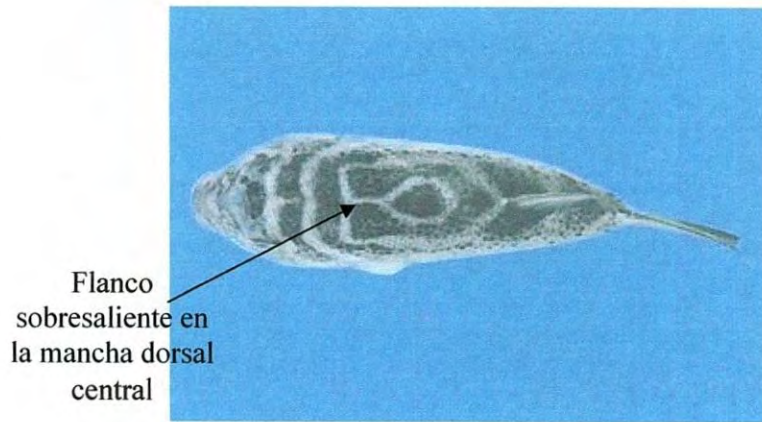


Figura 1.- Vista dorsal de *S. annulatus*.



Figura 2.- Mapa de distribución de *S. annulatus*, mostrada en rojo.
<http://www.aquamaps.org/receive.php>, FAO 2009.

Una limitante en el desarrollo del cultivo de peces marinos es el cultivo de larvas para asegurar una fuente sostenible de juveniles para la engorda. El avance del cultivo del botete diana de esta etapa, puede ser mediante el enfoque de los diferentes aspectos del cultivo como son la osmorregulación, la mortalidad, salinidad, alimentación, desarrollo del sistema digestivo como el tejido epitelial intestinal, el punto de no retorno (PNR) así como las deformidades óseas.

La importancia del presente estudio se basa principalmente en evaluar la respuesta del botete diana *S. annulatus* bajo diferentes salinidades y diferentes densidades de alimentación con *Artemia* sobre el proceso de osificación en la columna vertebral. Se espera establecer los protocolos de cultivo en la etapa larvaria y buscar un mejor desarrollo en esta fase.

I.2. Osmorregulación en peces.

Lagler *et al.* (1984) describe que tal como sucede en otros animales, una de las necesidades fundamentales de un pez, consiste en contar con una provisión adecuada de oxígeno en los tejidos, de tal manera que pueda realizarse la oxidación que le proporcione la energía necesaria para mantener la vida. Los vertebrados eliminan algunos desperdicios metabólicos a través del intestino y la piel, pero la mayor parte es eliminada a través de órganos excretores especializados: los riñones. Los peces y otros animales acuáticos enfrentan un problema particular en la eliminación, ya que sus branquias y membranas orales son permeables tanto al agua como a las sales. Las branquias también toman parte predominante en la excreción de sustancias de desecho, eliminando principalmente el amoníaco. La salinidad en el agua del océano es más concentrada que la de los fluidos corporales del pez y el agua es eliminada, pero las sales tienden a concentrarse en el interior: de aquí que los peces marinos beban agua, mientras que la deshidratación es prevenida mediante este proceso, el exceso de sales debe ser eliminado, este mecanismo homeostático es un circuito consumidor de energía (Lagler *et al.*, 1984).

Los peces marinos eliminan las sales excedentes que provienen principalmente del agua de mar y de los alimentos deglutidos a través de las branquias y el tubo digestivo, solamente por la orina se eliminan rastros. Iones univalentes especialmente los cloruros excedentes pasan del intestino a la corriente sanguínea y son eliminados a través de las

branquias, mientras que los bivalentes como el magnesio (Mg^{++}) y el calcio (Ca^{++}), por ejemplo, permanecen en el intestino donde la naturaleza alcalina de los fluidos promueve su combinación con óxidos de hidróxidos para formar compuestos insolubles que son entonces eliminados con las heces fecales (Lagler *et al.*, 1984). Las células clorosas ó salinas del epitelio branquial eliminan el exceso de iones de cloro en los peces marinos, mientras que en peces dulceacuícolas son absorbidos.

Entre las especies de peces óseos marinos, así como las especies óseas de agua dulce, existen algunos más estenohalinos que otros y otros más eurihalinos, por lo que tienen ajustes en las concertaciones salinas más elevadas o más bajas de lo normal (Lagler *et al.*, 1984). El pez botete ha sido reportado como un pez eurihalino. Las fases de desarrollo larval que atraviesa este organismo no han sido estudiadas en el Golfo de California y no se conoce la respuesta a los cambios en los iones asociados con el proceso de osmorregulación.

Es importante para los peces marinos que entran en aguas de baja salinidad la presencia de una concentración elevada de iones de calcio, donde éste baja la permeabilidad celular, tanto como para las sales, como para el agua. También se ha demostrado que las secreciones endócrinas tienen efecto sobre la osmorregulación, se ha observado que para especies de tetradóntidos del género *Tetradon*, hay diferencias entre machos y hembras en relación a los niveles de calcio y cloro en la sangre y en el volumen de agua contenido en sus tejidos y pueden ser el resultado de las hormonas gonadales. En los mamíferos, las hormonas sexuales femeninas efectúan acción hidratante por la retención de sodio (Lagler *et al.*, 1984).

I.3.- Punto de no retorno (PNR).

Se han dado numerosas descripciones morfológicas, químicas, histológicas, cambios de comportamiento entre otras, sobre las etapas tempranas del desarrollo larval de peces. El PNR describe el tiempo después de la eclosión, en el que se tiene que ingerir alimento para sobrevivir. Si este punto es rebasado, la supresión del alimento conduce a la desaparición de la actividad proteolítica. Lo anterior es de importancia en todas las especies de peces ya que este factor puede guiar en la alimentación de las larvas como un factor clave de nutrición y sobrevivencia (Dabrowski, 1982; Shoji y Tanaka, 2003).

Para este estudio en particular el PNR se referirá a la capacidad de supervivencia de las larvas de botete a partir de la supresión del alimento y sus reservas en órganos de almacén como el hígado (PNR).

I.4. Alimentación del botete diana.

El botete diana se alimenta en la naturaleza de crustáceos bentónicos como camarones y cangrejos así como de gasterópodos, bivalvos, pulpos y calamares. Aunque *S. annulatus* también es una especie forrajera de plantas acuáticas y detritus (Chávez-Sánchez *et al.*, 2008). En cultivo de organismos acuáticos se sabe que la alimentación es uno de los insumos más caros a nivel semiintensivos e intensivos. En este momento no existen estudios publicados sobre la alimentación del botete diana a nivel comercial. Solamente para su cultivo larval se han utilizado diferentes protocolos como las microalgas *Isochrysis* sp. y *Nanochloropsis oculata*; dos especies de rotíferos *Brachionus plicatilis* y *B. Rotundiformes*; el copépodo *Tizbe monozota* y *Artemia salina* combinados con diferentes tipos de alimentos peletizados. También el tiempo óptimo de destete de esta especie ha sido evaluado, mostrando que la alimentación artificial es bien aceptada por las larvas a los 29 Días Después de la Eclosión (DDE), esto sin afectar el óptimo desarrollo de las larvas.

La capacidad proteolítica de las larvas para la digestión del alimento es muy importante en la etapa larvaria. La expresión de la actividad de la tripsina durante el desarrollo de las larvas de botete diana esta relacionada con su síntesis. Dado que el tripsinógeno es el precursor de la tripsina ésta es la más importante enzima proteolítica en los estadios larvales. Ésta y las sales biliares activadoras de la lipasa son producidas por el páncreas, revelado por hibridación *in situ* (Darias *et al.*, 2007).

Relacionando la síntesis de la tripsina con el desarrollo de los órganos en el tracto digestivo y el tipo de alimentación ingerido, después de los 20 DDE, el tracto digestivo está completamente formado, a excepción del estómago, con una actividad máxima de la tripsina de los 16-24 DDE, que corresponde con la diferenciación del páncreas y el intestino. De los 28 DDE en adelante, la síntesis de la tripsina y su actividad decrecen, sugiriendo que hay otras enzimas que juegan un papel más importante en el proceso de digestión en el botete diana (Chávez-Sánchez *et al.*, 2008).

Bajo condiciones experimentales para un buen desarrollo y supervivencia, *S. annulatus* requiere en su alimentación un mínimo de 45% de proteína, que corresponde a lo reportado para el botete tigre, de 50%. Mientras que se ha demostrado que los lípidos es 5.6% y que este valor muestra mayor crecimiento, que dietas con 9.5% (Chávez-Sánchez *et al.*, 2008).

Todos los componentes de la dieta tienen que cumplir una función específica en el desarrollo de las larvas, con los fosfolípidos, péptidos y vitaminas que tienen la mayor influencia sobre la formación del esqueleto. El fosfatidilinositol, en particular, parece prevenir las deformidades del esqueleto, los ácidos grasos altamente insaturados HUFA's en particular el ácido docohexaenoico (DHA), induce al decremento de las deformidades del opérculo en "milkfish" *Chanos chanos* (Jana y Webster, 2003).

I.4.- Anormalidades morfológicas de peces cultivados.

Como en todos los organismos, la vida en cautiverio, aunado a factores de manipulaciones y cambios medioambientales provoca diferentes efectos a cada especie y a cada individuo. Uno de los problemas más significativos dentro de la acuicultura de peces ha sido las anomalías anatómicas ya que éstas inician en los primeros días de la etapa larvaria y la mayoría de los organismos que presentan éste problema mueren, provocando pérdidas cuantiosas a la industria de la acuicultura.

Los principales estudios de este problema se han documentado en especies marinas como dorada, *Dicentrarchus labrax*; barramundi, *Lates calcarifer*; salmón, *Salmo salar*; lenguado del Atlántico, *Hipoglossus hipoglossus*, entre otros (Fraser *et al.*, 2004). Es necesaria la búsqueda de conocimiento acerca de los factores que provocan estas enfermedades y la etapa de su vida en que se presenta (Sfakianakis *et al.*, 2006).

Dentro de las diferentes enfermedades y problemas que pueden considerarse, son las deformidades anatómicas en larvas, que incluyen: opérculo, mandíbula anormal, deformidades en la forma del cuerpo y deformidades de la columna. Dentro de éstas existen tres importantes como la lordosis, escoliosis y cifosis (Fraser *et al.*, 2004).

La palabra lordosis proviene del griego que significa curva. La definición de lordosis es una curva sagital del raquis de convexidad anterior (Pascale, 2001) ó aparición de una curvatura de concavidad posterior en la región dorsal (Santoja y Pastor, 2000). La

cifosis lumbar es una inversión de la curvatura lumbar fisiológica, el incremento de la curvatura raquídea de la convexidad posterior del raquis dorsal; suele ir acompañada de una compensación dorsal en lordosis o por lo menos dorso plano (Pascale, 2001). Por otro lado, la escoliosis cuyo término significa curvatura anormal de la columna vertebral (Royo-Salvador, 1996). Es una malformación de donde la convexidad es disimilar (Murdoch, 1958).

Las anomalías morfoanatómicas han sido consideradas como uno de los problemas más significativos en el cultivo de peces. Aún con los avances en control de la alimentación y de enfermedades, este tipo de anomalías sigue siendo un problema (Fraser *et al.*, 2004). En el botete no existen trabajos que documenten los cambios anatómicos de las larvas en relación con la salinidad, ni otras variables ambientales.

Es importante estudiar la presencia de cualquier tipo de malformación que pueda afectar tanto la morfología, como la supervivencia, tasa de crecimiento, comportamiento y finalmente analizar el impacto en el costo de producción para determinar la efectividad de los laboratorios de larvas (Sfakianakis *et al.*, 2006). Dado que existen estudios para otras especies, Fraser (2004) y Granvil (2000) afirman que existen un sin fin de factores de estrés que pueden provocar en las primeras etapas de desarrollo de las larvas de peces diferentes malformaciones en todo el cuerpo.

Se estiman muchos factores que pudieran explicar las deformidades del esqueleto en larvas de peces, por ejemplo en lubina y dorada son afectadas por lordosis en las vértebras 14 y 15 principalmente, lo cual se ha adjudicado a la hidrodinámica del estanque. Particularmente a la intensidad de corriente del agua, intensidad de luz inadecuada, así mismo la temperatura y la salinidad han sido reportados como fuentes de malformaciones. Recientemente se han encontrado datos del importante papel que juegan los componentes de la dieta con la que se alimenta durante el desarrollo larval. Experimentos recientes de alimentación han sido encaminados a probar la calidad de las larvas mediante pruebas con ingredientes liposolubles como los ácidos grasos y algunas vitaminas, aunque existen otros componentes que también deberían ser estudiados. Cahu *et al.* (2003) concluyen que la mayoría de los fosfolípidos, péptidos y vitaminas tienen la mayor influencia sobre la formación del esqueleto.

Fraser *et al.* (2004) hacen un mapeo completo del desarrollo de la osificación de la columna en barramundi. Ellos consideran que los componentes más importantes de la dieta

en cuanto al desarrollo de las larvas es la vitamina C, vitamina A, péptidos y HUFAs. En dicho estudio los tipos de deformidades de la columna encontrados durante el desarrollo larvario ocurrieron después 18 DDE, con deformidades ligeras, mientras que para la edad de 26 DDE se encontraron muchos casos de lordosis, ubicados entre las vértebras 16 y 24.

Se ha demostrado entonces que la temperatura es un factor que puede afectar la incidencia de deformidades de la columna de *Dicentrarchus labrax* (Fraser *et al.*, 2004). Aunque actualmente no existen experimentos que puedan combinar cada uno de los posibles detonantes de las malformaciones, aunado a que cada una de las especies reacciona diferente ante cada factor, por lo que es necesaria más investigación.

En este sentido la salinidad puede ser un factor que afecte el desarrollo larval en cuanto al crecimiento y también puede ser potencial de alteraciones en la anatomía de los estadios larvales. También la fuente de agua con la que abastecen los cultivos larvales y la presencia de metales pesados pueden ocasionar bioacumulación de los mismos en las fases tempranas de desarrollo (Dethlefsen, 1975), así como las variaciones genéticas inherentes de las especies.

II.- HIPÓTESIS.

Las variaciones en la salinidad del agua de mar, aunado a la variación en la densidad de alimentación tienen un efecto en el desarrollo de las larvas y juveniles de *S. annulatus*, el cual puede causar cualquiera de los diferentes problemas de malformaciones de la columna, además de afectar el crecimiento, mortalidad y capacidad de alimentación de las larvas.

III.- OBJETIVOS.

General:

- Determinar el efecto de diferentes salinidades y densidades de alimentación sobre el crecimiento, mortalidad y las malformaciones de la columna del botete diana, *Spherooides annulatus*.

Específicos:

- Determinar el efecto en el crecimiento en longitud, peso y mortalidad en tratamientos de diferente salinidad: 15, 25, 35, 40 y 45 mg/L.
- Determinar el efecto de la alimentación con densidades alta y baja de *Artemia*, con alimento comercial, sobre el crecimiento, peso y mortalidad.
- Registrar las variables fisicoquímicas como, temperatura, pH y oxígeno disuelto durante el experimento.
- Realizar observaciones histológicas del desarrollo del sistema digestivo para ver la respuesta de la alimentación.
- Calcular la incidencia de las diferentes malformaciones de la columna.
- Realizar el análisis de los iones más importantes en la osmorregulación del botete por cada tratamiento de salinidad y densidad de alimentación.
- Determinar el Punto de No Retorno de las larvas de botete diana en las diferentes salinidades de 15, 25, 35, 40 y 45 mg/L.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

Para el experimental se contó con un total de 1955 juveniles de botete diana *S. annulatus* de 28 DDE, con un peso inicial promedio de 0.02 ± 0.001 g (\pm desviación estándar) y longitud estándar promedio de 6 ± 0.0001 mm. El experimento terminó a la edad de las larvas de 56 días.

IV.1. Aclimatación de las larvas.

Se inició el experimental el día 26 de junio del 2008, con larvas de 28 DDE proporcionadas por el CREMES. Una vez acondicionadas en hieleras, las larvas se transportaron desde Bahía de Kino hasta la ciudad de Hermosillo en bolsas con hipersaturación de oxígeno en agua de mar de pozo a baja temperatura (15 a 20° C). Al momento de llegar al laboratorio los organismos fueron aclimatados a la temperatura de 25° C, posteriormente se aclimató a cada salinidad de 15, 25, 35 y 45 mg/L y con agua de pozo de 35 mg/L se igualó a la salinidad deseada. En las salinidades mas bajas fue por medio del reemplazo correspondiente con agua dulce purificada y en la salinidad más elevada, se agregó cloruro de sodio comercial marina, hasta obtener la salinidad de cada tratamiento. Además se utilizó a agua de bahía de 40 mg/L.

Las salinidades manejadas se basa en la premisa de que la unidad del CREMES mantiene a las larvas en cultivo en agua de pozo con salinidad de 35 mg/L. Sin embargo la fase de engorda se pretende llevar a cabo en sistemas con agua de bahía. Todos los organismos fueron colocados a una densidad de 5 larvas/L en 40 unidades de plástico de 20 litros en volumen de 10 litros, para todos los tratamientos con tres réplicas.

IV.2. Diseño experimental.

Los tratamientos de salinidad y densidad de alimentación, fueron un total de 10 en un factorial 5×2 , con cinco tratamientos por salinidad y dos densidades de alimentación. Cada tratamiento se realizó con tres réplicas. Además se consideró una unidad experimental control dentro de cada tratamiento en la cual no se muestreó a los organismos, este se mantuvo a la misma densidad de alimentación pero solo se monitoreó la mortalidad natural. En cada unidad experimental se suministró aereación por medio de bombas de acuario. El diseño experimental se muestra en la Tabla I.

Tabla I.- Descripción de los tratamientos (T1-T10) experimentales de salinidad y densidad de alimentación con Artemia y alimento particulado. Se muestra para cada tratamiento la densidad específica de alimentación en cada periodo de desarrollo del botete diana. DDE= Días después de la eclosión.

	T1	T2	T3	T4	T5
A) Densidad de alimentación baja	15 mg/L	25 mg/L	35 mg/L	40 mg/L*	45 mg/L
DDE	nauplios / mL / día				
28-33	1	1	1	1	1
34-38	2	2	2	2	2
39-44	2	2	2	2	2
45-50	2	2	2	2	2
	T6	T7	T8	T9	T10
B) Densidad de alimentación alta	15 mg/L	25 mg/L	35 mg/L	40 mg/L*	45 mg/L
DDE	nauplios / mL / día				
28-33	5	5	5	5	5
34-38	10	10	10	10	10
39-44	10	10	10	10	10
45-50	10	10	10	10	10
C) Alimento pelletizado para todos los tratamientos					
DDE	g / día				
28-33					0.004
34-38					0.007
39-44					0.014
45-50					0.028

* Agua de la bahía

Después de ser filtrada el agua de mar en el laboratorio se preparó cada una de las salinidades correspondientes. Se prepararon reservorios de 200 L para cada una de las salinidades 15, 25 y 35 mg/L. Estas fueron ajustadas mediante dilución con agua dulce purificada, mientras que para la salinidad de 45 mg/L se aplicó NaCl (sal marina comercial), la cual se calculó con base en un litro, la necesaria para elevar la salinidad. A las unidades experimentales se realizaron recambios diarios de un 50 a 70% del agua, con limpiezas totales cada tercer día.

Las densidades de alimentación se manejaron como baja y alta con *Artemia*. La alta está establecida por el protocolo de alimentación del CREMES. Se inicio con densidades de alimentación de 1 nauplio de *Artemia*/mL para baja densidad y 5 nauplios/mL para la alta (Tabla I). En conjunto se adicionó alimento peletizado comercial para larvas de peces marca Inve, mismo utilizado para alimentar a las larvas comercialmente en CREMES, formulado con 58% de proteína y 20% de lípidos. El diseño de alimentación en edad y el horario de alimentación diaria se muestran en las Tablas I y II.

Tabla II. Horario de cada ración de alimentación por día para el diseño experimental del botete en el presente estudio.

Alimento particulado	<i>Artemia</i>
8:00 AM	9:00 AM
12:30 PM	1:30 PM
4:00 PM	5:00 PM
7:30 PM	8:30 PM

IV.3. Procedimiento experimental.

Conjuntamente a las unidades experimentales, se mantuvieron dos cultivos constantes de *Artemia* en recipientes de plástico de tres litros, en agua de 15 mg/L. Esta salinidad minimiza el gasto de energía de los quistes para la eclosión. Los quistes fueron desencapsulados de acuerdo a Granvil (2000): por cada litro de agua se pesaron dos gramos de quistes en una balanza analítica, se colocaron en una solución con 0.075 g de NaOH y 5 mL de hipoclorito de sodio por cada gramo de quistes, suficiente para cubrirlos. Se agitaron hasta tomar color anaranjado y se enjuagaron en un tamiz de 100 µm hasta

desaparecer el olor a hipoclorito de sodio, los nauplios se colocaron en los recipientes de eclosión con aereación constante y se cosecharon en un lapso de 36 a 48 horas.

Para muestrear los quistes y establecer la cantidad de alimento, se homogenizó el cultivo y se tomó con una pipeta 1 mL, diluido en agua en una probeta con 100 mL. Después de homogenizar se tomó nuevamente 1 mL y se colocó en una cámara de *Sedgewick Rafter* y se observó al microscopio para conteo. Una vez obtenido el número de individuos, se realizó el cálculo de la extrapolación de la dilución. El proceso de desencapsulación se realizó diariamente, para tener un suministro diario de *Artemia*.

Se tomó una medición diaria de temperatura y oxígeno disuelto por medio de un oxímetro y pH con un potenciómetro. También se revisaron constantemente las unidades experimentales para observar la mortalidad de larvas.

Para observar el efecto de los iones sobre la osmorregulación de las larvas y entre los tratamientos de agua de pozo y agua de la bahía, se analizaron los iones Na^+ y K^+ después del recambio, además de los cloruros y sulfuros al finalizar el experimento. Además se analizaron los iones Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ y K^+ por parte del laboratorio del CIAD unidad Hermosillo, tanto en las muestras de agua como en muestras de cuatro larvas por unidad experimental al final de experimento. Se aplicaron las técnicas avaladas por la FAO, y las Normas Oficiales Mexicanas; NOM-001-ECOL-1996, NOM-008-SCFI-1993 y la NMX-AA-116-SCFI-2001.

IV.4. Muestreos.

El experimento duró 23 días, se inició el 26 de junio de 2008 y se terminó con el último muestreo el 18 de julio de 2008. Las larvas se midieron inicialmente y cada cinco días se realizaron muestreos de ocho organismos sacrificados por unidad experimental, de 50 larvas por recipiente. Se tomaron mediciones de peso por medio de una balanza analítica, además de longitud estándar con ayuda de una reglilla bajo el microscopio estereoscopio. Las mismas larvas muestreadas fueron fijadas en formalina del 5-10% amortiguadora para ser utilizadas para su posterior análisis, seis de esas larvas destinadas para transparentación y dos para histología.

Se tomaron en cuenta cinco muestreos, el inicial ó T_0 el 18 de junio de 2008 y cuatro muestreos los días 26 de junio, 2, 11 y 18 de julio. En este último día se terminó la

fase experimental. Se consideró que 23 días de experimentación fueron suficientes para observar los cambios del experimento y porque las larvas al ser monitoreadas fueron disminuyendo conforme transcurrió el tiempo.

IV.5. Histología.

Con el fin de revisar el desarrollo del sistema digestivo y de la respuesta de alimentación se tomó como referencia la actividad secretora de las células de la mucosa presentes en los epitelios intestinales. Las muestras preservadas para análisis histológico se colocaron individualmente en casets para ser deshidratadas en diferentes soluciones como se muestra en el apéndice 1.

Una vez que la muestra esta deshidratada se embebe en anillos con parafina, posteriormente cuyo solidifica la parafina, por medio de un microtomo se hacen cortes de 5 μm y se colocan en un portaobjetos. Las muestras en el portaobjetos se pasan por baño María y se colocan en un horno para desparafinar. Una vez que la parafina ha sido completamente retirada se procedió al tren de tinción con el procedimiento de Hematoxilina-Eosina mostrado en el apéndice 2 (Humason, 1972).

De acuerdo con los datos obtenidos, se establecieron para el experimento los estadios de desarrollo del epitelio intestinal en esta fase de la siguiente manera:

Estadio 0.- Intestino poco o no visible, epitelios intestinales casi ausentes.

Estadio 1.- Epitelios intestinales cilíndricos poco desarrollados, sin ramificaciones, sin ensanchamiento en las puntas.

Estadios 2.- Epitelio intestinal con mayor número de ramificaciones, las puntas de estos muestran dos tipos de conjuntos celulares en las puntas, observándose la división por la diferencia de color, puntas más ensanchadas, aparecen las células productoras de mucus.

Estadio 3.- Epitelios intestinales desarrollados con ramificaciones y puntas ensanchadas, existe diferencia en las células de los epitelios más evidentes, muy marcada la presencia de las células de la mucosa.

Además del desarrollo intestinal se estableció la actividad de este al momento del muestreo, basándose en la presencia, cantidad y tamaño de las células de la mucosa. Se consideraron tres grados de actividad digestiva, de la siguiente manera.

Grado 0: Sin actividad.- No se observan células de la mucosa en los epitelios.

Grado 1: Actividad moderada.- células de la mucosa con menos del 50% de desarrollo del epitelio intestinal.

Grado 2: Actividad prominente.- células de la mucosa de tamaño mayor al anterior, estas cubriendo más del 80% del epitelio intestinal.

IV.6. Transparentación.

Para poder observar el sistema óseo de larvas se pueden utilizar dos métodos, por medio de rayos X y por transparentación de tejidos. El principio básico de la técnica de transparentación es que al utilizar la enzima tripsina se degrada el músculo y los órganos internos de la larva, pudiendo observar a través de la piel el sistema óseo de cualquier animal vertebrado pequeño, en este caso larvas de peces (Potthoff, 1984).

Las larvas previamente fijadas en formalina se colocaron en casetes histológicos etiquetados con papel alanene, de acuerdo a tratamiento y muestreo. La transparentación se realizó para observar la columna vertebral de las larvas de botete, se modificó el método de Potthoff (1984) como se describe a continuación.

1) Deshidratación: se lavaron las larvas fijadas en formalina de dos a cinco minutos con agua corriente, se colocaron en una solución de 50% de EtOH y 50% de agua destilada por 24 horas. Se pasó a una solución con EtOH al 100% por 24 horas; se regresó a una nueva solución de 50% de EtOH y 50% de agua destilada por 48 horas y nuevamente a EtOH 100% por 48 horas.

2) Tinción del cartílago: se preparó una solución con 70 ml de EtOH al 100%, 30 mL de ácido acético y 20 mg de azul alciano, por cada 100 mL de solución. Las muestras se mantuvieron en ésta solución por 24 horas.

3) Neutralización: se lavó en agua saturada con borato de sodio por 12 horas.

4) Decoloración: se preparó la solución con 15 mL de peróxido de hidrógeno al 3% y 85 mL de KOH al 1%, por cada 100 mL de solución. En esta solución se mantuvieron las larvas por 40 minutos.

5) Digestión con solución de tripsina: por cada 100 mL la solución de digestión se preparó 35 mL de agua destilada saturada con borato de sodio, 65 mL de agua destilada y 1.5 mL de tripsina marca Sigma. Las larvas se incubaron por un lapso mínimo de 10 días,

renovando la solución cada 6 días, hasta que el 60% de los organismos estuvieron transparentes.

6) Tinción del hueso: se preparó una solución con 0.1 g de rojo alizarina aforado con KOH al 1% para una solución de 100 mL, en la cual se mantuvieron las larvas por 24 horas.

7) Limpieza de la muestra: se colocó a las larvas en solución de digestión por un lapso mínimo de un mes, hasta que estuvieron transparentes para su observación.

8) Preservación: para preservar las larvas se transfirieron a una solución de 30% de glicerol, 70% de KOH al 1%, por cada 100 mL de solución incubándolas tres días. Posteriormente se pasan a una solución de 60% de glicerol y 40% de KOH al 1% por cada 100 mL de solución. Se incuban nuevamente por 3 días, finalmente las larvas se dejan en una solución de 100% de glicerol con timol.

IV.7. Punto de no retorno (PNR).

Se utilizaron cinco unidades experimentales de plástico de 20 litros, una por cada tratamiento de salinidad, 15, 25, 35, 45 mg/L y agua de la bahía. Dentro de cada unidad se colocaron ocho subunidades con recipientes de plástico de 400 mL: cuatro para densidad de alimentación baja y las otras cuatro para densidad de alimentación alta.

Dentro de cada subunidad se colocaron cuatro individuos (Fig. 3). Cada una de las cuatro subunidades dentro de cada tratamiento fue marcada con el día para volver a proporcionarles el alimento, los días 12, 13, 14 y 15 después de iniciado el experimento. Todas las unidades se mantuvieron con aereación constante por medio de bombas de acuario.

Se mantuvieron un total de 160 individuos sin alimento hasta observar un PNR_{100} , lo cual significa la muerte del 100% de los individuos en cada tratamiento de salinidad. Se tomó nota de los individuos muertos diariamente, además de la administración exclusiva de las subunidades correspondientes por día, solamente con alimento peletizado.

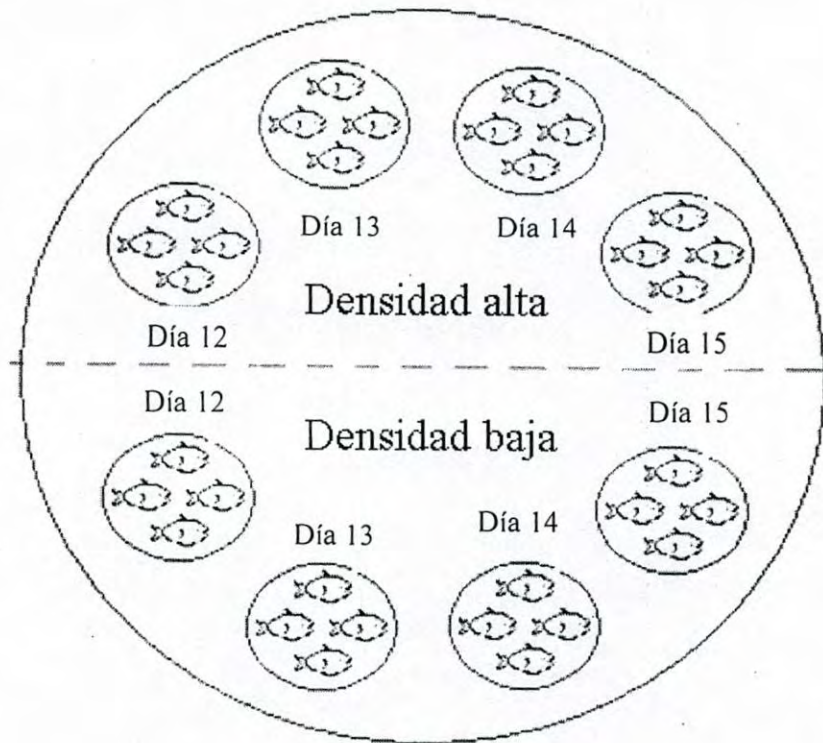


Figura 3.- Ejemplo de una unidad experimental con una salinidad determinada para el bioensayo de PNR. Se probaron dos densidades de alimentación (baja y alta) con cuatro subunidades, las cuales fueron marcadas para establecer el día en que se volvería a dar alimento. Cada subunidad contó con cuatro individuos.

IV .8. Análisis estadístico.

Los datos recabados por cada análisis, fueron sometidos a análisis exploratorios y homocedasticidad, después se analizaron por medio del programa estadístico Statgraphics plus 5.1 a $P < 0.5$ para aplicar el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis en los valores obtenidos de crecimiento y peso.

V. RESULTADOS.

Dentro de las variables fisicoquímicas, la temperatura promedio a lo largo del experimental fue de $25.7 \pm 0.67^\circ \text{C}$ (Fig. 4), con valores entre los tratamiento desde 24.7 a 27.1°C , con una variación aproximada de 2.5°C en todo el experimento. El pH estuvo a 8.0 ± 0.07 , con mínimas variaciones en el experimento para cada uno de los tratamientos, mientras que el oxígeno fue $5.5 \pm 0.75 \text{ mg/L}$, con variaciones de aproximadamente 3 mg/L , para todos los tratamientos con intervalos desde 3.5 a 6.8 mg/L . Debido a que el suministro de aire presentó pequeñas fallas. Los valores de éstas variables para cada uno de los tratamientos se muestran en los apéndices del 3 al 13.

Por otro lado, de los iones analizados en el agua de cada tratamiento, se muestran en las figuras 9-12, con promedio para sodio de $489 \pm 174 \text{ ppm}$ (Fig. 6), el potasio con $13.41 \pm 4 \text{ ppm}$, además de los cloruros $17,655.38 \pm 5780 \text{ ppm}$ y los sulfuros con promedio de $2,327.36 \pm 560.6 \text{ ppm}$.

En la Fig. 5 se muestra que en la concentración de calcio en los peces analizados existe una clara diferencia entre las densidades de alimentación, siendo mayor en la densidad de alimentación alta para todas las salinidades. La concentración se incrementa a altas densidades de alimento teniendo un máximo a 35 mg/L (4000 mg/kg). Sin embargo al aumentar más la salinidad, la concentración de calcio disminuye pero sin llegar a ser tan bajo como en las salinidades de 15 y 25 mg/L , 2617 y 2975 mg/kg respectivamente.

Para el caso de las concentraciones de magnesio (Fig. 6) la tendencia fue a incrementarse la concentración conforme se aumentó la salinidad en ambos tratamientos, partiendo de 190 mg/kg a 15 mg/L , con la más alta a 45 mg/L de 443 mg/kg .

Se observó además para los valores de sodio (Fig. 7) que en las densidades de alimentación baja no existe un patrón definido, pero se puede observar que tiende a valores altos conforme aumenta la salinidad, con excepción de la de 35 mg/L y agua de la bahía. Por otro lado en las densidades de alimentación alta, la tendencia del sodio es a incrementarse conforme se incrementa la salinidad teniendo un máximo a 45 mg/L de 1479.76 mg/kg , coincidiendo con el valor mayor en ésta para las densidades de alimentación baja de 1930.62 mg/kg .

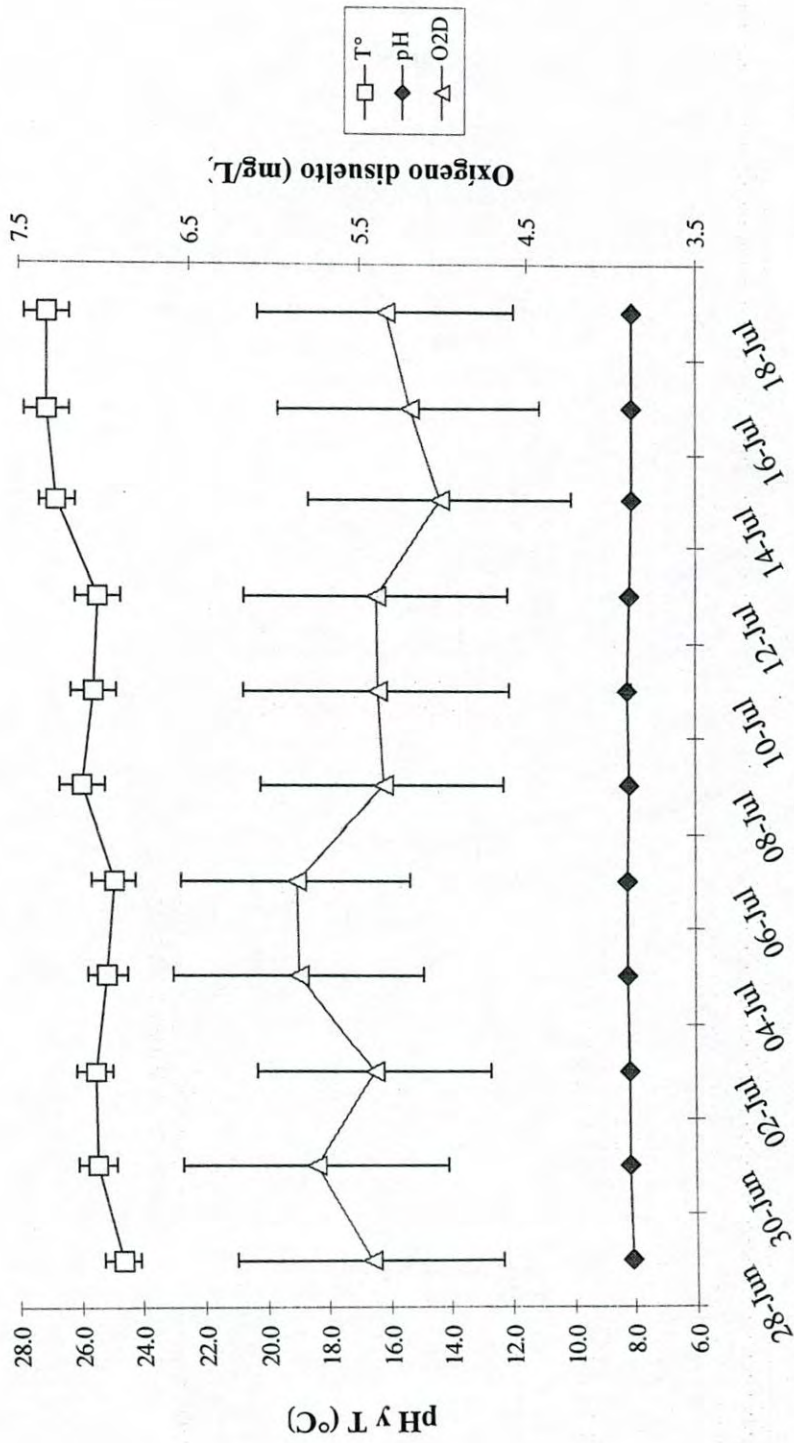


Figura 4.- Promedios de temperatura, pH y oxígeno disuelto en conjunto de todos los tratamientos, en todas las unidades experimentales para el botete diana, en condiciones de laboratorio. Cada punto representa el promedio de las 40 mediciones tomadas cada 2 días en los 23 días del experimental.

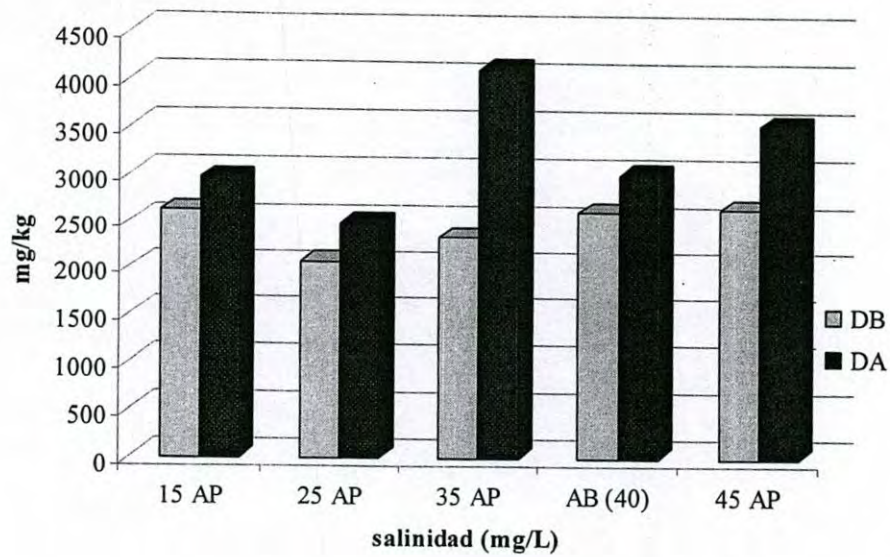


Figura 5.- Concentraciones de Calcio (Ca^{++}), en larvas de botete, con relación a la salinidad y a las densidades de alimentación. Cada barra representa el análisis de cuatro organismos. AP: agua de pozo, AB: tratamiento con agua de la bahía. DB: densidad de alimentación baja. DA: densidad de alimentación alta.

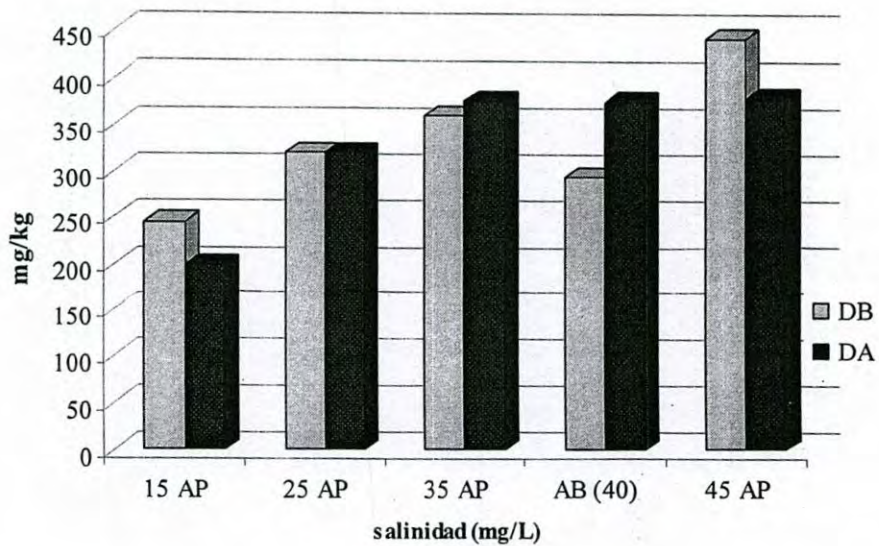


Figura 6.- concentraciones de Magnesio (Mg^{++}) en larvas de botete, con relación a la salinidad y a las densidades de alimentación. Cada barra representa el análisis de cuatro organismos. AP: agua de pozo, AB: tratamiento con agua de la bahía. DB: densidad de alimentación baja. DA: densidad de alimentación alta.

En las concentraciones de potasio (Fig. 8) se observa una tendencia de las densidades de alimentación baja a incrementarse a la salinidad de 35 mg/L con 2560.39 mg/kg, para después disminuir hacia las salinidades más altas. Por su parte a densidades de alimentación alta por el contrario las concentraciones disminuyen hacia la salinidad de 35 mg/L con 2144.43 mg/kg, incrementándose nuevamente hacia las salinidades más altas.

Las concentraciones de sodio en las muestras de agua (Fig. 9), mostraron el valor más alto a 35 mg/L con 744.81 mg/kg para ambos niveles de alimentación y decrecientan sus valores al incrementarse la salinidad hasta la salinidad de 45 mg/L (472.42 mg/kg). Los valores a bajas salinidades si coinciden con el patrón encontrado para las larvas con concentraciones menores de sodio de 255 y 418 mg/kg respectivamente.

Para las concentraciones de potasio (Fig. 10) en agua los valores se incrementan hacia la salinidad de 35 mg/L (20.24 ppm en densidad de alimentación baja) para disminuir a las salinidades más altas de 45 mg/L con un mínimo de 9.13 ppm en las densidades de alimentación alta, siendo para todas las salinidades las densidades de alimentación alta las que presentaron las menores concentraciones.

Para el caso de los cloruros y sulfuros (Fig. 11 y 12) en ambos casos las densidades de alimentación no muestran diferencias significativas. Sin embargo la salinidad sí juega un papel muy importante en las concentraciones, las cuales van de 9449.91 ppm para cloruros y 1373.59 ppm para sulfuros en salinidad de 15 mg/L, a 26603.75 ppm de cloruros y 2809.72 ppm de sulfuros a salinidad de 45 mg/L.

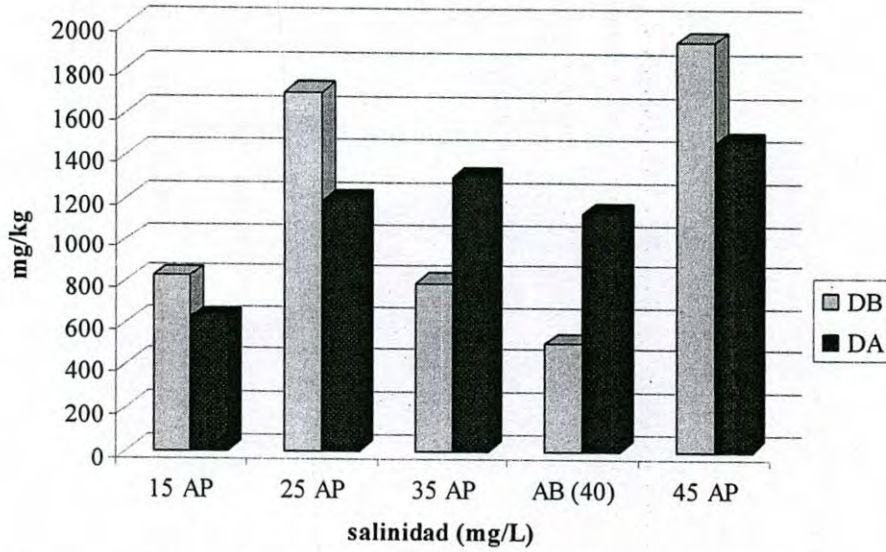


Figura 7.- Concentraciones de sodio (Na^+), en larvas de botete, con relación a la salinidad y a las densidades de alimentación. Cada barra representa el análisis de cuatro organismos. AP: agua de pozo, AB: tratamiento con agua de la bahía. DB: densidad de alimentación baja. DA: densidad de alimentación alta.

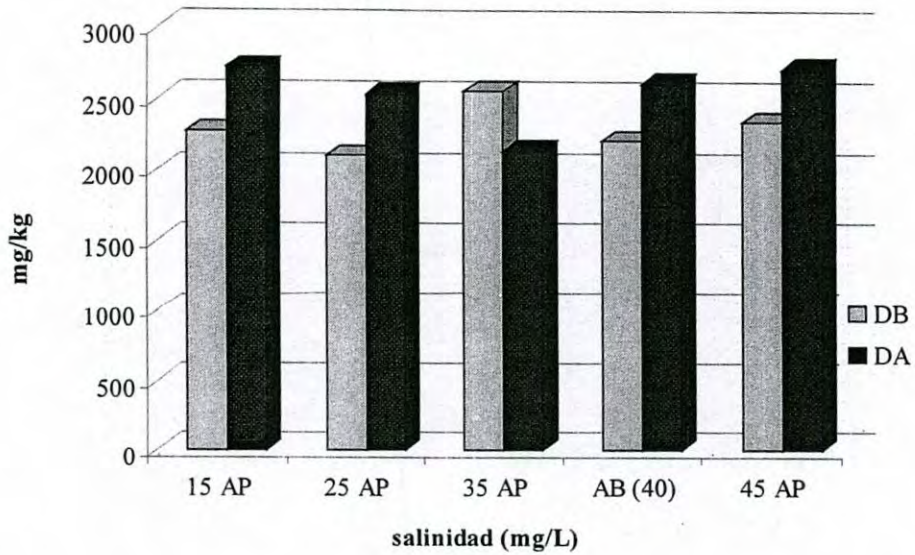


Figura 8.- Concentraciones de potasio (K^+), en larvas de botete, con relación a la salinidad y a las densidades de alimentación. Cada barra representa el análisis de cuatro organismos. AP: agua de pozo, AB: tratamiento con agua de la bahía. DB: densidad de alimentación baja. DA: densidad de alimentación alta.

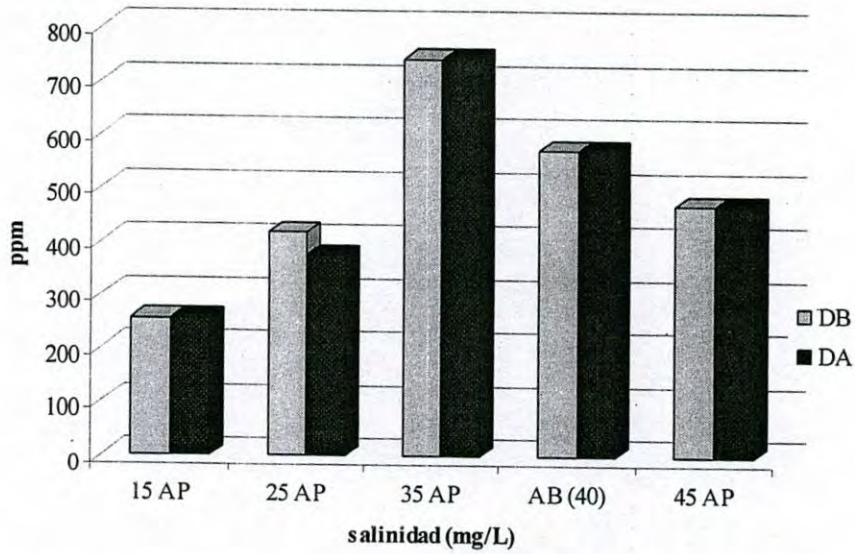


Figura 9.- Promedio de la concentración de sodio (Na^+), en muestras de agua a diferentes salinidades y densidades de alimentación al final del experimento. Cada barra representa las cuatro unidades experimentales por tratamiento. AP: agua de pozo. AB: agua de la bahía. DB: densidad de alimentación baja. DA: densidad de alimentación alta.

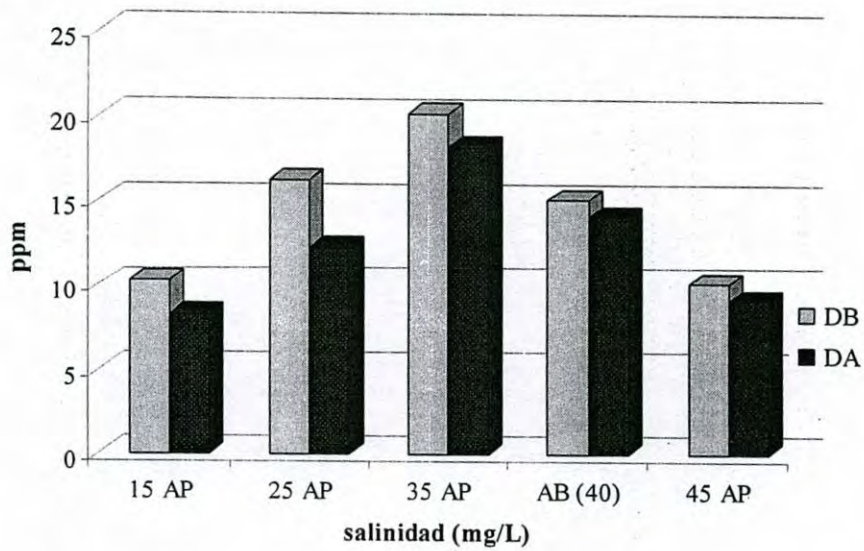


Figura 10.- Promedio de la concentración de potasio (K^+), en muestras de agua a diferentes salinidades y densidades de alimentación al final del experimento. Cada barra representa las cuatro unidades experimentales por tratamiento. AP: agua de pozo. AB: agua de la bahía. DB: densidad de alimentación baja. DA: densidad de alimentación alta.

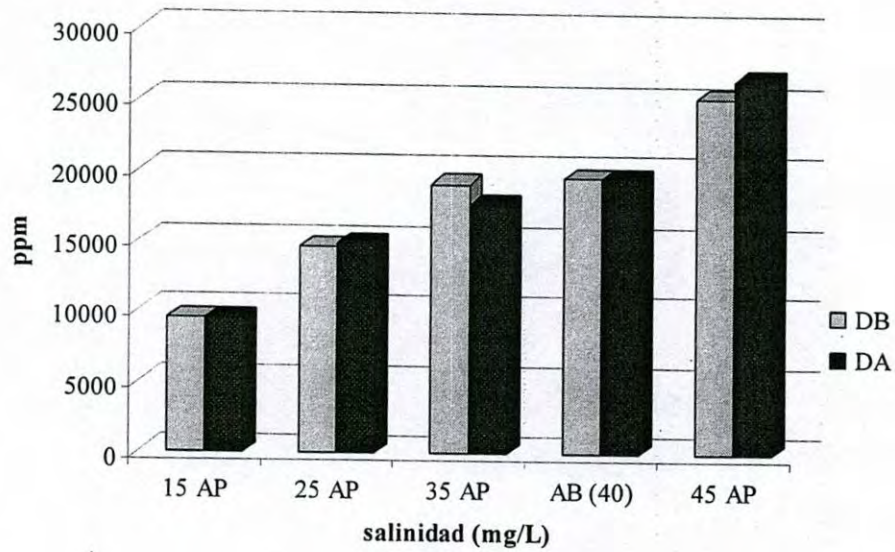


Figura 11.- Promedio de la concentración de cloruros en muestras de agua a diferentes salinidades y densidades de alimentación al final del experimento. Cada barra representa las cuatro unidades experimentales por tratamiento. AP: agua de pozo. AB: agua de la bahía. DB: densidad de alimentación baja. DA: densidad de alimentación alta.

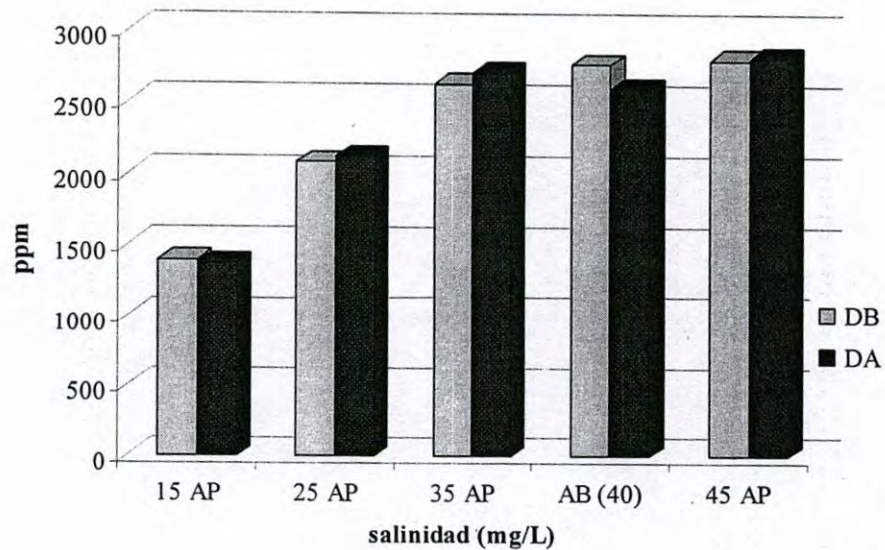


Figura 12.- Promedio de la concentración de sulfuros en muestras de agua a diferentes salinidades y densidades de alimentación al final del experimento. Cada barra representa las cuatro unidades experimentales por tratamiento. AP: agua de pozo. AB: agua de la bahía. DB: densidad de alimentación baja. DA: densidad de alimentación alta.

V.1 Crecimiento.

Al final del presente experimento se observó una diferencia significativa del crecimiento ($P \leq 0.05$) entre las dos densidades de alimentación. En el tratamiento con la densidad de alimentación alta fue notable un crecimiento y fue significativamente mayor ($P \leq 0.05$) comparado con la densidad de alimentación baja.

Dentro de los tratamientos de densidad de alimentación baja, se tuvo un crecimiento final promedio de 13.92 ± 1.6 mm (Fig. 13). Por otro, lado el incremento en la talla en las densidades de alimentación altas presentan valores mayores hasta de 17.17 ± 1.65 mm a 35 mg/L, siendo este tratamiento el que presentó el mayor crecimiento. En ambas densidades de alimentación se muestra un menor crecimiento a mayor salinidad de 45 mg/L, con 12.63 ± 1.06 mm para el T5.

En general, para ambas densidades de alimentación los crecimientos mayores fueron para 15 y 35 mg/L y los menores los de 45 mg/L, la diferencia fue altamente significativa entre las densidades de alimentación alta y baja ($P \leq 0.05$). sin embargo no existieron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre el tratamiento con agua de pozo (35 mg/L) y el tratamiento de agua de la bahía (40 mg/L)

Para los tratamientos (T1-T5) de densidad de alimentación baja (Fig. 14) el crecimiento observado de T0 al cuarto muestreo fue significativo ($P \leq 0.05$) de 5 a 15 mm en todas las salinidades. Con relación a la alimentación con densidad alta se observan valores con diferencia significativa ($P \leq 0.05$) desde 5 mm de longitud hasta máximas de 18 mm en las larvas en todas las salinidades probadas (Fig. 15).

Se observó que la alimentación alta proporcionó un mayor peso a las larvas de botete (Fig. 16), ya que la densidad baja solo llegó en promedio a 0.1487 g de peso en el tratamiento 1 (15 mg/L), mientras que para la densidad de alimentación alta del T8 (35 mg/L) se alcanzó un peso promedio de 0.277 g.

El incremento en peso de las larvas de botete fue altamente significativo ($P \leq 0.05$) en todas las salinidades en todo el experimento (Fig. 17) y se incrementó de 0.02 g a 0.14 g para las densidades de alimento bajo. No obstante, no se observan diferencias significativas entre las salinidades probadas. Mientras que en los tratamientos de densidad de alimentación alta el crecimiento se incrementó significativamente ($P \leq 0.05$) de 0.02g a 0.35g (Fig. 18).

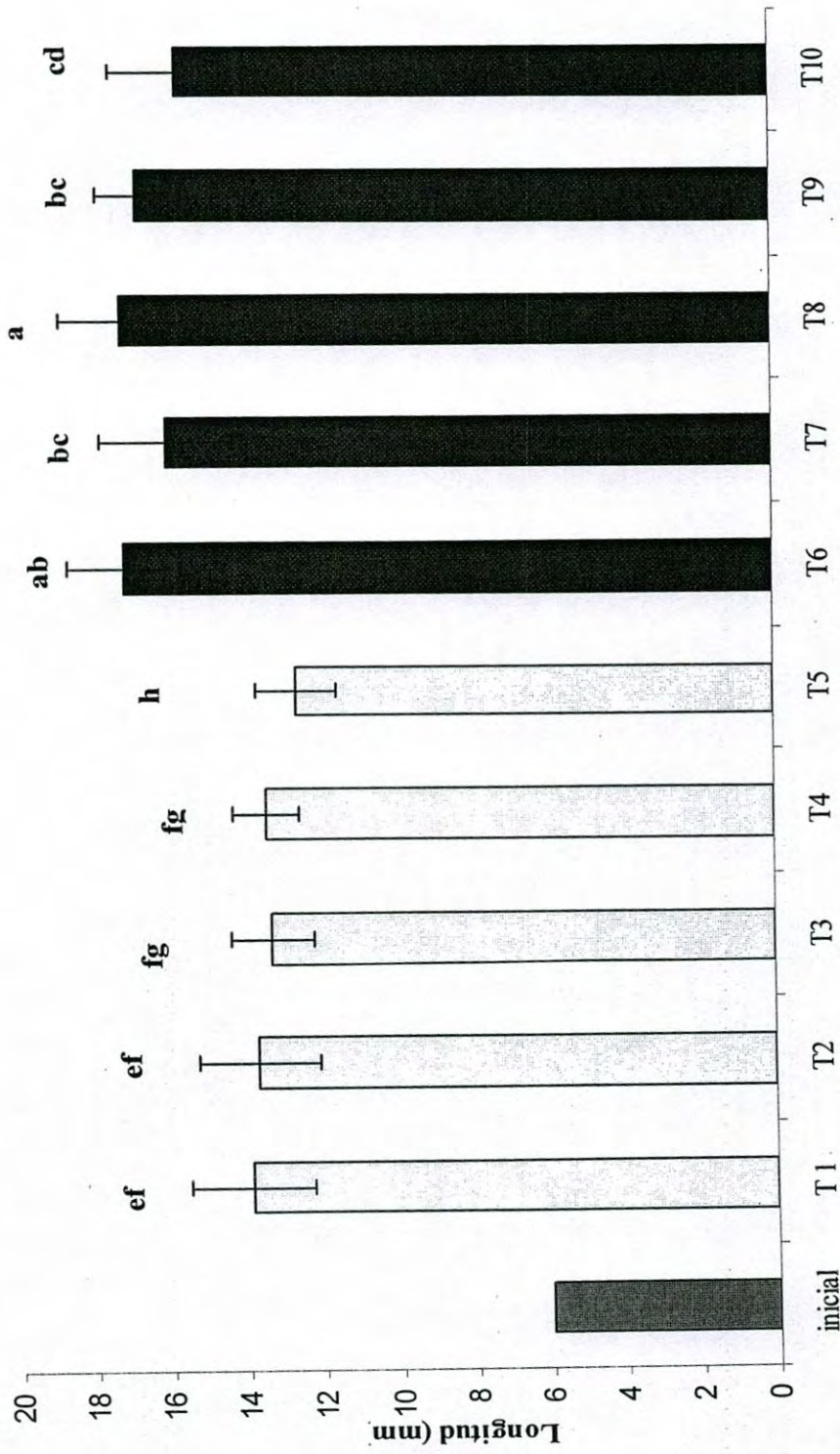


Figura 13.- Longitud estándar promedio y desviación estándar por tratamientos, comparado con el valor de longitud estándar inicial. Barras de densidades de alimentación baja (T1-T5) y densidad de alimentación alta (T6-T10).

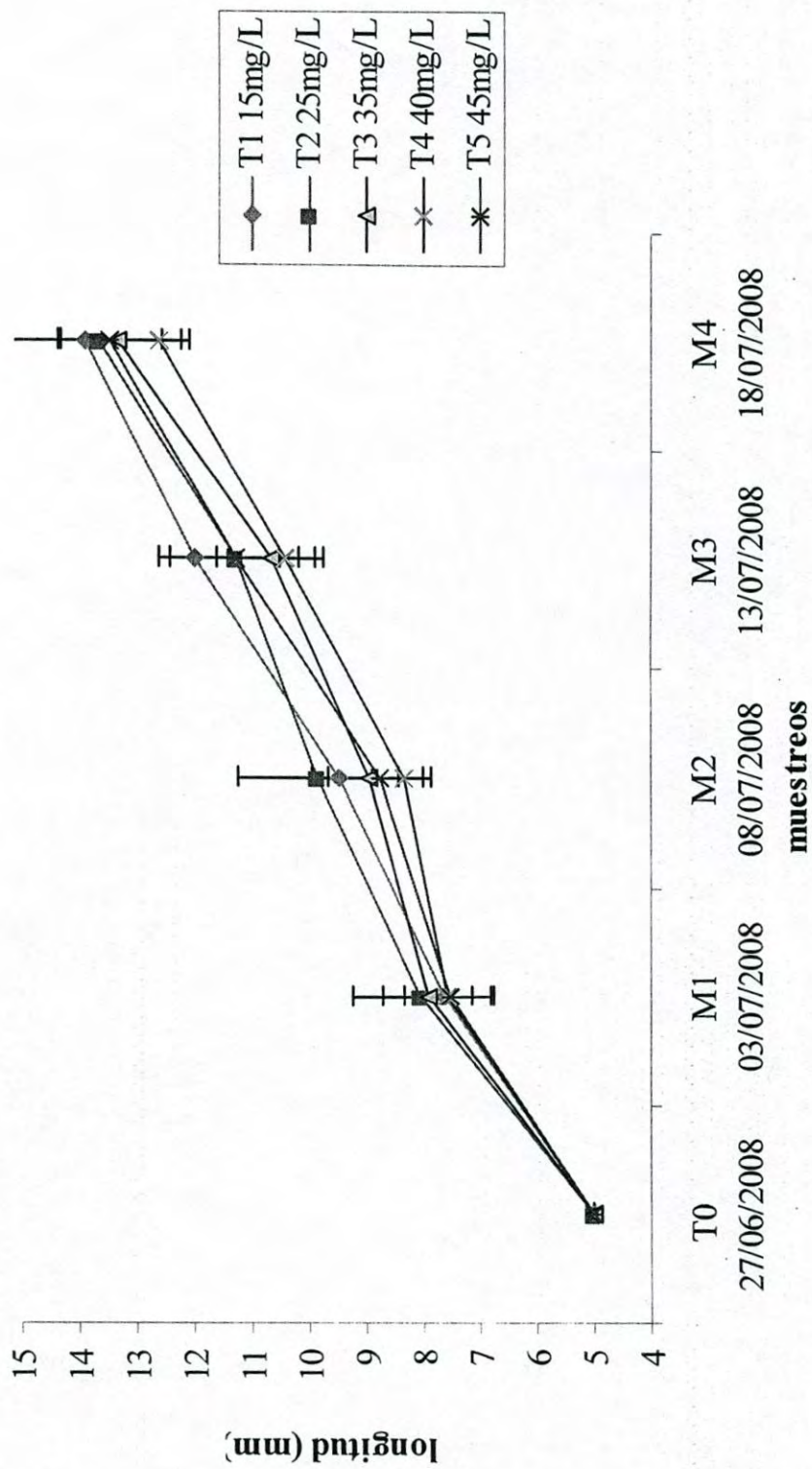


Figura 14.- Crecimiento promedio en longitud estándar (mm) a lo largo del experimento para los tratamientos con densidad de alimentación alta, a salinidades de 15, 25, 35, 40, 45 mg/L. T0; muestreo inicial. M= muestreo. Cada punto representa 24 larvas.

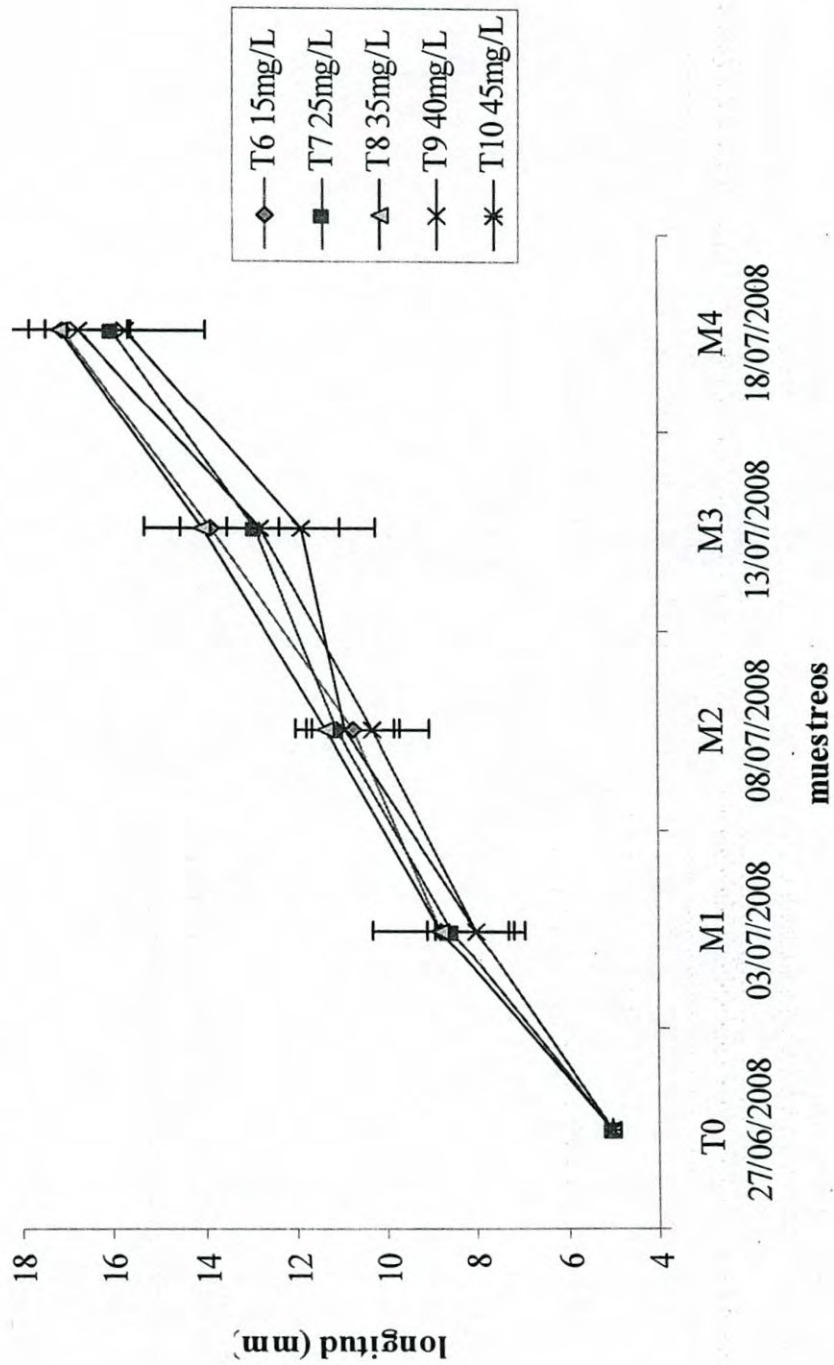


Figura 15.- Crecimiento promedio en longitud estándar (mm) a lo largo del experimento para los tratamientos con densidad de alimentación alta, a salinidades de 15, 25, 35, 40, 45 mg/L. T0; muestreo inicial. M= muestreo. Cada punto representa 24 larvas.

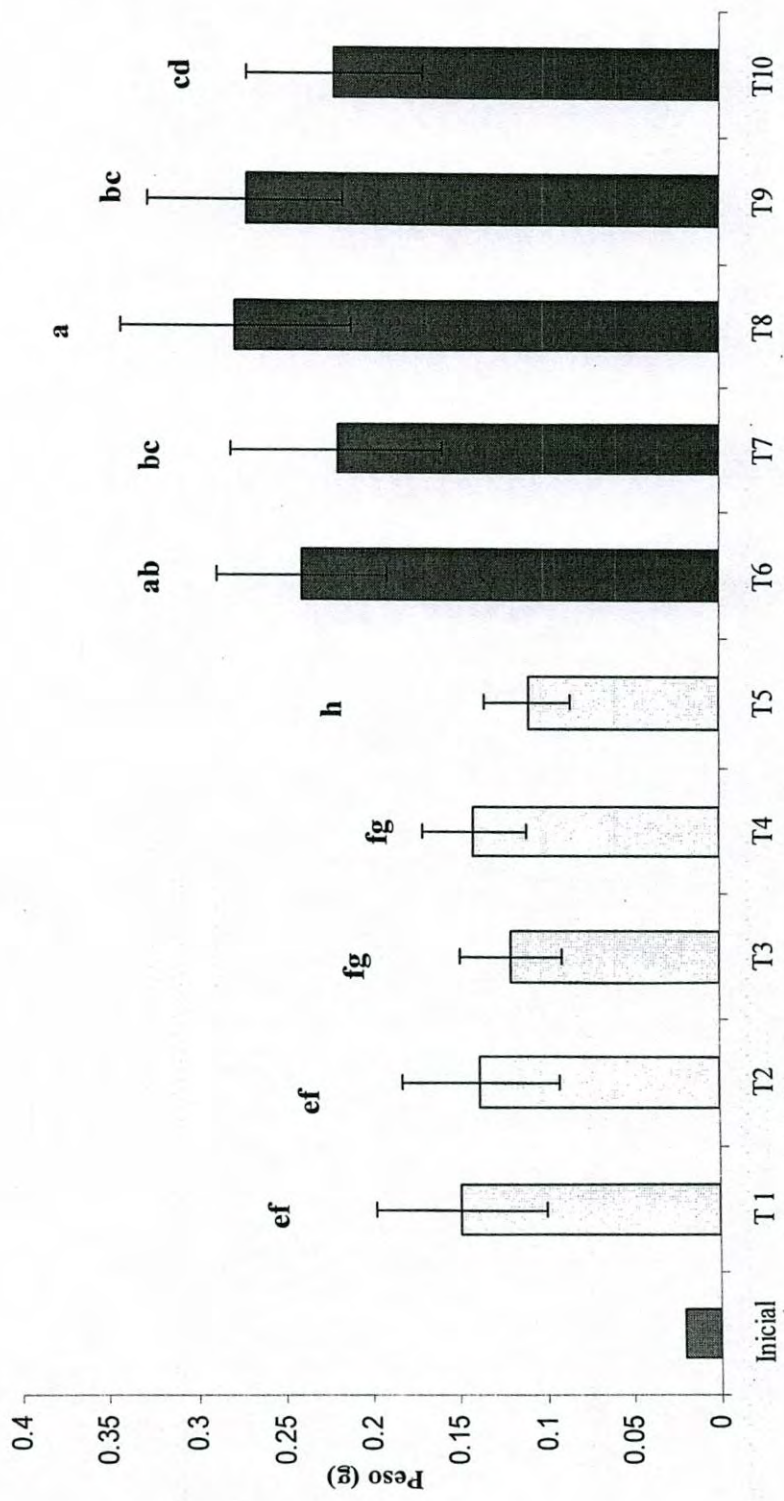


Figura 16.- Peso promedio y desviación estándar por tratamientos, comparado con el valor de peso inicial. Barras de densidades de alimentación baja (T1-T5) y densidad de alimentación alta (T6-T10).

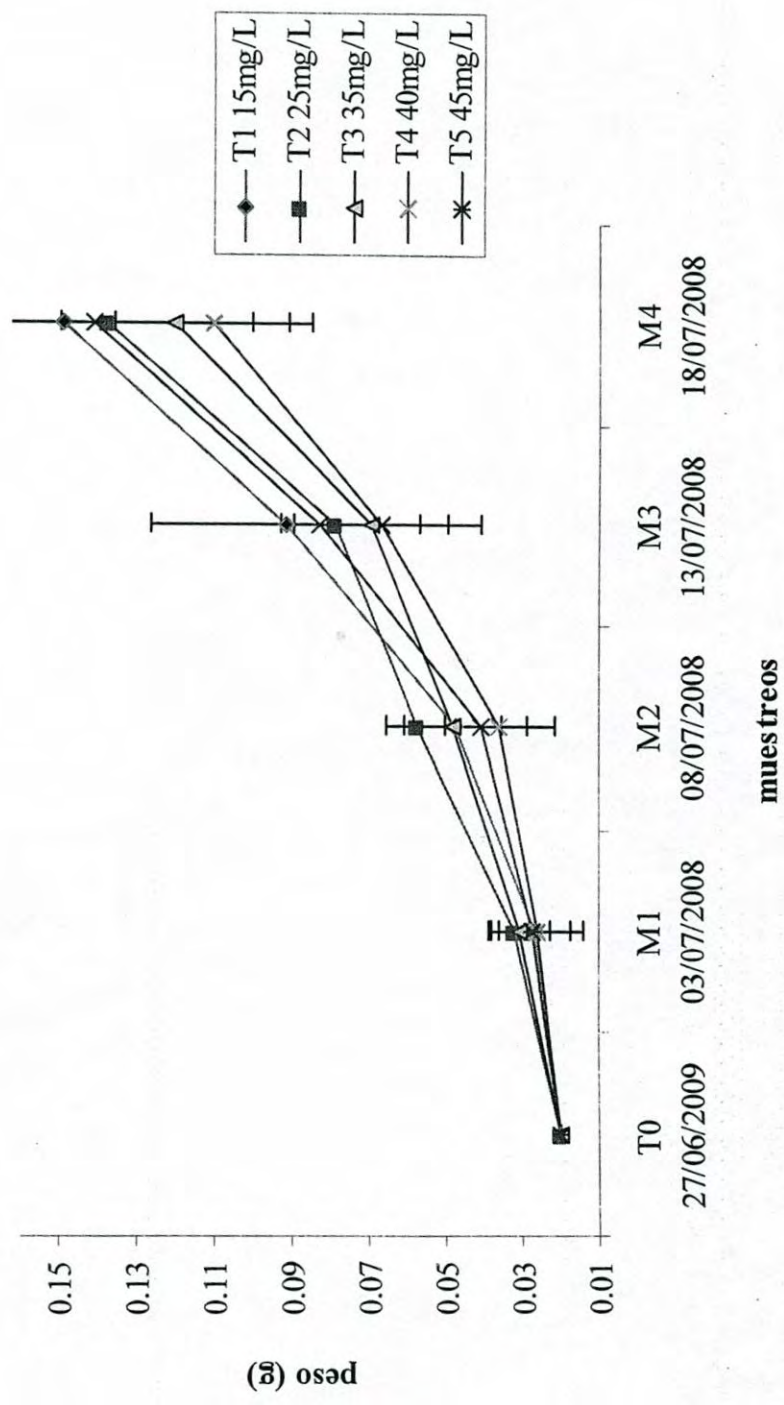


Figura 17.- Crecimiento promedio en peso (g) a lo largo del experimento para los tratamientos con densidad de alimentación alta, a salinidades de 15, 25, 35, 40, 45 mg/L. T0; muestreo inicial. M= muestreo. Cada punto representa 24 larvas.

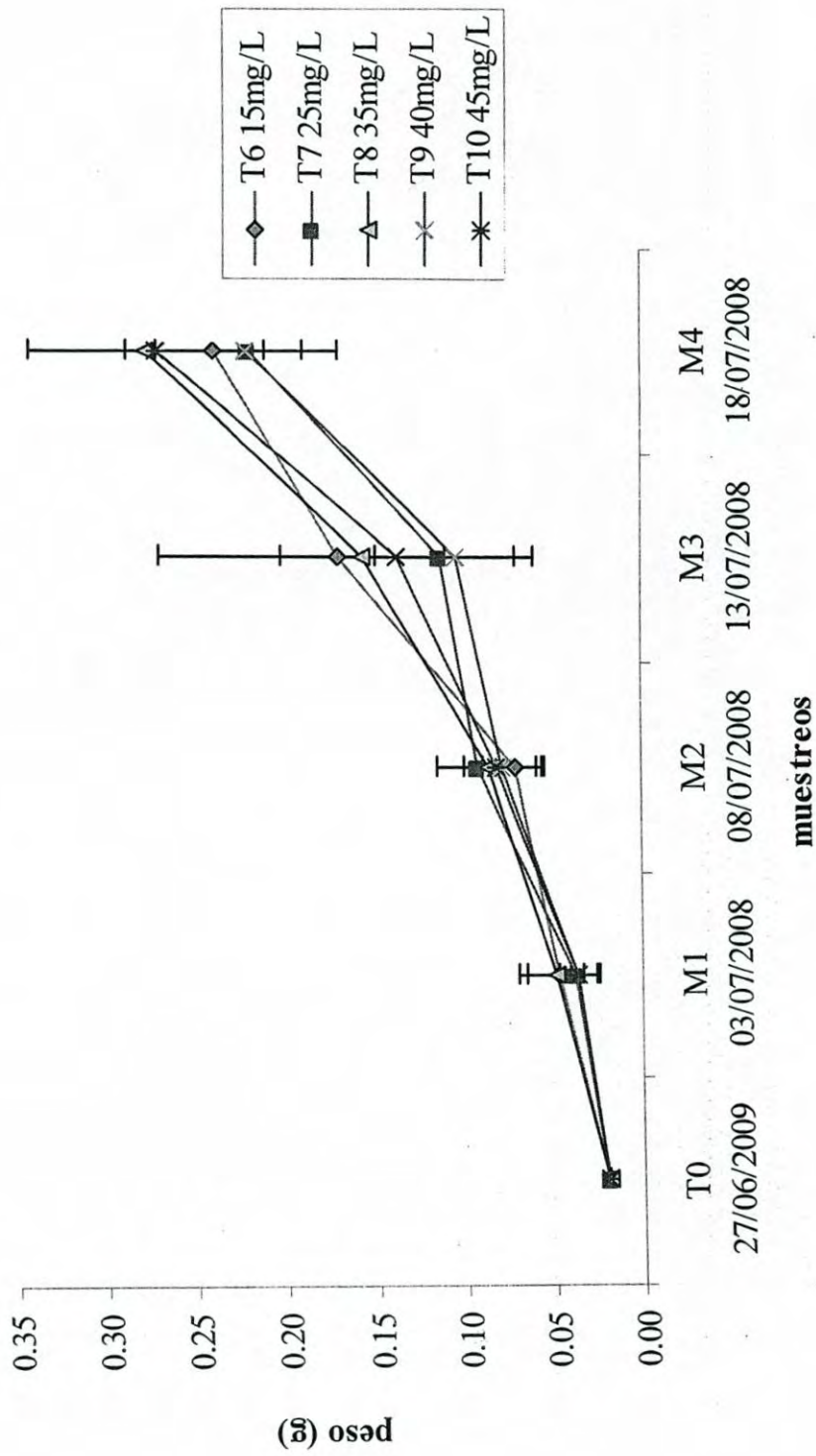


Figura 18.- Crecimiento promedio en peso (g) a lo largo del experimento para los tratamientos con densidad de alimentación alta, a salinidades de 15, 25, 35, 40, 45 mg/L. T0; muestreo inicial. M= muestreo. Cada punto representa 24 larvas.

V.2 Mortalidad.

Se puede observar que la baja densidad de alimentación y las diferentes salinidades no son detonantes de mortalidad (Fig. 19), ya que todos los tratamientos mantienen un intervalo de mortalidad entre 0 y 6%, ésta atribuida a la manipulación diaria y de los muestreos, ya que en las réplicas testigo para cada tratamiento, la mortalidad va del 0 al 2%. La excepción fueron las salinidades de 35 y 40 mg/L con densidad de alimentación baja (T3 y T4), donde la mortalidad se debió a repentinas muertes masivas (27 y 72%).

En el apéndice 14 se muestra por tratamiento las diferencias entre los organismos tratados y los testigos a través del tiempo de experimento. A excepción del tratamiento 2 y 4, en todos los demás tratamientos la mortalidad de los organismos testigos es mucho menor al 5%. En los tratamientos donde la mortalidad es mayor o igual como es el caso del tratamiento 3 y 4 esto se debió a mortalidades masivas e inesperadas ajenas a la manipulación humana.

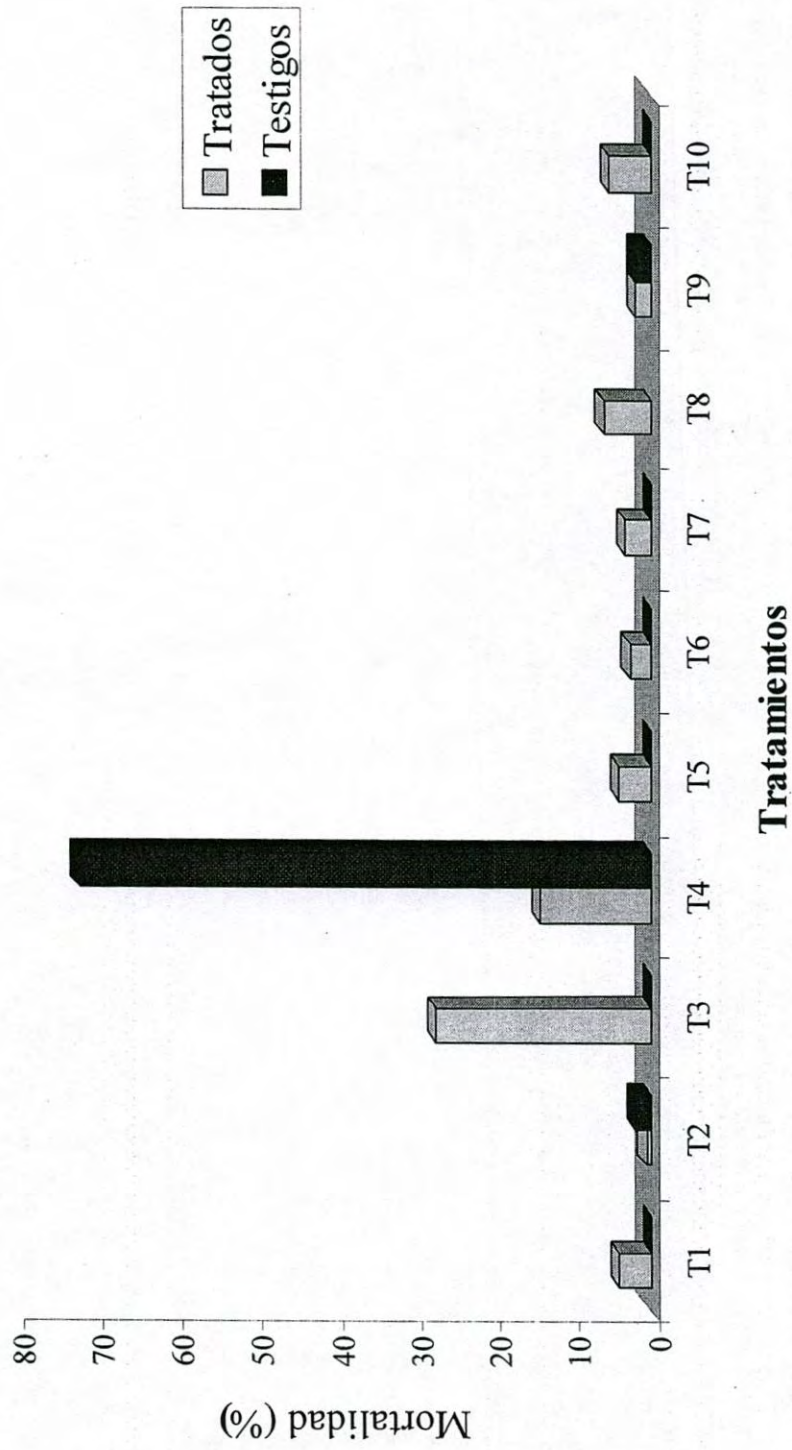


Figura 19.- Porcentaje de mortalidad final de los organismos por tratamientos con sus respectivas réplicas de testigos.

V.3. Deformidades de la columna.

Para cada tratamiento el total de cada una de las deformidades, lordosis, escoliosis y cifosis, alcanzó un máximo de 0.05% en los organismos, con deformidad en el tratamiento de 45 mg/L y con densidad de alimentación baja (T5) (Fig. 20). Se puede observar que en los tratamientos con densidad de alimentación alta el porcentaje de deformidades fue menor, aún incluso menor a la de los organismos testigo así como cuando la salinidad se bajó a niveles menores de 15 y 25 mg/L, en donde el porcentaje de deformidades disminuyó hasta cero (Fig. 20).

Por otro lado, el tratamiento de 45 mg/L (T5) mostró la mayor variedad de deformidades, (Fig. 21), siendo la lordosis la más abundante con un 0.035% de organismos afectados. Mientras que para el caso del tratamiento con la misma salinidad pero con densidad de alimentación alta, solo se presentó un 0.005% de organismos afectados, con cifosis como única deformidad observada.

Se pudo observar en el experimento que el tipo de deformidad que predomina para todos los tratamientos de salinidad y densidad de alimentación es lordosis, presentándose principalmente en los tratamientos con densidades de alimentación bajas. Mientras que los tratamientos con densidades de alimentación alta, presentan bajos porcentajes de lordosis.

En la Fig. 22, se muestra una larva sometida a la técnica de transparentación con una columna sana. Los diferentes tipos de deformidades encontradas (lordosis, escoliosis, combinación de lordosis+escoliosis y cifosis) y el grado de alteración de la columna, así como la parte de la columna donde se presentó la deformidad se muestran en las figuras 23-27. También en los apéndices 15 y 16 se muestran los datos crudos de los porcentajes acumulados de los diferentes tipos de deformidades, como el acumulado para cada tratamiento.

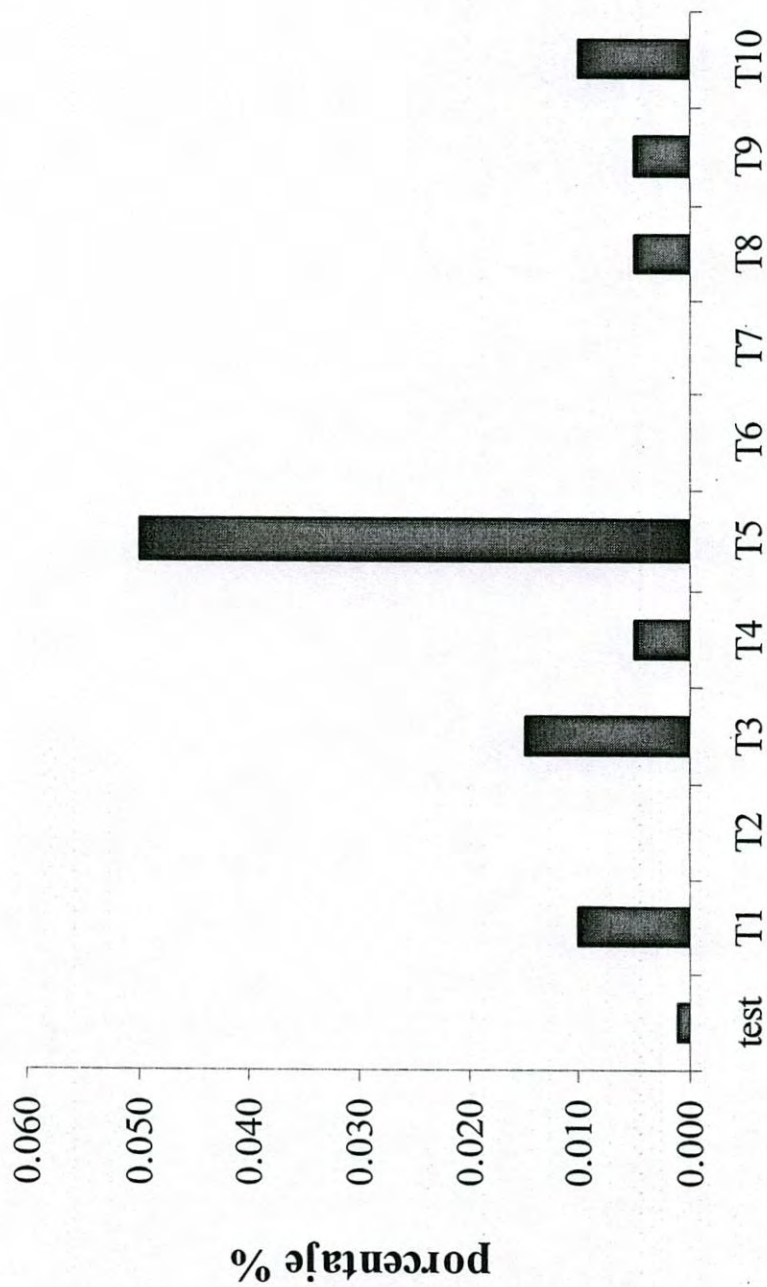


Figura 20.- Porcentaje de deformidades en conjunto al final del experimento para larvas de botete para cada tratamiento. test: testigo.

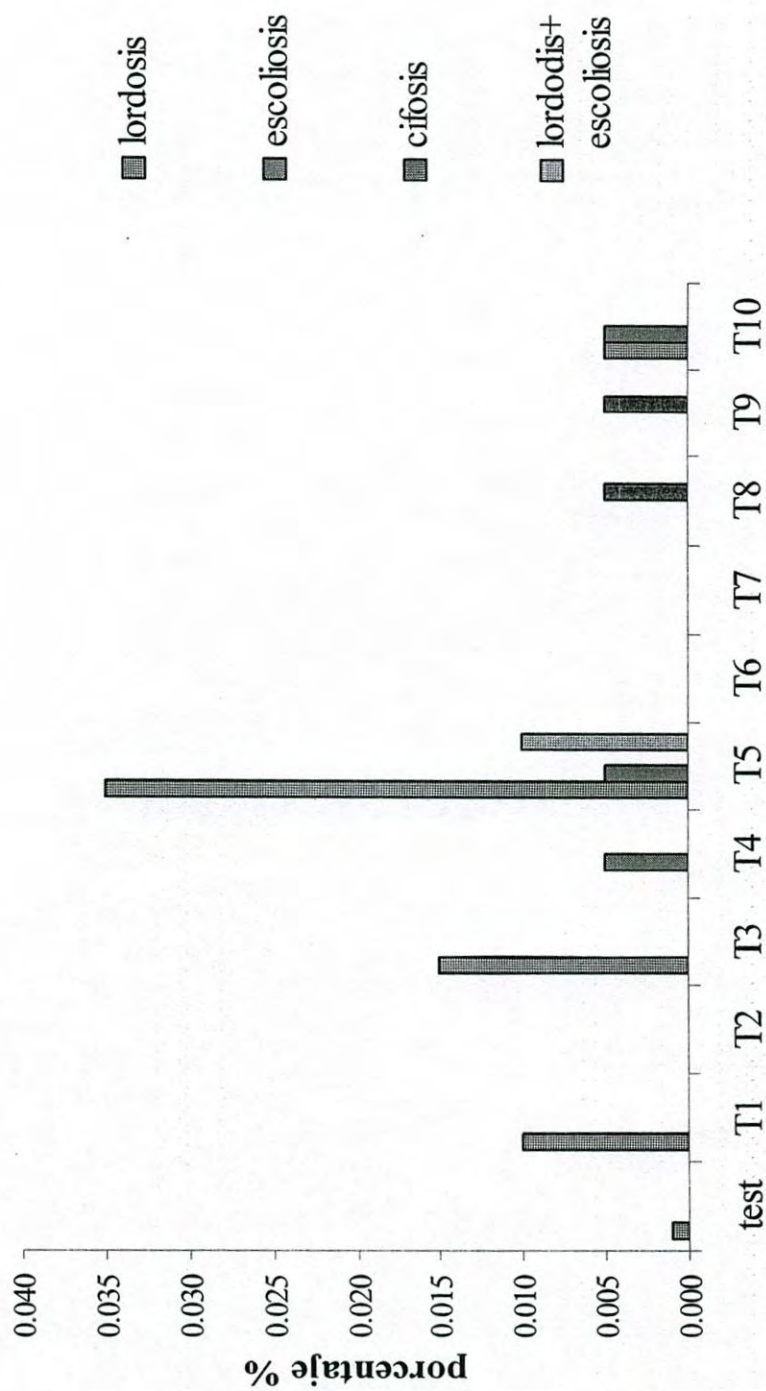
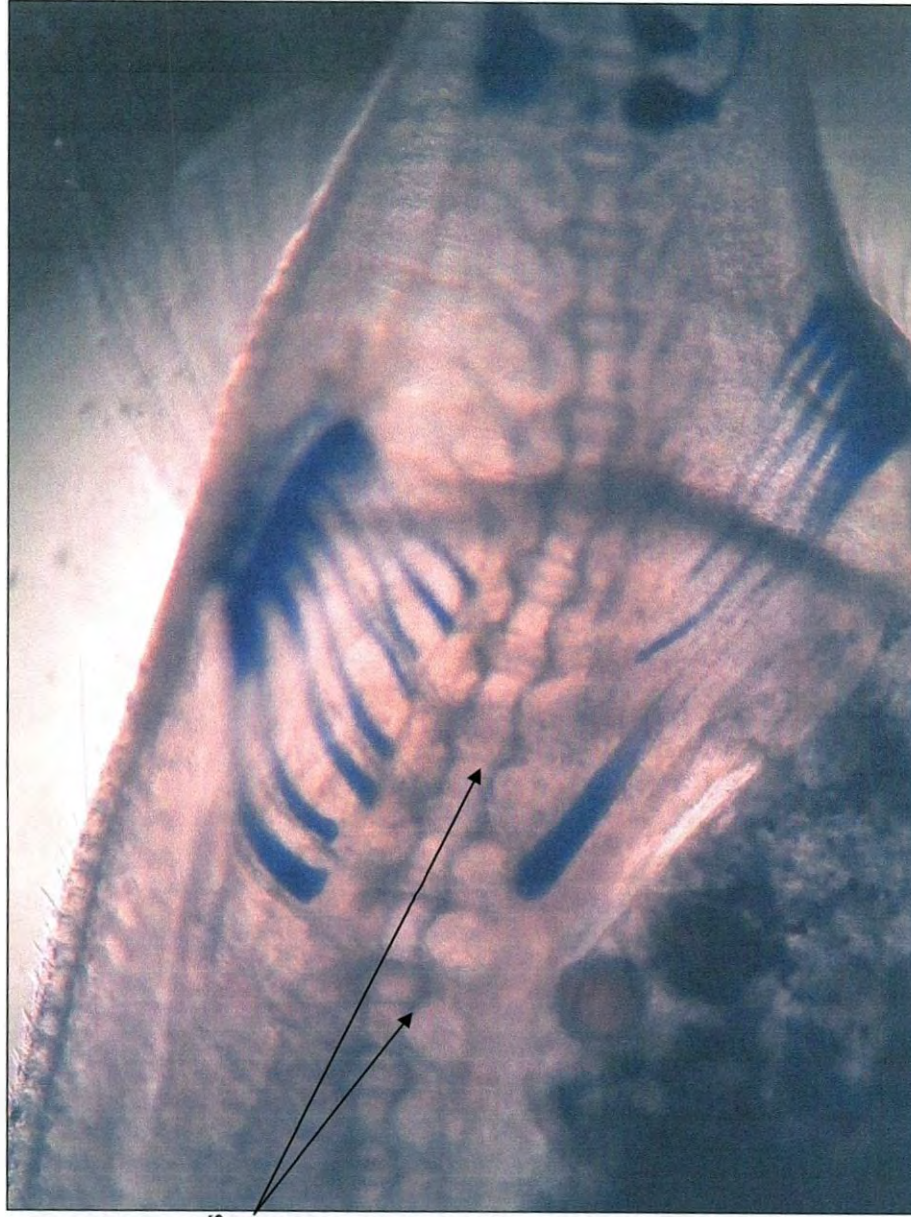


Figura 21.- Porcentaje para cada deformidad en larvas de botete en cada uno de los tratamientos de salinidad y densidad de alimentación. test: testigo.



Vértex
normales

Figura 22.- Larva de botete transparentada con desarrollo de la columna normal proveniente del tratamiento de 35 mg/L y densidad de alimentación baja. Se observa un desarrollo correcto en cada vértebra así como la curvatura de la misma sin alteraciones.

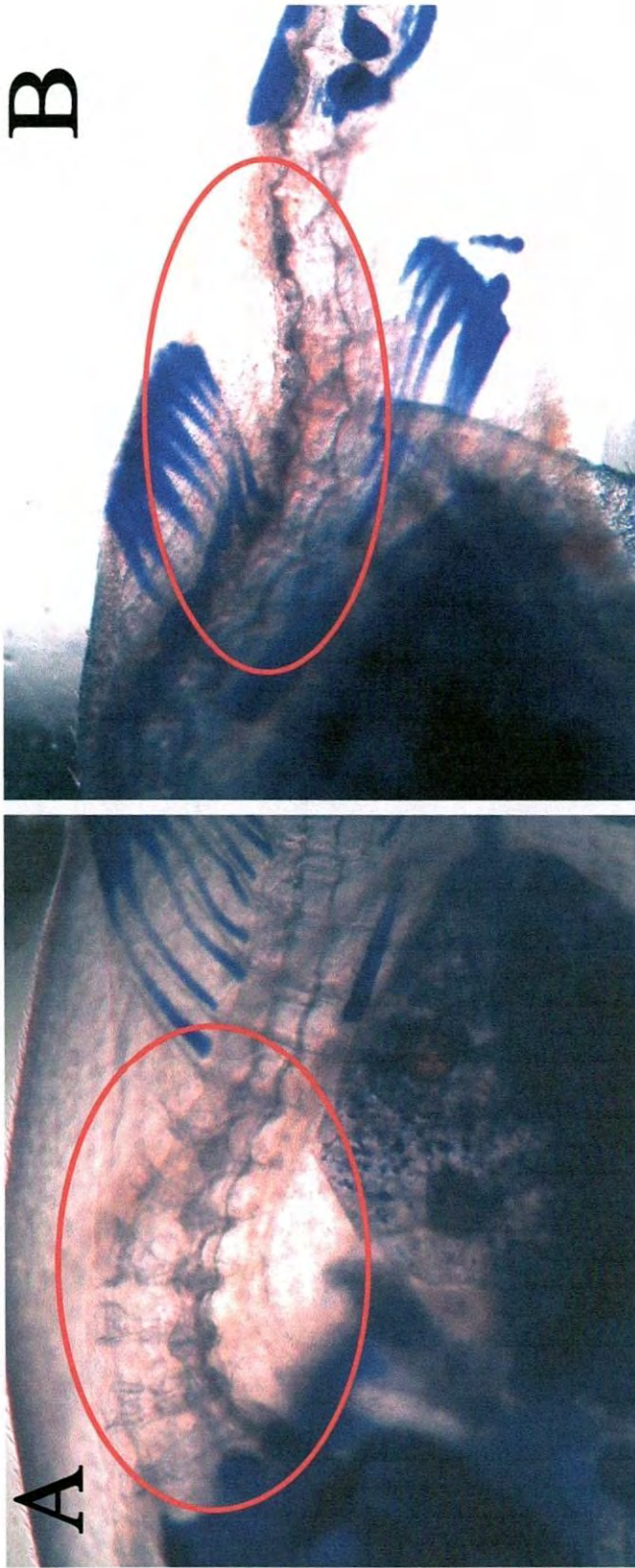


Figura 23.- Larvas de botete diana con lordosis. A: lordosis moderada en las vértebras anteriores, del tratamiento de 35 mg/L y densidad de alimentación baja. B: lordosis ligera en vértebras de la parte media del tratamiento de agua de la bahía, densidad de alimentación alta.



Figura 24. Vista superior de larva de botete diana con escoliosis severa en vértebras de la parte media. Tratamiento 4 (45 mg/L densidad de alimentación baja).

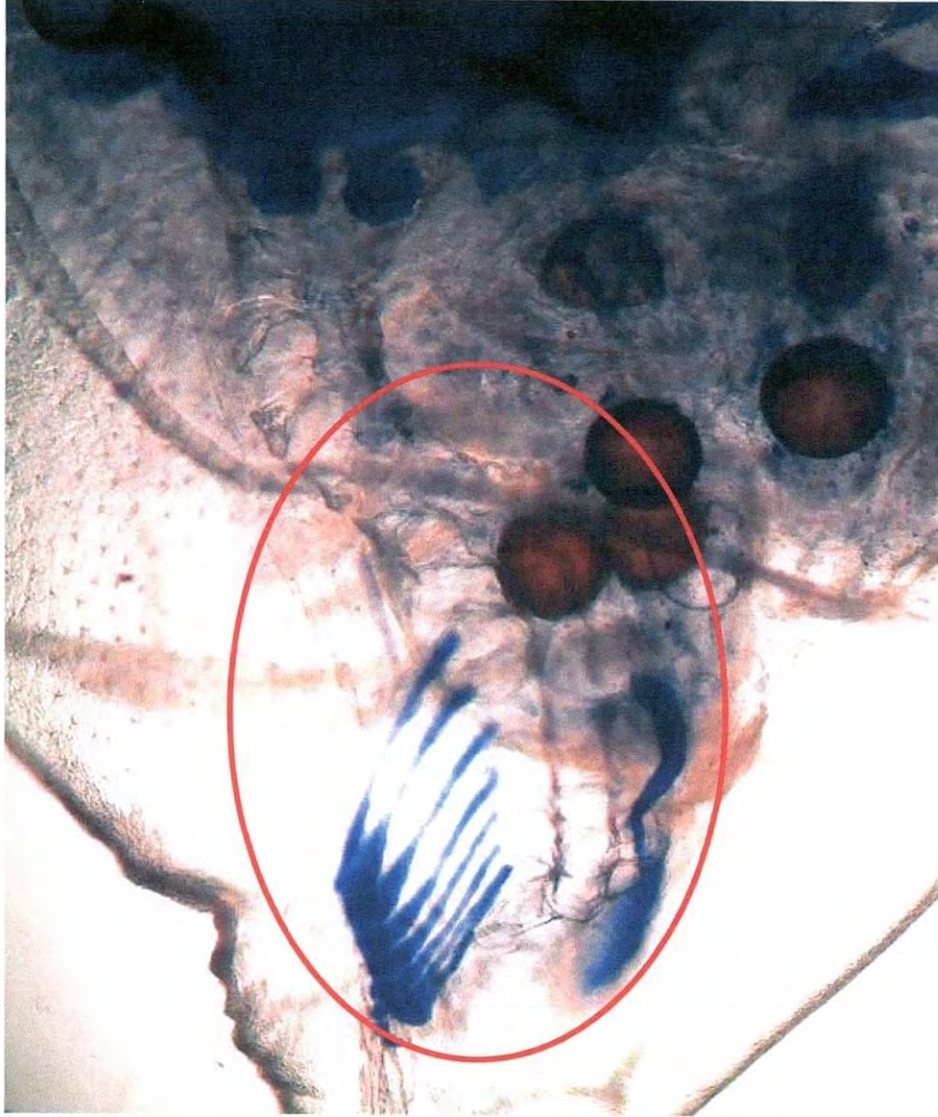


Figura 25.- Vista lateral de larva de botete diana con escoliosis severa en vértebras de la región media. Tratamiento de agua de la bahía con densidad de alimentación alta.

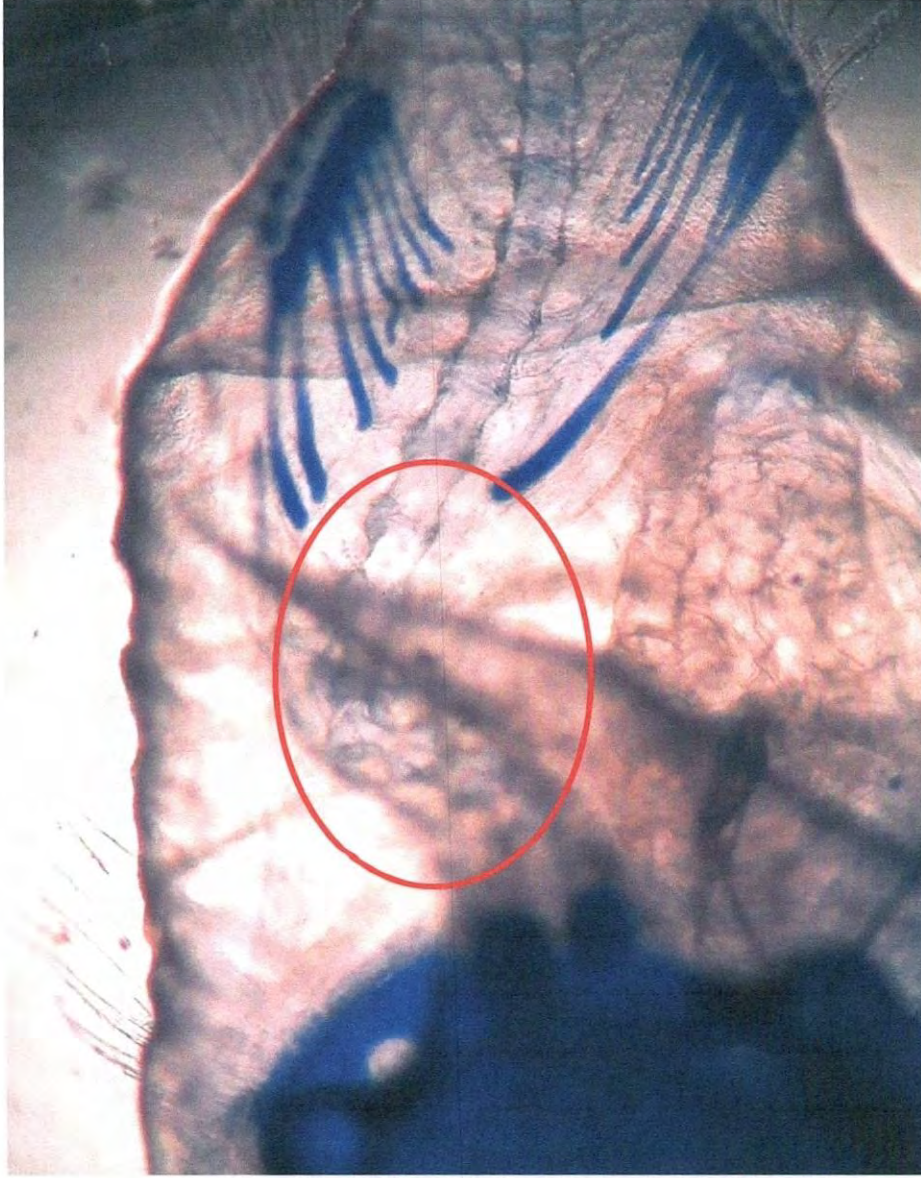


Figura 26.- Larva de botete diana con combinación de deformidades, lordosis y escoliosis en vértebras de la región media. Tratamiento de 45 mg/L con densidad de alimentación baja. Este tipo de deformidad puede observarse en vista dorsal y lateral.

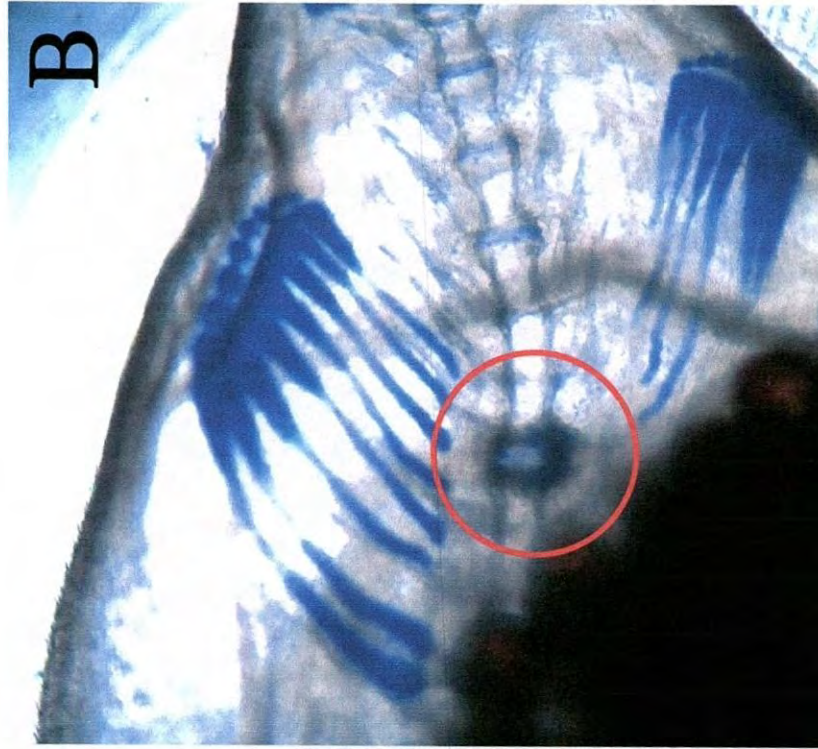
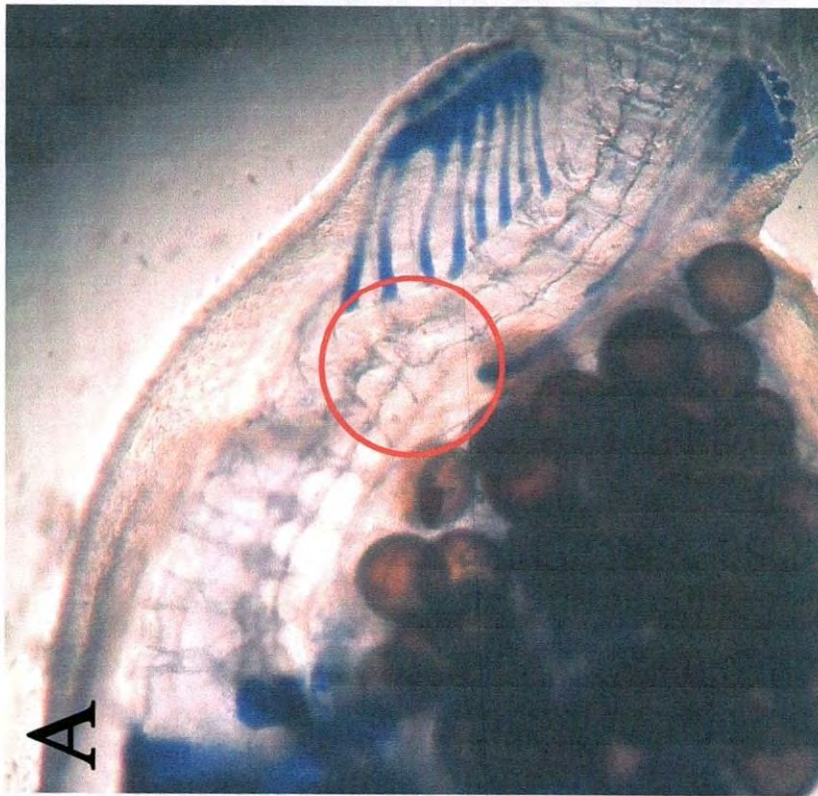


Figura 27.- Dos larvas de botete diana con cifosis de tipos distintos. A: cifosis intervertebral (separación de vértebras), a 45 mg/L con densidad de alimentación alta. B: cifosis de fusión de vértebras, tratamiento de 35 mg/L y densidad de alimentación alta.

V.4. Histología.

V.4.1. desarrollo de los epitelios intestinales.

De acuerdo al desarrollo que presentaron las larvas a lo largo del experimental de los 28 a los 48 DDE, se observaron los 4 diferentes estadios del desarrollo del intestino. En la Fig. 28, se muestra el tracto digestivo de una larva de botete con los órganos internos, además en las figuras de la 29 a la 31, se muestran en orden progresivo los estadios 1, 2 y 3 de desarrollo intestinal, describiendo las características de cada estadio.

En la Fig. 32 se observa dentro de los tratamientos de densidad de alimentación baja (tratamientos del 1 al 5) que el estadio 1 de desarrollo se presenta en alrededor del 40% de los individuos. Por otro lado, el porcentaje de individuos que se encuentra en estadio de desarrollo 2 es mayor al 50% en cuatro de los cinco tratamientos, llegando hasta un 70% en el tratamiento de agua de la bahía. Solamente los tratamientos 1, 2 y 3 de menores salinidades (15, 25 y 35 mg/L), muestran un mayor porcentaje de individuos que se encuentran en estadio 3 de mayor desarrollo del epitelio intestinal, en los cuales el porcentaje va del 20 al 30%.

Para los tratamientos con densidad de alimentación alta (Fig. 32), no se encontraron individuos en estadio de desarrollo I, todos estos tratamientos presentan un mayor porcentaje de organismos en estadio de desarrollo 3, de mayor desarrollo (estadio 3) y actividad digestiva, donde el tratamiento que presentó el mayor desarrollo fue el tratamiento 6 (15 mg/L) con un 64% de individuos.

V.4.2 Actividad digestiva.

En el caso de los tratamientos del 1 al 5 (Fig. 33) con densidad de alimentación baja, el 50% de las larvas presentaron el grado de actividad digestiva 1 (moderada), con un pico en el tratamiento 4 (45 mg/L), con más del 70% de larvas en este grado. La mayor actividad digestiva de grado 2 la presentó el tratamiento 3 (35 mg/L) con el 45% de las larvas.

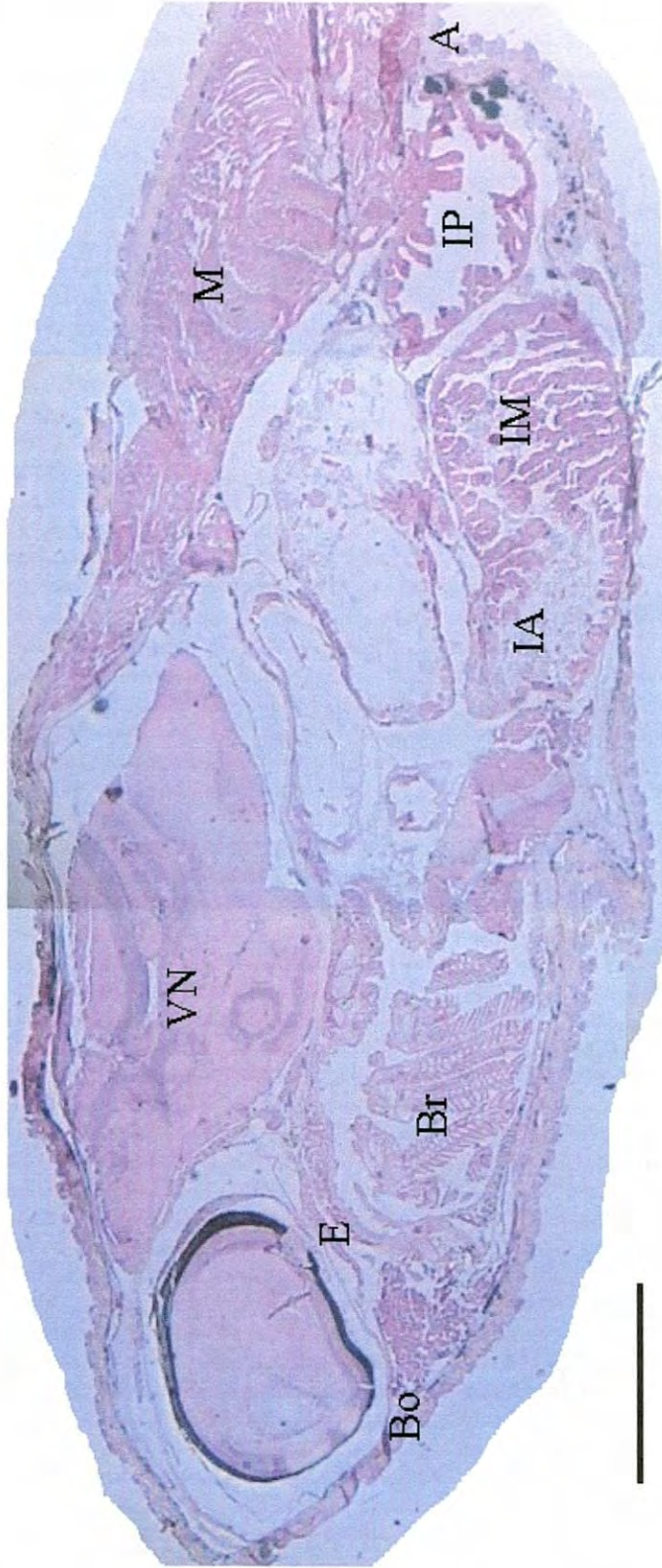
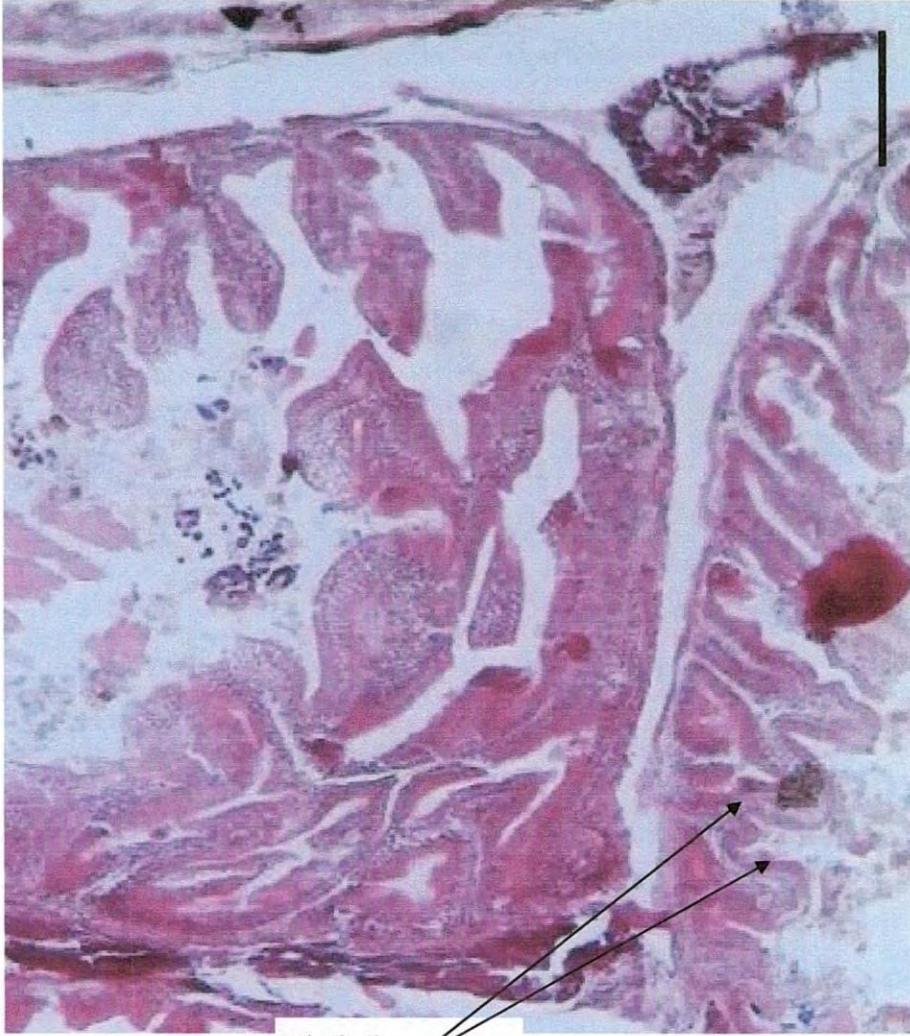


Figura 28.- Corte histológico sagital de *S. annulatus* donde se muestra el tracto digestivo 4x. Bo: boca, E: esófago, Br: branquias, VN: vejiga natatoria, IA: intestino anterior, IM: intestino medio, IP: intestino posterior. M: músculo. A: ano. Escala 0.5 mm.



Figura 29.- Estadío 1. Desarrollo inicial del sistema digestivo del botete, con una actividad digestiva en grado I (moderada). Tratamiento de 15 mg/L con densidad de alimentación baja. Escala 5 μm .



Diferencia en la coloración de las diferentes células del epitelio

Figura 30.- Estadio 2, Mayor ramificación entre los epitelios intestinales, ensanchamiento de las puntas más evidente, con mayor número de células de la mucosa, mostrando un grado de actividad 1 (moderada). Tratamiento de 15 mg/L con densidad de alimentación baja. Escala 5 μ m.

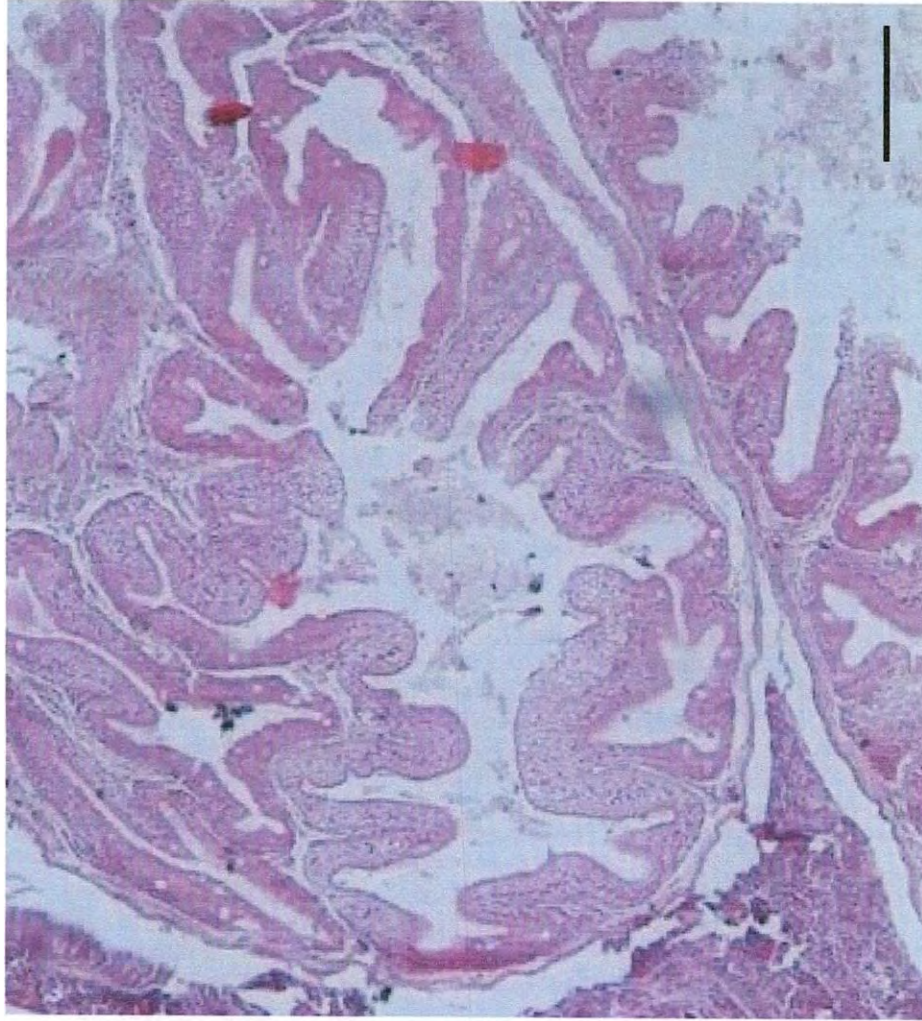


Figura 31.- Estadio 3. Epitelio intestinal con grado de actividad digestiva de 2 (prominente), por la abundancia y tamaño de las células de la mucosa. Tratamiento de 15 mg/L con densidad de alimentación alta. Escala 5 μ m.

RIS T1223

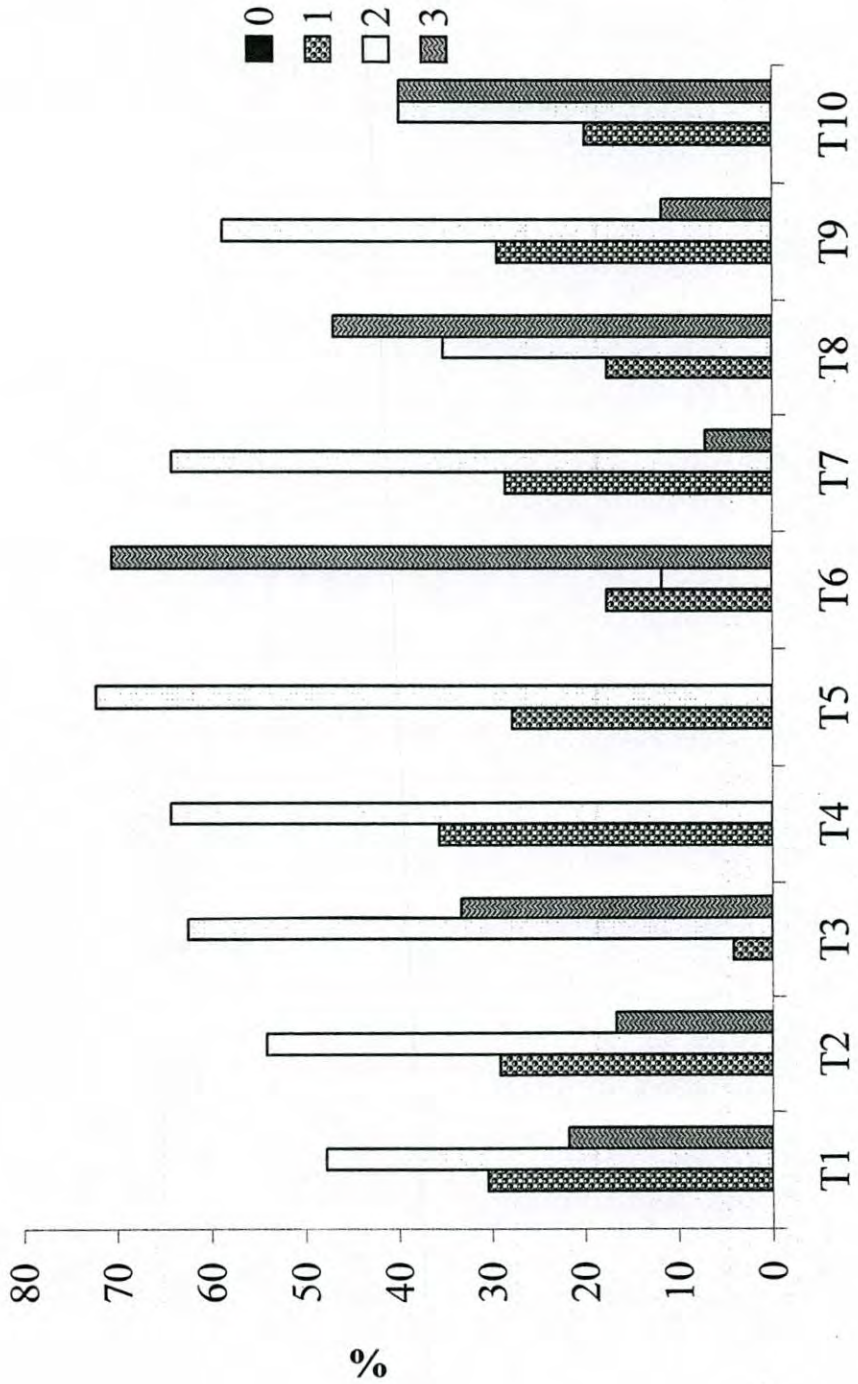


Figura 32.- Porcentaje de larvas de botete diana en cada estadio de desarrollo intestinal para todos los tratamientos. Se muestra los estadios de desarrollo del epitelio 0, 1, 2 y 3.

También en este caso al igual que en el desarrollo intestinal, el grado de actividad fue mayor para los tratamientos con densidades de alimentación alta del 6 al 10, teniendo que para el grado 1 (moderada) menos del 40% de las larvas se encuentran en esta condición. Se observó que la salinidad no afectó el grado de actividad digestiva, ya que tanto los tratamientos de salinidad con 15, 45 mg/L y agua de la bahía (40 mg/L), mostraron un grado de actividad 2 (prominente), con cerca del 50% de las larvas de estos tratamientos. El tratamiento de 15 mg/L es el que presentó el mayor grado de actividad digestiva de todos los tratamientos, con 53% de las larvas en grado de actividad 2.

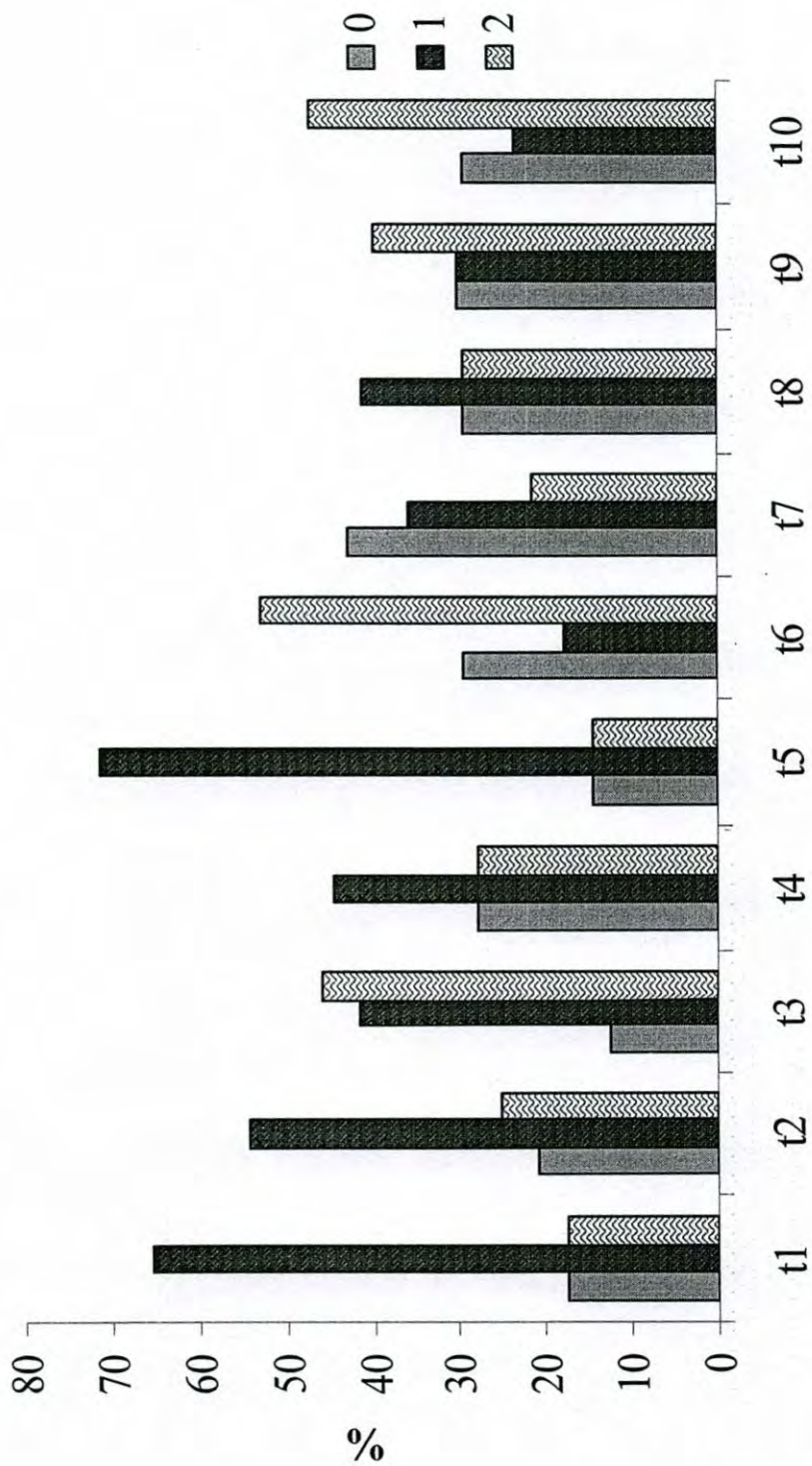


Figura 33.- Porcentaje de larvas de botete diana en cada grado de actividad digestiva para todos los tratamientos.

V.5. Punto de no retorno.

Se puede observar que la salinidad afectó el PNR de las larvas de botete en todos los tratamientos (Fig. 34). La mortalidad durante los primeros nueve días no sobrepasó el 20% en las diferentes salinidades, mientras que del día 10 en adelante se incrementó notoriamente la mortalidad en las salinidades de 25 y 45 mg/L y agua de la bahía.

La mortalidad en el PNR fue más baja para las salinidades de 15 mg/L y 35 mg/L, siendo a 15 mg/L donde la mortalidad alcanzó el 50% el día 16, mientras que a 35 mg/L las larvas murieron en un 100% al día 15 sin alimento. Esto indica que el PNR sucede más tardíamente a 15 y 35 mg/L y que aquellas larvas a 45 y 25 mg/L y en agua de la bahía soportaron menos tiempo sin alimento.

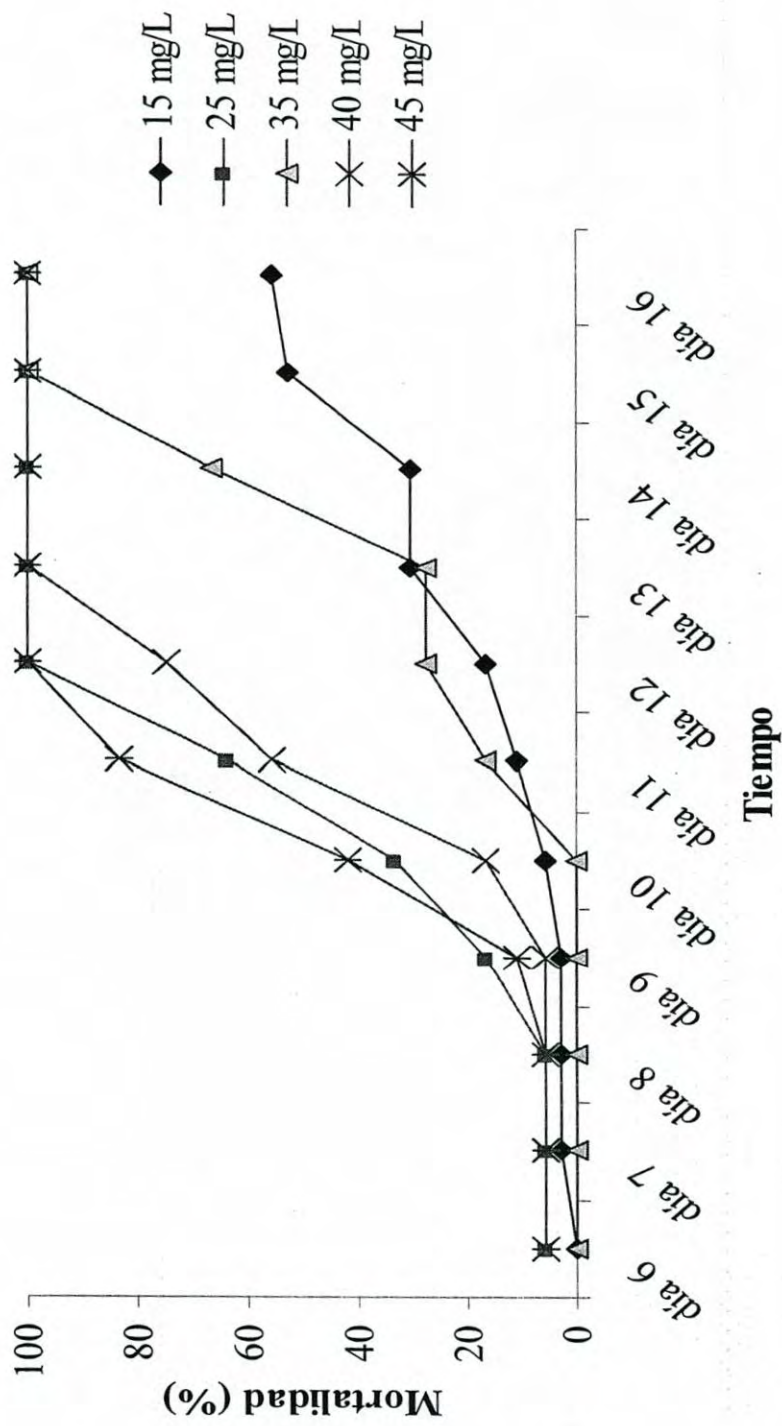


Figura 34.- Punto de no retorno PNR, mostrando los tratamientos por salinidades.

VI. DISCUSIONES.

Para especies eurihalinas, se ha reportado que para bluefish *Pomatomus saltatrix* (Buckel *et al.*, 1995) las salinidades 5 y 25 mg/L no presentan efecto significativo sobre el crecimiento y mortalidad. Para el caso del pez conejo *Promethichthys prometheus*, al comparar diferentes salinidades entre 10 y 50 mg/L no se encontraron diferencias significativas en crecimiento, mortalidad, así como en la capacidad osmorregulatoria (Saoud *et al.*, 2007). Sin embargo, el crecimiento óptimo del pez conejo fue a 35 mg/L. Al igual que lo mostrado en este estudio, la mortalidad no se vió afectada por los tratamientos de salinidad pero si de densidad de alimentación de *Artemia*.

Zhou (2006) observó que para el caso del botete oscuro *Takifugu obscurus*, al evaluar la mortalidad a las salinidades de 0 a 32 mg/L, no se observaron diferencias significativas de 0 a 8 mg/L con mortalidades menores al 10%, las cuales en general son mayores a las encontradas en este experimento. Por otro lado, en las salinidades mayores todas las larvas murieron hacia el día 24 de vida, esto debido a que *T. obscurus* vive en estuarios con salinidades más bajas. En el caso de *S. annulatus* en este estudio queda demostrado que se desarrolla más lentamente con una baja alimentación y que las salinidades no influyen en el desarrollo. Sin embargo, sí se observa un efecto combinado entre la salinidad mayor y la baja alimentación.

La temperatura es de los factores ambientales con mayor influencia en el crecimiento de peces (Kikuchi, 2006). Generalmente éstos crecen más al incrementar la temperatura hasta cierto nivel, pero decrece a temperaturas muy elevadas. En el caso del botete tigre *Takifugu rubripes* el crecimiento se incrementa a 25°C, y decrece considerablemente a 30° C. para este estudio, la temperatura fue un factor constante del experimento con el botete ya que esta se puede considerar que fue la adecuada para el desarrollo de los animales (25.7±0.67° C).

Además, Kikuchi (2006) menciona que el crecimiento en cuanto a salinidad es mucho mayor de 10 a 15 mg/L, con un límite mínimo de 5 mg/L para *T. rubripes*. El autor también menciona el efecto de la nutrición para *T. rubripes* y encuentra que al incrementarse el contenido de caseína en la dieta, el crecimiento aumenta aunque posteriormente decrece gradualmente. También se muestra que el crecimiento no se ve afectado por el porcentaje de lípidos, con un rango de 6 a 10%, mientras que al incrementar

el porcentaje de 12%, se reduce el crecimiento. *T. rubripes* al igual que los demás tetradóntidos no posee estómago, por lo que se cree que deben ser alimentados con pequeñas porciones de la dieta frecuentemente en el día.

Con respecto a la alimentación de las larvas, García-Ortega *et al.*, (2003) evaluaron diferentes tipos de alimento particulado para el destete en la etapa larvaria de *S. annulatus*. Los autores obtuvieron que el destete a los 29 DDE permite un buen crecimiento y una supervivencia de 49.3%, lo que reduce el tiempo de consumo de *Artemia*, por lo tanto los costos de producción se reducen. También mencionan que para *S. annulatus* una vez destetado la frecuencia de alimentación puede ser de 5 veces por día, para evitar el canibalismo entre las larvas. Sin embargo, al alimentar 8 veces por día, el canibalismo no fue eliminado, lo cual corresponde más con lo mencionado por Kikuchi (2006). En el presente trabajo se establece que el canibalismo entre las larvas fue despreciable con el protocolo de alimentación de ocho raciones diarias, las cuales se consideran suficientes en las larvas de botete después de 28 DDE, que fue la edad de los peces en este experimento.

Con respecto al sistema digestivo y de acuerdo con Kumai *et al.*, (1989) con el botete ocelado *Fugu rubripes*, en la morfología y anatomía microscópica solo se observa una expansión en el área ventral, que ocupa el espacio del estómago. También poseen epitelio del esófago y una expansión del saco epitelial, en donde la actividad de la pepsina del tracto digestivo del esófago hacia la apertura del intestino, se mantiene a muy bajos niveles. El saco expandido se forma como una expansión del intestino entre los esfínteres del intestino y el esófago. El lumen del saco expandido está recubierto por dos tipos de epitelio. Para el caso de *S. annulatus* de 35DDE, se observó que el sistema digestivo seguido de la boca, hay un esófago largo, sin estómago diferenciado, con tres cavidades intestinales (Fig. 28): intestino anterior, medio y posterior. En la presente investigación el intestino posterior se observó con poco desarrollo comparado con el intestino anterior y medio.

García-Ortega (2009) describió específicamente para *S. annulatus* el desarrollo ontogénico del tracto digestivo y la expresión de la actividad de las enzimas digestivas. Dado que es una especie carnívora, requiere de dietas de entre 40 y 50% de proteína, con mayores niveles para estadios larvarios. En el estudio histológico de la ontogenia del desarrollo del tracto digestivo el autor menciona que para los 24 DDE todos los órganos del sistema digestivo están desarrollados, con excepción del estómago, como en el resto de

los tetraodóntidos. En dicho trabajo como parte de la actividad digestiva de *S. annulatus* se encontró que la actividad de la tripsina inicia a los 2 DDE, sin embargo su acción se reduce a los 4 DDE, lo que indica que existen otras enzimas digestivas que juegan un papel más importante en la digestión del botete diana. No obstante para el presente trabajo no se sabe que pasó con las enzimas ya que están fuera del propósito del trabajo.

No obstante en este estudio se observó que después de los 28 DDE el desarrollo del epitelio intestinal es progresivo, de lo que se infiere una buena digestión y se vio que no es afectado significativamente por los tratamientos de salinidad. Sin embargo, el nivel de alimentación si es importante ya que se observó que en los tratamientos con densidad de alimentación alta, las larvas de botete se encontraban cerca de un 80% en estadio de desarrollo epitelial en estadio 3 a los 48 DDE.

Con respecto a los iones, Tarik *et al.*, (1995) reportaron para seis especies de peces del mar Arabigo, concentraciones de K^+ de 15-2754 mg/kg, Mg^{++} de 52-355 mg/kg, Na^+ de 85-294 mg/kg y Ca^{++} de 88-279 mg/kg, en general estos valores obtenidos por ellos son muchos menores a los reportados para las larvas de botete diana en este trabajo, además difiere el orden de abundancia. Ali y Fishar (2005) obtuvieron para estos iones en tilapia, lisa y lenguado, valores menores a 100 mg/kg. En este contexto no es posible comparar éstos valores ya que las condiciones aquí probadas fueron de diferentes salinidades, aunque se demuestra que la salinidad en conjunto con el alimento tienden a incrementar las concentraciones de dichos iones en los tejidos de los organismos.

Todas estas diferencias pueden estar dadas debido a que las larvas de botetes en desarrollo tienen un metabolismo más acelerado, lo que puede suponer que el proceso de osmorregulación también sea más acelerado, además de considerar la variación de la salinidad y densidad de alimentación. Para el calcio, la densidad de alimentación alta favorece su incremento en los peces, no obstante para las diferentes salinidades no se presentaron cambios. También para el magnesio y el sodio la variación no difirió en cuanto a densidad de alimentación, pero si en cuanto a salinidad ya que al incrementarse ésta, se incrementó la concentración de esos iones, mientras que el potasio no mostró diferencias en cuanto a salinidades ni densidades de alimentación.

Dentro de los análisis de estos iones en agua de mar, Abe y Watanabe (1992) encontraron que en el agua de mar, debido al proceso de osmorregulación, el orden de abundancia es de $Na^+ > Mg^{++} > Ca^{++} > K^+$, esto debido a la diversidad y abundancia de

especies en la superficie del mar. Por otro lado Lee *et al.* (2001) reportaron de su análisis de aguas más profundas, donde no hay tanta intervención de la respiración de los organismos, un orden de abundancia el cual cambia a $Mg^{++} > Na^+ > Ca^{++} > K^+$.

Baloun y Morse (1984) encontraron que las concentraciones de los iones libres en agua de mar como sodio es de 425.2 mg/kg, potasio 9 mg/kg, calcio 9.27 mg/kg y finalmente magnesio 48.44 mg/kg. Los valores de los iones Na^+ y K^+ , son semejantes para los reportados en este estudio, sin embargo las concentraciones para la salinidad de 35 mg/L son relativamente mayores a lo reportado por Baloun y Morse (1984), dada la diferencia entre el agua analizada en este trabajo al final del experimento de agua estática bajo condiciones de laboratorio, con el agua de mar, la cual se encuentra en constante movimiento y no es manipulada por la mano humana.

En el análisis de las muestras de agua al final del presente experimento, no existe variación significativa entre tratamientos de densidad de alimentación para cloruros y sulfuros, no obstante para potasio la densidad de alimentación baja es significativamente mayor la concentración con respecto a la densidad de alimentación alta. Comparando estos resultados con lo reportado para el medio marino, se encontró que en a 35 mg/L con agua de pozo, presentaron las mayores concentraciones de los iones sodio y potasio con 744.81 mg/kg y 20.44 mg/kg respectivamente y 19143.97mg/kg de cloruros y únicamente los sulfuros no presentaron un pico a esta salinidad; sino que la concentración se incrementó al incrementarse la salinidad, teniendo 2809.72 mg/kg a 45 mg/L de salinidad.

El estudio de la osmorregulación se basa en los cambios en la actividad de la $Na^+-K^+-ATPasa$, así como el número y tamaño de las células de cloro en las branquias de los peces. Existen estudios sobre el cambio en estos componentes de las branquias para el caso de tilapia *Oreochromis niloticus*, donde se evaluó el efecto del cambio de salinidad, con la transferencia de las tilapias de agua dulce a agua de mar. Se observó que las mortalidades se presentan cuando las tilapias son cambiadas directamente del agua dulce al agua de mar, decreciendo dramáticamente el número de las células de cloro, pero aumentando en tamaño. Sin embargo el cambio es gradual, las células de cloro incrementan su tamaño y la actividad de la $Na^+-K^+-ATPasa$, se ve disminuida (Güner *et al.*, 2005).

En especies estenohalinas como lubina negra *Centropristis striata* se ha observado que al reducir la salinidad a 10 mg/L el crecimiento es significativamente menor que el óptimo de 30 mg/L (Cotton *et al.*, 2003), mientras que la brema negra *Acanthopagrus*

butcheri entre las salinidades de 0 a 60 mg/L no muestra diferencias significativas en mortalidad, muestra un mayor crecimiento y más eficiente factor de conversión alimenticia a 24 mg/L (Gavin *et al.*, 2002).

Existen numerosos factores que pueden provocar diferentes tipos de malformaciones en las larvas de peces. Fahy (1981) evaluó el efecto de la temperatura sobre el cambio de número de radios de la aleta dorsal de killifish *Fundulus majalis*, que al aumentar la temperatura del cultivo en cuatro grados, tienen una respuesta directa sobre los radios de las aletas dorsales, no así en las aletas anales ni la aleta caudal. Esto probablemente debido al origen de la aleta dorsal, la cual deriva de las vértebras. Así que como en las vértebras, los radios de las aletas se ven afectados tanto por las bajas temperaturas como por aguas más cálidas.

La dominancia de lordosis por encima de los otros tipos de deformidades observada en este trabajo concuerda con la mayoría de los autores, como es el caso de Sfakianakis *et al.* (2006). Los organismos testigo del presente trabajo presentaron deformidades, pues ya contaban con 28 DDE, lo que concuerda con lo mencionado por Sfakianakis *et al.* (2006). Deformidades de la columna en el desarrollo larvario de barramundi *Lates calcifer* se dan desde el 2 al 38 DDE, pues el proceso de osificación es completo después de los 14 DDE, pudiendo presentarse lordosis, escoliosis y cifosis a partir del día 20 DDE. De esta manera en barramundi se tiene un porcentaje de deformidades del 7.7% al día 38 DDE. Fraser *et al.* (2004) evaluaron diferentes niveles de HUFA's y PUFA's en la dieta, lo que comprueba que en el ambiente y diferentes factores, todas las especies de peces analizadas son más susceptibles a sufrir lordosis, sin quedar inmunes a otras deformidades o la combinación de éstas. Aunque en este estudio no se analizaron los HUFA's y PUFA's, al tener menor densidad de alimentación en conjunto con una alta salinidad las deformidades aumentaron hasta un 0.05%.

Para whitefish *Coregonus lavaretus* Dabrowski (1976) encontró que el PNR es después de 15 días de inanición, a 13.5° C. Mientras que para el pez gato europeo *Silurus glanis*, Kujawa *et al.* (2008) encontraron un PNR₅₀ en el agua a temperaturas de 15, 20 y 25°C de 11.0, 9.2 y 4.4 días después de la suspensión del alimento. Lo cual coincide con lo reportado en este trabajo donde se tuvo que con excepción de la salinidad de 15 mg/L los organismos tuvieron un PNR₁₀₀ a los 15 días de inanición.

VII.- CONCLUSIONES.

Bajo las condiciones experimentales del presente trabajo, se observó que al incrementar la salinidad hasta 45 mg/L, en conjunto con la baja densidad de alimentación de *Artemia*, provoca serios efectos en las larvas de *Sphoeroides annulatus*, como son un bajo crecimiento y peso, menor resistencia a la inanición, además de hacer a las larvas más susceptibles de presentar deformidades de la columna, tanto en número de individuos afectados, así como en número de deformidades que pueden presentarse. Por el contrario, al bajar la salinidad a 15 mg/L, proporcionando una mayor densidad de alimentación de *Artemia*, el crecimiento y peso de larvas de botete diana se ve favorecido, así como su resistencia a la inanición, además de reducir el riesgo de enfermedades de la columna. Sin embargo, al comparar las diferentes variables entre el agua de pozo (35 mg/L) y el agua de la bahía (40 mg/L) no existen diferencias significativas en condiciones de laboratorio.

Para mejorar el desarrollo de esta especie, tanto en el desarrollo larvario como la posterior engorda, tener una excelente alimentación de las larvas es fundamental, con una alimentación para esta etapa del desarrollo de mínimo 10 larvas de *Artemia*/ml, además de la alimentación artificial. Por otro lado, dando por entendido que las larvas en el cultivo normal pueden presentar deformidades que afectan la salud de las larvas, así como su desarrollo, crecimiento y apariencia de venta, se recomienda para la etapa de 20 a 50 DDE reducir los niveles de salinidad del cultivo larvario a 15 mg/L lo que puede garantizar el buen estado de salud de los organismos, pudiendo reducir el riesgo de enfermedades en su totalidad.

VIII.- RECOMENDACIONES.

Para tener un mejor conocimiento del efecto de los iones en cada tratamiento de salinidad y densidad de alimentación, es necesario llevar a cabo estudios del efecto de los iones evaluando directamente en las branquias de los peces, específicamente en el tamaño y número de las células de cloro, así como el efecto de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$.

También es necesario para consolidar los factores que determinan la presencia o ausencia de enfermedades de la columna vertebral en peces, añadir análisis de los genes que pueden presentar presuposición a las malformaciones, permitiendo observar si existen patrones hereditarios, aunado a los factores ambientales y de cada individuo.

Además es necesario para mejorar el desarrollo larvario de *S. annulatus* en la etapa de 20 a 50 DDE reducir los niveles de salinidad del cultivo larvario, para garantizar el buen estado de salud de los organismos, pudiendo reducir el riesgo de enfermedades en su totalidad.

IX. LITERATURA CITADA.

- Abe, K. y Y. Watanabe. 1992. Determination of silicate by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Journal of Oceanography*. 48: 288-292.
- Ali, M. y M. Fishar. 2005. Accumulation of trace metals in some benthic invertebrate y fish species relevant to their concentration in water y sediment of lake qarun, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 31: 289-301.
- Baloun, A. y D. Morse. 1984. Ionic control of settlement y metamorphosis in larval *Haliotis rufescens* (Gastropoda). *Biology Bulletin*. 167: 124-138.
- Buckel, J., N. Steinberg y D. Conover. 1995. Effects of temperature, salinity, y fish size on growth y consumption of juvenile bluefish. *Journal of Fish Biology*. 47: 696-706 .
- Cahu, C., J. Z. Infante y T. Takeuchi. 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227: 254-258.
- Chávez-Sánchez, M., L. Álvarez-Lajonchère, M. 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.
- Cotton, C., R. Walker y T. Recicar. 2003. Effects of temperature y salinity on growth of juvenile black sea bass, with implications for aquaculture. *North American Journal of Aquaculture*. 65: 330-338.
- Dabrowski, K. 1976. How to calculate the optimal density of food for fish larvae. *Environmental Biology of Fish*. 1: 87-89.
- Dabrowski, K. 1982. Proteolytic enzyme activity decline in starving fish alevins and larvae. *Environmental Biology of Fish*. 7: 73-76.
- Darias, M., H. Murray, J. Gallart, S. Douglas, M. Yúfera y G. Martínez-Rodríguez. 2007. The spatiotemporal expression pattern of trypsinogen y bile salt-activated lipase during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*, Pisces, Sparidae). *Marine Biology* 152: 109 -118.
- Dethlefsen, V. 1975. Combined effects of cadmium and salinity on development and survival of garpike eggs. *Helgolander Meeresunters*. 27: 268-271
- Fahy, W. 1981. the influence or temperatura change on number of dorsal fin rays developing in *Fundulus majalis* (Walbaum). *Rapports et Procés-Verbaux Des Réunions, Conseil International Pour L'Exploration de la Mer Palageade, Copenhagen K Danemark*. 178: 56.
- FAO Year Book. 2004. Fisheries Statistics, Aquaculture Production 86/2, FAO, Rome, Italy. <http://www.fao.org.mx/>

- Fischer, W., F. Krupp; W. Schneider; C. Sommer; K. Carpenter y V. Niem. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de pesca. Pacífico Centro-Oriental. Vol III. Vertebrados—parte 2. Roma. 1201-1813.
- Fraser, M., T. Yerson y R. De Nys. 2004. Ontogenic develop of the spine and spinal deformities in larval barramundi (*Lates calcifer*) culture. *Aquaculture*. 242: 679-711.
- Gavin, J., P. Greg y I. Jenkins. 2002. The effect on growth and survival of juvenile black bram (*Acanthopagrus butcheri*). *Aquaculture*. 210: 219-230 .
- García-Ortega, A., I. Abdo-de la Parra y C. Hernández. 2003. Weaning of bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*) from live food to microparticulate diets made with decapsulated cysts of *Artemia* and fishmeal. *Aquaculture International*. 11: 183-194
- García-Ortega, A. 2009. nutrition and feeding research in the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) y bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), new species for marine aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry*. 35: 69-80 .
- Granvil, T. 2000. *Artemia* production for marine larval fish culture. Southern Regional Aquaculture Center. 702: 89-91.
- Güner, Y., O. Özden, H. Cagirgan, M. Atunok y V. Kizak. 2005. Effects of salinity on the osmoregulatory functions of the gills in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Turk J. Veterinary Animal Science*. 29: 1259-1266.
- Humason, G.L. 1972. *Animal Tissues Techniques* W.H. Freeman and Co., San Francisco. 640 p.
- Jana. S. y C. Webster. 2003. *Sustaintable Aquaculture Global Perspectives*. The Haworth press. 116 p.
- Kikuchi, K. 2006. Present status of research and production of tiger puffer *Takifugu rubripes* in Japan. VIII Simposium de Nutrición Acuicola, Nuevo León, México. 20-26.
- Kujawa, R., R. Wiśniewski, A. Mamcarz y D. Kucharczyk. 2008. Determination of European Catfish (*Silurus Glanis* L.) larvae resistance to temporary lack of food under controlled conditions. *Polish Journal of Natural Science*. 8: 866-880.
- Kumai, H., I. Kimura, M. Nakamura, K. Takii y H. Ishida. 1989. Studies on digestive system and assimilation of flavored diet in ocellate buffer. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 55: 1035-1043.
- Lagler, K., J. Bardach, R. Miller y D. May-Passino. 1984. *Ictiología*. AGT editor, S.A. México DF. 489 p.

- Lee, K., M. Ohshima y S. Motomizu. 2001. Determination of trace elements in seawater by air-flow injection /ICP-MS with chelatin resin preconcentration. *Analytical Science*. 17: 121-124.
- Murdoch, G. y D. Scotly. 1958. Scoliosis in twins. *The Journal of the Bone and Joint Surgery*. 41: 736-737.
- Pascale, M. 2001. *Cifosis and Lordosis*. PubliCE Styard. Pid: 56 p.
- Potthoff, T. 1984. Clearing y staining techniques. P: 35-37. In *Ontogeny and Systematics of Fishes* (based on a international symposium dedicated to the memory of Elbert Halvor Ahlstrom). H. Moser, W. Richards, D. Cohen, M. Fahay, A. Kendall, Jr. Y S. L. Richardson, eds. (Special Publication 1, American Society of Ichthyologist and Herpetologist. Allen Press). Lawrence, KS.
- Royo-Salvador, M.B. 1996. Siringomielia, escoliosis y malformación de Arnold-Chiari idiopáticas. *Etiología común. Revolution of Neurology (Barc)*. 24: 937-959.
- Sfakianakis, D., E. Georgakopoulou, I. Papadakis, P. Divanach, M. Kentouri y G. Koumoundouros. 2006. Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*. 254: 54-64.
- Santoja, F. y A. Pastor. 2000. Procedimientos ortopédicos y de traumatología. Capítulo 117. P: 783-792. cirugía menor y procedimientos en medicina de familia. J. Arribas-Blanco. Segunda edición. Madrid España.
- Saoud, I., S. Kreydiyyeh, A. Chalfoun y M. Fakih. 2007. Influence of salinity on survival, growth, plasma osmolality y gill $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase activity in the rabbitfish *Siganus rivulatus*. *Journal of Experimental Marine Biology*. 348: 183-190.
- Shoji, J., y M. Tanaka. 2003. Larval abundance, growth, and recruitment of Japanese Spanish mackerel *Scomberomorus niphonius* in the Seto Inly Sea, Japan. *The Big Fish Bang*. 1: 395-404.
- Tansel-Sireli, U., M. Göcükoglu, A. Yildirim, A. Göcükoglu y O. Cakmak. 2006. Assessment of heavy metal (cadmium and lead) in vacuum packaged smoked fish species (Mackerel. *Salmo salar* and *Oncorhynchus mykiss*) marketed in Ankara (Turkey). *Jurnal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 23: 353-356.
- Tariq, J., M Jaffar y M. Ashraf. 1995. Selected trace metal and macronutrient contents of six fish species from the Arabian Sea, Pakistan. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 50: 207-212.
- Zhou, Y. y C. Yafen. 2006. Salinity tolerance of larvae of darck puffer *Takifugu obscurus*. *Aquaculture*. 253: 393-397.
- Zohar, Y. y C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*. 197: 99-136.

X. APÉNDICE.

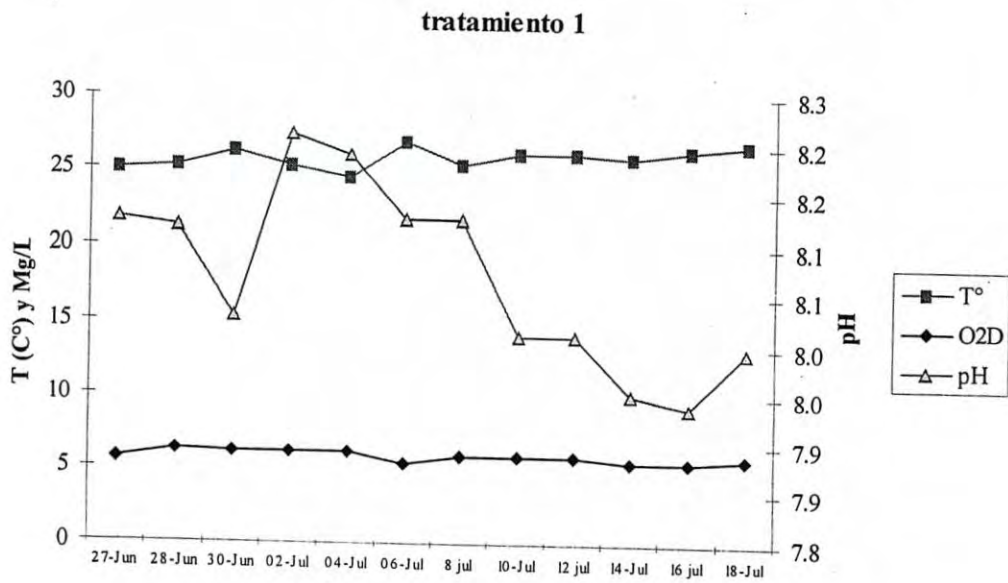
Apéndice 1.- Protocolo de deshidratación para muestras de histología.

horas	Solución	Etanol del 95% (ml)	Butanol (ml)	Agua destilada (ml)
1	70 % Etanol	700	-----	250
1	70% Etanol	700	-----	250
3	70% Etanol+Butanol	500	200	300
	83% Etanol			
3	+Butanol	500	330	170
	95% Etanol +			
1.5	Butanol	450	550	-----
	95% Butanol +			
1.5	Etanol	450	550	-----
	100% Butanol +			
1	Etanol	250	750	-----
	100% Butanol +			
1	Etanol	250	750	-----
2	100% Butanol	-----	1000	-----
1	100% Parafina	-----	1000	-----

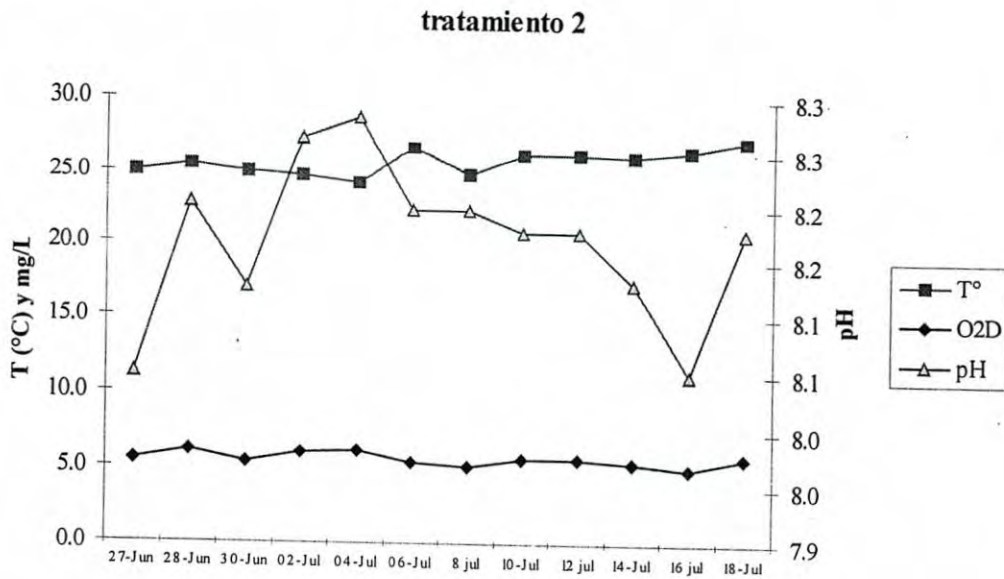
Apéndice 2. Proceso de tinción hematoxilina-eosina, para tejidos.

Caja	Reactivo	Tiempo de inmersión
1	xileno I	5 minutos
2	xileno II	5 minutos
3	xileno III	5 minutos
4	alcohol absoluto xileno alcohol absoluto	5 minutos
5	xileno	5 minutos
6	alcohol 96%	5 minutos
7	alcohol 96%	5 minutos
8	alcohol 70%	5 minutos
9	alcohol 70%	5 minutos
10	agua destilada	5 minutos
11	agua destilada	5 minutos
12	Hematoxilina	1-8 minutos
13	agua de la llave	enjuagar
14	alcohol ácido	enjuagar
15	agua destilada	enjuagar
16	agua amoniacal	enjuagar
17	agua de la llave	enjuagar
18	agua destilada	enjuagar
19	Eosina	1 – 3 minutos
20	alcohol absoluto alcohol absoluto +	rápido
21	xileno	3 minutos
22	xileno I	5 minutos
23	xileno II	5 minutos
24	xileno III	5 minutos
	montar en resina	dejar secar

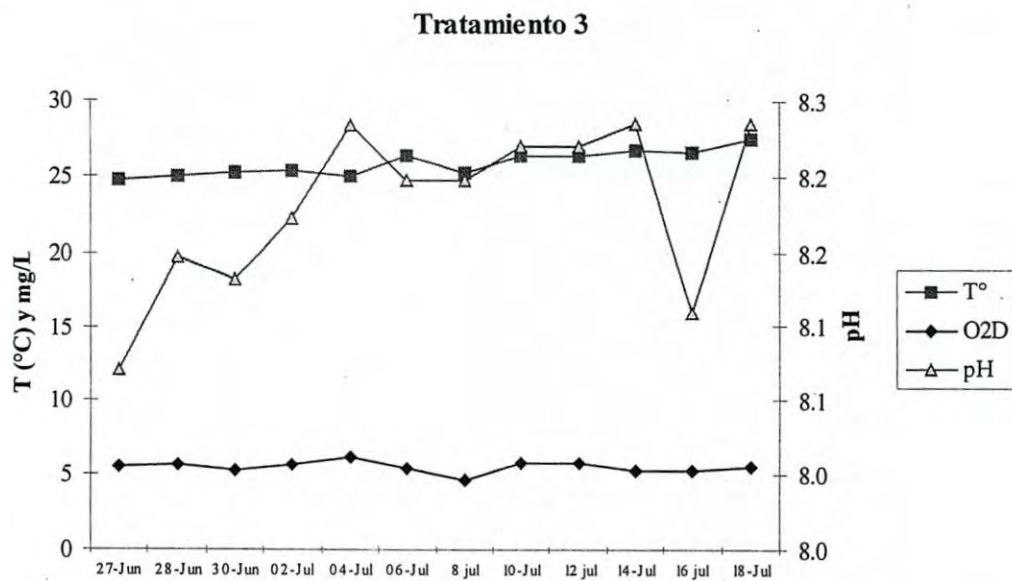
Apéndice 3.- Temperatura, pH y oxígeno disuelto a lo largo del experimental, desde el 17 de junio al 18 de julio, para el tratamiento 1.



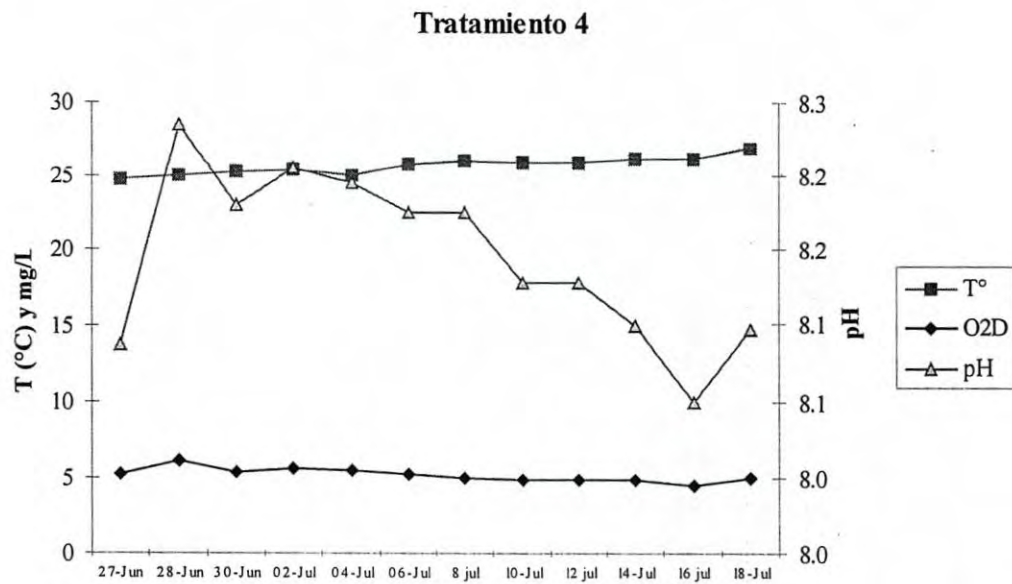
Apéndice 4.- Temperatura, pH y oxígeno disuelto a lo largo del experimental, desde el 17 de junio al 18 de julio, para el tratamiento 2.



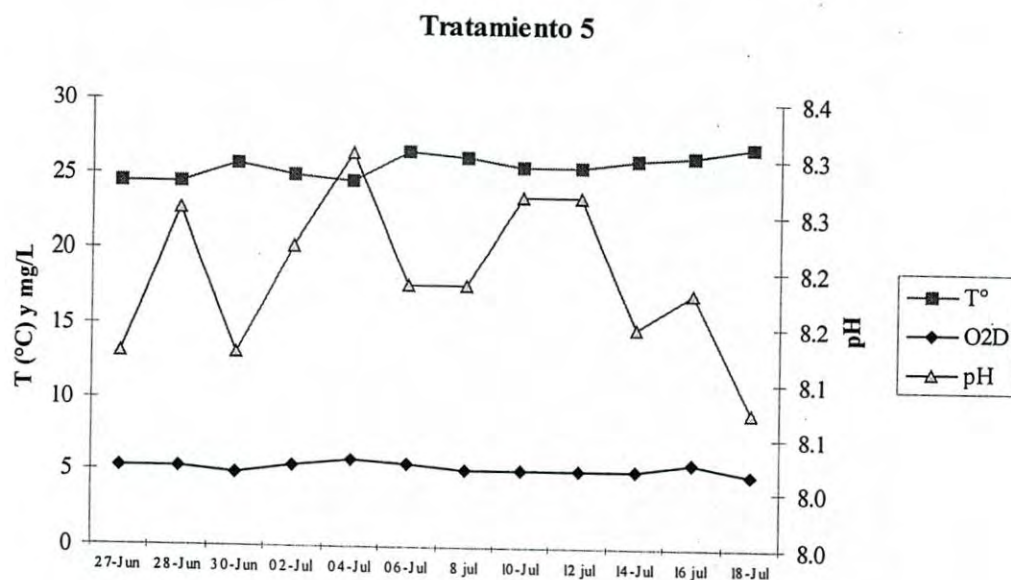
Apéndice 5.- Temperatura, pH y oxígeno disuelto a lo largo del experimental, desde el 17 de junio al 18 de julio, para el tratamiento 3.



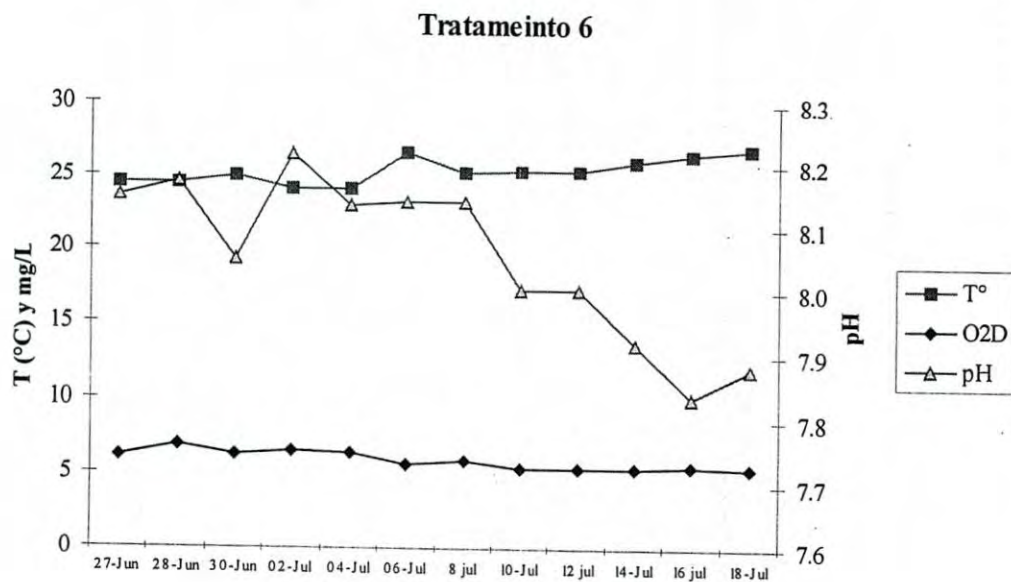
Apéndice 6.- Temperatura, pH y oxígeno disuelto a lo largo del experimental, desde el 17 de junio al 18 de julio, para el tratamiento 4.



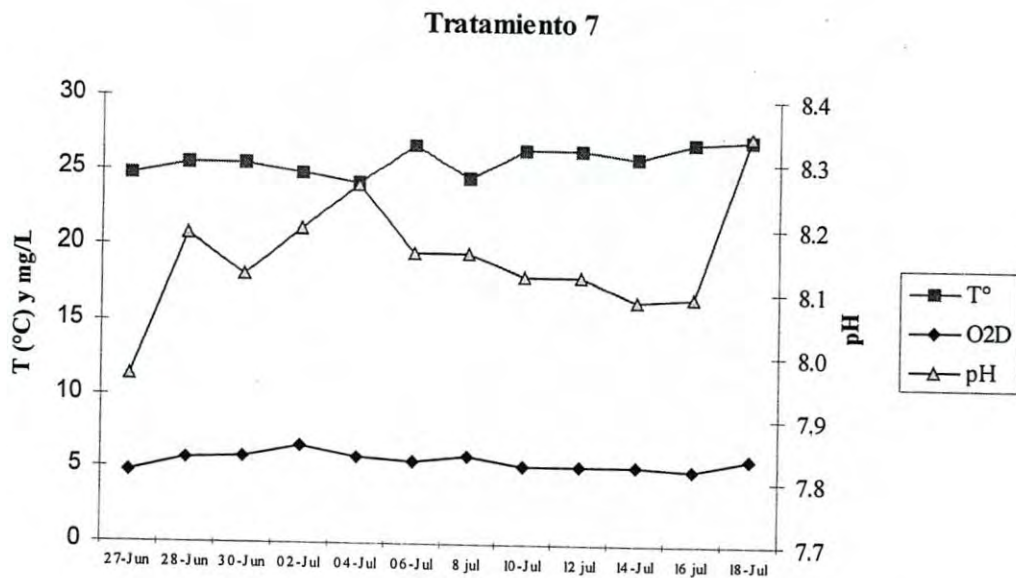
Apéndice 7.- Temperatura, pH y oxígeno disuelto a lo largo del experimental, desde el 17 de junio al 18 de julio, para el tratamiento 5.



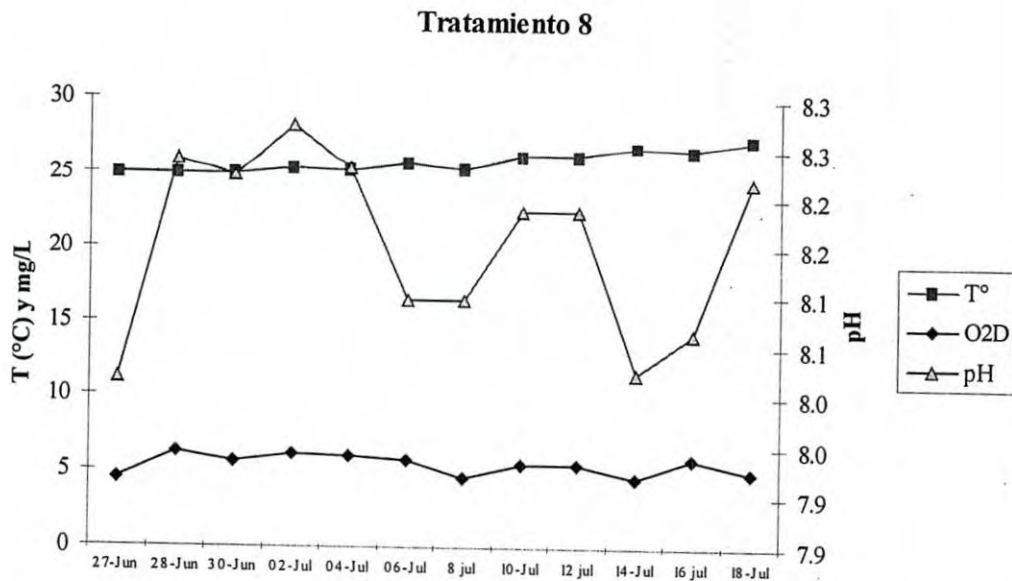
Apéndice 8.- T°, pH y oxígeno disuelto a lo largo del experimental, desde el 17 de junio al 18 de julio, para el tratamiento 6.



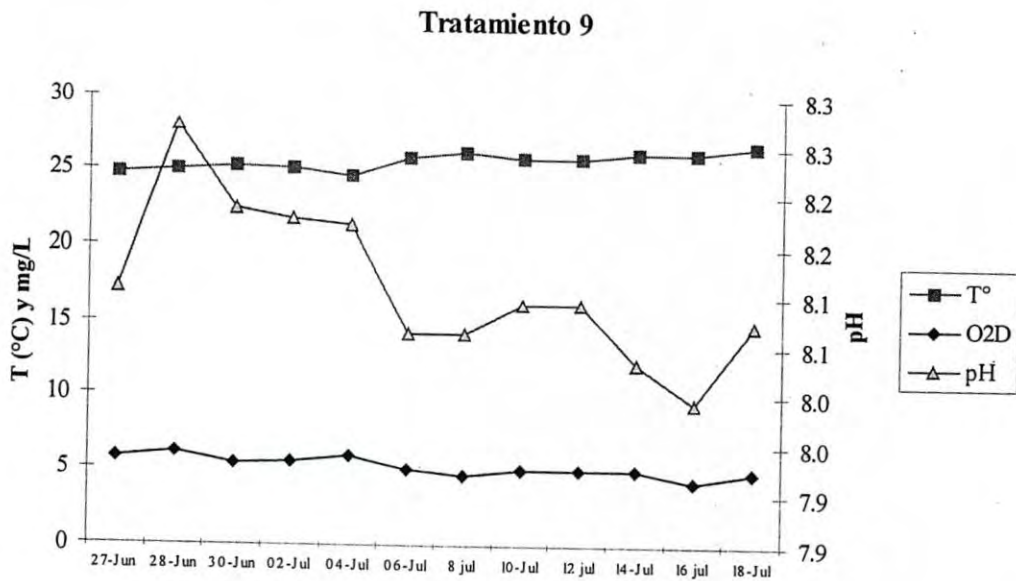
Apéndice 9.- Temperatura, pH y oxígeno disuelto a lo largo del experimental, desde el 17 de junio al 18 de julio, para el tratamiento 7.



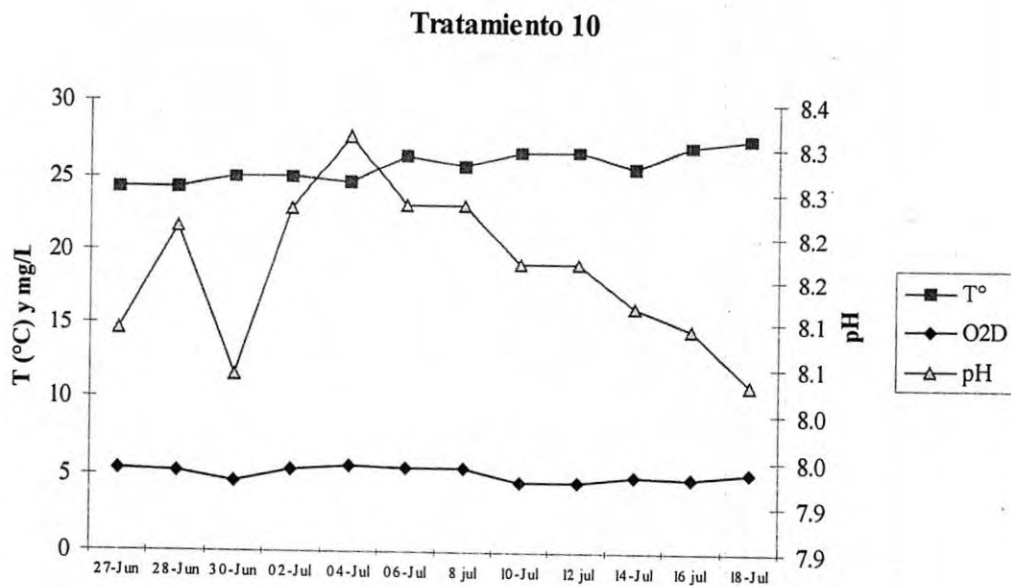
Apéndice 10.- Temperatura, pH y oxígeno disuelto a lo largo del experimental, desde el 17 de junio al 18 de julio, para el tratamiento 8.



Apéndice 11.- Temperatura, pH y oxígeno disuelto a lo largo del experimental, desde el 17 de junio al 18 de julio, para el tratamiento 9.



Apéndice 12.- Temperatura, pH y oxígeno disuelto a lo largo del experimental, desde el 17 de junio al 18 de julio, para el tratamiento 10.



Apéndice 14. Porcentaje de mortalidad acumulada para cada tratamiento de salinidad y densidad de alimentación, donde a la derecha de cada tratamiento se muestra la mortalidad de su réplica testigo sin perturbación, especialmente para observar la mortalidad natural. Para todos los tratamientos, la mortalidad se ve más afectada por los muestreos que por las variaciones en salinidad y densidad de alimentación.

Fecha	Trat 1		Trat 2		Trat 3		Trat 4		Trat 5		Trat 6		Trat 7		Trat 8		Trat 9		Trat 10	
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
inicial	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29-sep	2	0	1	0	2.7	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0.7	0	0	1.3	0
30-sep	3.3	0	1	0	3.3	0	1.3	0	1.3	0	0	0	0.7	0	0.7	0	0	1.3	0	
01-oct	3.3	0	1	0	4	0	2.7	0	1.3	0	0	0	1.3	0	2	3.3	0	1.3	0	
02-oct	3.3	0	1	0	4	0	2.7	0	1.3	0	0.7	0	1.3	0	2.7	3.3	0	1.3	0	
03-oct	3.3	0	1	0	4	0	4	0	1.3	0	0.7	0	1.3	0	2.7	3.3	0	1.3	0	
04-oct	3.3	0	1	2	4	0	4	0	1.3	0	1.3	0	1.3	0	2.7	3.3	0	2	0	
05-oct	4	0	1	2	4.7	0	4	0	1.3	2	1.3	0	1.3	0	2.7	3.3	0	2	2	
06-oct	4	0	1	2	4.7	0	4	0	1.3	2	1.3	0	1.3	0	2.7	3.3	0	2	2	
07-oct	4	0	1	2	4.7	0	4	0	1.3	62	1.3	0	1.3	0	2.7	3.3	0	2	2	
08-oct	4	0	1	2	27	0	4	0	13	62	2	0	1.3	0	2.7	4	0	2	2	
09-oct	4	0	1	2	27	0	4	0	13	70	2	0	2	0	2.7	4.7	0	2	2	
10-oct	4	0	1	2	27	0	4	0	13	72	2	0	2.7	0	6	4.7	0	2	2	
11-oct	4	0	1	2	27	0	4	0	13	72	2	0	2.7	0	6	4.7	0	2	2	
12-oct	4	0	1	2	27	0	4	0	13	72	2	0	2.7	0	6	4.7	0	2	2	
13-oct	4	0	1	2	27	0	4	0	13	72	2	0	2.7	0	6	4.7	0	2	2	
14-oct	4	0	1	2	27	0	4	0	13	72	2	0	2.7	0	6	5.3	0	2	2	
15-oct	4	0	1	2	27	0	4	0	13	72	2.7	0	2.7	0	6	5.3	0	2	2	
16-oct	4	0	1	2	27	0	4	0	13	72	2.7	0	3.3	0	6	5.3	0	2	2	
17-oct	4	0	1	2	27	0	4	0	14	72	2.7	0	3.3	0	6	5.3	0	2	2	
Final	4	0	1	2	27	0	4	0	14	72	2.7	0	3	0	6	5.3	0	2	2	

Apéndice 15. Porcentaje de cada tipo de deformidad y el punto de la columna donde se presentó la deformidad.

	lordosis			escoliosis			cifosis			lordosis+escoliosis		
	anterior	medio	final	anterior	medio	final	anterior	medio	final	anterior	media	final
test	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
t1	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
t2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
t3	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
t4	0.000	0.005	0.030	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010
t5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
t6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
t7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
t8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000
t9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000
t10	0.000	0.005	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Apéndice 16. Porcentaje acumulado para cada tipo de deformidad, así como la sumatoria del porcentaje de deformidades en cada uno de los tratamientos.

	lordosis	scoliosis	cifosis	lordosis+escoliosis	Total de deformidades
test	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001
t1	0.010	0.000	0.000	0.000	0.010
t2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
t3	0.015	0.000	0.000	0.000	0.015
t4	0.035	0.005	0.000	0.010	0.050
t5	0.000	0.005	0.000	0.000	0.005
t6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
t7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
t8	0.000	0.000	0.005	0.000	0.005
t9	0.000	0.000	0.005	0.000	0.005
t10	0.005	0.005	0.000	0.000	0.010