

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN ACUICULTURA**



**“INFLUENCIA DE LA DENSIDAD DE CULTIVO SOBRE EL
ESTRÉS EN JUVENILES DE *Oreochromis niloticus* CULTIVADOS EN
SISTEMAS CON TECNOLOGÍA *Biofloc*”**

Presentada por:

RONALD ALBERTO AQUINO ORTEGA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGÍSTER SCIENTIAE EN ACUICULTURA**

Lima - Perú

2019

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis está dedicado en su totalidad a mi familia. Siempre están preocupados de mis avances desde que llegué a este mundo y estoy seguro que el grado alcanzado les hará sentir muy felices y orgullosos. Esta dedicatoria es una oportunidad genial para decirles que los amo muchísimo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marcos Tavares-Dias, investigador en la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (Embrapa) y docente en la Universidad Federal de Amapá (UNIFAP) por el enorme gesto de enviarme desde Brasil, dos libros de su autoría, fundamentales para el desarrollo del presente trabajo.

A mi asesor, Dr. Julio Gonzales Fernandez por su apoyo constante materializado en consejos y recomendaciones en el desarrollo de éste trabajo.

A Marco de la Cruz, por haberme apoyado con la enseñanza, en teoría y práctica, de muchas temáticas referidas a la Acuicultura. Asimismo, a Wilfer Quispe por su pronta ayuda en momentos de apuro. A ellos mi más grande agradecimiento.

A los profesores de la Maestría, por compartir conocimientos, enseñanzas, experiencias y amistad, en especial a la profesora Beatriz Ángeles, por tener, además, una inmensa paciencia en su condición de coordinadora del programa de maestría.

Finalmente, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Concytec) por el apoyo económico recibido como participante del Proyecto de la Maestría en Acuicultura (Convenio de Gestión N°017-2013-FONDECYT).

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE ANEXOS	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. La tilapia del Nilo.....	3
2.1.1. Ubicación taxonómica y distribución geográfica.....	3
2.1.2. Características biológicas de la especie.....	3
2.1.3. Cultivo.....	5
a. Requerimientos de calidad de agua.....	5
b. Requerimientos nutricionales.....	8
2.2. Los sistemas con tecnología biofloc.....	10
2.2.1. Generalidades del sistema biofloc (SBF).....	10
2.2.2. Relación carbono – nitrógeno.....	11
2.2.3. Estructura y dinámica del biofloc.....	11
2.3. Crecimiento, densidad de cultivo y estrés.....	13
2.4. El estrés en peces.....	16
2.4.1. Eje hipotálamo – simpático – células cromafines.....	19
2.4.2. Eje hipotálamo – hipófisis – células interrenales (HHI).....	21
2.5. Parámetros bioquímicos.....	23
2.6. Parámetros hematológicos.....	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1. Etapa pre-experimental.....	28
3.1.1. Acondicionamiento de los tanques con sistemas biofloc (SBF).....	28
3.1.2. Aclimatación de peces al SBF.....	29

3.2. Etapa experimental	30
3.2.1. Lugar de ejecución y animales de experimentación.....	30
3.2.2. Diseño experimental.....	30
3.2.3. Manejo de la alimentación	31
3.2.4. Calidad y monitoreo de la calidad del agua en los SBF	31
3.2.5. Evaluación del estrés en los juveniles de <i>Oreochromis niloticus</i>	33
a. Obtención de muestras sanguíneas.....	33
b. Determinación de parámetros bioquímicos.....	35
b.1. Determinación de cortisol	35
b.2. Determinación de glucosa.....	36
c. Determinación de los parámetros hematológicos.....	36
d. Evaluación de los parámetros productivos.....	39
3.2.6. Procesamiento y análisis de datos	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1. Determinación de parámetros de calidad de agua en el sistema biofloc (SBF)	41
4.2. Determinación de parámetros bioquímicos.....	50
4.2.1. Determinación de cortisol	50
4.2.2. Determinación de glucosa	53
4.3. Determinación de parámetros hematológicos	55
4.4. Evaluación de los parámetros productivos	61
V. CONCLUSIONES.....	65
VI. RECOMENDACIONES	66
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	67
VIII. ANEXOS.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Producción de tilapia en el Perú (en TM), desde el año 2003 hasta el 2016. ...	5
Figura 2: Respuestas asociadas a un cuadro de estrés en peces.	19
Figura 3: Diagrama general de los principales elementos neuroendocrinos en la respuesta al estrés en peces. (→): Efecto estimulante. (←): Efecto inhibitor.	20
Figura 4: Extracción de sangre de la vena caudal	34
Figura 5: Tubo capilar centrifugado, mostrando la separación de plasma, leucocitos y eritrocitos.....	38
Figura 6: Variación de temperatura (°C) en el cultivo de tilapia en tres densidades.	42
Figura 7: Variación de oxígeno disuelto (mg O ₂ /L) en el cultivo de tilapia en tres densidades.....	43
Figura 8: Variación de conductividad (mS/cm) en el cultivo de tilapia en tres densidades.	44
Figura 9: Variación de sólidos sedimentables (mL/L) en el cultivo de <i>Oreochromis niloticus</i> en SBF en tres densidades diferentes.....	45
Figura 10: Fluctuación de nitrógeno amoniacal total (NAT) durante el periodo experimental para <i>Oreochromis niloticus</i> en tres densidades de cultivo.....	46
Figura 11: Fluctuación de Amonio ionizado (NH ₄ ⁺) y amonio no ionizado (NH ₃) por tratamiento, durante el periodo experimental para <i>Oreochromis niloticus</i>	47
Figura 12: Fluctuación de nitrato durante el periodo experimental para <i>Oreochromis niloticus</i> en tres densidades de cultivo.	48
Figura 13: Fluctuación de pH durante el periodo experimental para <i>Oreochromis niloticus</i> en tres densidades de cultivo.	49
Figura 14: Fluctuación de alcalinidad durante el periodo experimental para <i>Oreochromis niloticus</i> en tres densidades de cultivo.	49
Figura 15: Variación de cortisol sérico en juveniles de <i>O. niloticus</i> en SBF al inicio (día 1), a la mitad (día 29) y final (día 57) en tres tratamientos.	51
Figura 16: Variación temporal dentro de un mismo tratamiento para cortisol en juveniles de <i>O. niloticus</i> en SBF.....	52
Figura 17: Variación de glucosa sérica en juveniles de <i>O. niloticus</i> en SBF al inicio (día 1), a la mitad (día 29) y final (día 57) en tres tratamientos.	54
Figura 18: Variación temporal durante la fase experimental para glucosa sérica en juveniles de <i>O. niloticus</i> en SBF.	55

Figura 19: Cambios en las variables hematológicas durante el periodo experimental para juveniles de <i>O. niloticus</i> en SBF. (A) Hematocrito, (B) Hemoglobina, (C) número de eritrocitos.....	59
Figura 20: Variación temporal dentro de un mismo tratamiento para hemoglobina,.....	60
Figura 21: Crecimiento de <i>Oreochromis niloticus</i> en tres densidades de cultivo.	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Etapas de crecimiento de <i>Oreochromis niloticus</i> “tilapia del Nilo”.	4
Tabla 2: Variables fisicoquímicas recomendadas para el cultivo adecuado de tilapia.....	6
Tabla 3: Efectos de la concentración de oxígeno sobre la producción de tilapia.	6
Tabla 4: Requerimientos de aminoácidos para el crecimiento de <i>O. niloticus</i>	9
Tabla 5: Parámetros físicos y químicos para la caracterización de un biofloc.....	12
Tabla 6: Principales parámetros operacionales para el desarrollo del SBF.....	13
Tabla 7: Sistemas de cultivo y densidad de carga para la producción de.....	14
Tabla 8: Densidades de siembra aplicados al cultivo de tilapia en diferentes sistemas de cultivo.	15
Tabla 9: Concentración de cortisol en especies de <i>Oreochromis</i> en estado de reposo. .	23
Tabla 10: Concentración referencial de glucosa en especies de <i>Oreochromis</i>	24
Tabla 11: Valores hematológicos referenciales de <i>Oreochromis niloticus</i> en diferentes sistemas de cultivo.....	26
Tabla 12: Características fisicoquímicas de los tanques de cultivo antes de la mezcla de agua de los sistemas.....	29
Tabla 13: Características fisicoquímicas de los tanques con SBF después de la mezcla de agua de los sistemas.....	30
Tabla 14: Descripción de los tratamientos experimentales en función de la carga, la densidad y el peso promedio de juveniles de <i>O. niloticus</i> en SBF.....	30
Tabla 15: Métodos de muestreo para la evaluación de parámetros fisicoquímicos en tanques de cultivo con SBF.	32
Tabla 16: Variables fisicoquímicas de calidad de agua del cultivo de juveniles de tilapia del Nilo en SBF a diferentes densidades	41
Tabla 17: Concentración de cortisol sanguíneo en <i>Oreochromis niloticus</i> en tres densidades de cultivo a través del periodo experimental.	50
Tabla 18: Concentración de glucosa sanguínea durante el experimento.....	53
Tabla 19: Parámetros hematológicos e índices hematimétricos de juveniles de tilapia cultivadas en tres densidades diferentes en SBF	56
Tabla 20: Desempeño productivo de tilapias cultivadas en SBF a diferentes densidades.	61
Tabla 21: Peso promedio de juveniles de tilapia tomados cada 15 días.....	63

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Ejemplar de <i>Oreochromis niloticus</i> , de 90 g de peso.	82
Anexo 2: Equipo multiparámetro marca Hach, modelo <i>HQ40d</i> (centro), con sondas para medir conductividad (izquierda) y oxígeno (derecha).....	82
Anexo 3: Medición de los sólidos sedimentables en cono Imhoff	82
Anexo 4: Porcentaje de carbono en materia orgánica.	83
Anexo 5: Tubos de colecta de sangre. (a)Tubos <i>microcollet</i> , (b) Tubos con EDTA.	84
Anexo 6: Elementos del kit de determinación de cortisol	84
Anexo 7: Lavador de placas de ELISA, marca <i>Kayto</i>	84
Anexo 8: Lector de microplacas de ELISA, marca <i>Sinnowa</i>	85
Anexo 9: Espectrofotómetro marca <i>UNICO</i> modelo <i>1100</i> , usado para determinar la concentración de glucosa.....	85
Anexo 10: Espectrofotómetro marca <i>HACH</i> modelo <i>DR3900</i> , usado para medir compuestos nitrogenados.....	85
Anexo 11: Informe inferencial – Parámetros productivos.....	86
Anexo 12: Informe inferencial – Calidad de agua.....	90
Anexo 13: Informe inferencial - Parámetros bioquímicos	95
Anexo 14: Informe inferencial – Parámetros hematológicos	100
Anexo 15: Datos registrados de temperatura (°C) por cada tratamiento.....	111
Anexo 16: Datos registrados de oxígeno disuelto (mg/L) por cada tratamiento.	112
Anexo 17: Datos registrados del porcentaje de saturación (%) por cada tratamiento. .	113
Anexo 18: Datos registrados de conductividad (mS/cm) por cada tratamiento.	114
Anexo 19: Datos registrados de los sólidos sedimentables (mL/L) por cada tratamiento.	115
Anexo 20: Datos registrados de los compuestos nitrogenados (mg/L) por cada tratamiento.	116
Anexo 21: Datos registrados de pH por cada tratamiento.....	117
Anexo 22: Datos registrados de la alcalinidad (mg CaCO ₃ /L) por cada tratamiento...	117
Anexo 23: Datos resumen de las medidas de peso individual (g), biomasa (g) y carga (Kg/m ³), por tratamiento.....	118
Anexo 24: Datos obtenidos para determinación de cortisol (ng/mL) y glucosa (mg/dL).	118
Anexo 25: Datos obtenidos para el analisis de los parámetros hematológicos.	119

RESUMEN

El empleo de organismos acuáticos para el cultivo en altas densidades como un medio para aumentar la productividad se ha convertido en una tendencia importante de los acuicultores a nivel mundial. El objetivo de ésta investigación fue determinar los efectos de diferentes densidades de cultivo sobre los parámetros bioquímicos y hematológicos en individuos juveniles de *O. niloticus* cultivados en un sistema de producción con tecnología biofloc. Se trabajó con tres tratamientos, en las siguientes cargas iniciales: 3.12, 8.42 y 15.57 Kg/m³ (T1, T2 y T3, respectivamente), en un volumen de agua de 250 L y peso total promedio de 88.9 ± 2.54 g. Los tratamientos fueron mantenidos en una relación de C:N de 15:1. El experimento duró 57 días, y en ese transcurso se colectó tres muestras de sangre (al inicio, intermedio, y final del experimento), mediante punción de la vena caudal. Se extrajo 0.5 mL del 20% de la población por cada repetición para cuantificar parámetros bioquímicos, y 0.5 mL de otro 20% de la población para cuantificar parámetros hematológicos a través de métodos estandarizados. Se realizaron biometrías quincenales para evaluar el desempeño productivo de la tilapia. Los resultados mostraron un incremento en los parámetros bioquímicos y hematológicos al inicio del experimento en los tres tratamientos, con un descenso hacia el final del experimento en los niveles de cortisol, hemoglobina, hematocrito y en el conteo de eritrocitos. Se presentó diferencias significativas en temperatura, conductividad y sólidos sedimentables de T1 y T2 frente a T3; mientras que se determinó diferencias entre todos los tratamientos en oxígeno disuelto, porcentaje de saturación, pH, nitrógeno amoniacal total y amonio no ionizado y nitrato ($p < 0.05$), sin embargo, los datos obtenidos se encuentran dentro del rango óptimo para el cultivo, a excepción de la conductividad eléctrica. Los resultados referentes a parámetros productivos indicaron inhibición del crecimiento en los tres tratamientos durante las primeras 4 semanas, luego del cual hubo un incremento del peso, alcanzando T2 y T3 mayor ganancia de peso, respecto de T1. A su vez, se obtuvo sobrevivencias superiores al 95% en todos los tratamientos.

Palabras clave: Densidad de cultivo, estrés, cortisol, glucosa, *Oreochromis niloticus*

ABSTRACT

The use of aquatic organisms for cultivation at high density as a means to increase productivity has become an important trend for fish farmers worldwide. The objective of this research was to determine the effects of different culture densities on the biochemical and hematological parameters in juvenile *O. niloticus* individuals cultured in a production system with biofloc technology. We worked with three treatments, in the following initial loads: 3.12, 8.42 and 15.57 Kg/m³ (T1, T2 and T3, respectively), in a volume of water of 250 L and average total weight of 88.9 ± 2.54 g. The treatments were maintained in a C: N ratio of 15: 1. The experiment lasted 57 days, and in this course three samples were taken (at the beginning, intermediate, and end of the experiment), by puncture of the caudal vein. We extracted 0.5 mL of 20% of the population for each tanque to quantify biochemical parameters, and 0.5 mL of another 20% of the population to quantify hematological parameters through standardized methods. Biweekly biometries were performed to evaluate the productive performance of the tilapia. The results showed an increase in the biochemical and hematological parameters at the beginning of the experiment in the three treatments, with a decrease towards the end of the experiment in the levels of cortisol, hemoglobin, hematocrit and in the erythrocyte count. There were significant differences in temperature, conductivity and sedimentable solids of T1 and T2 versus T3; while differences were determined between all the treatments in dissolved oxygen, percentage of saturation, pH, total ammonia nitrogen and non-ionized ammonium and nitrate (p < 0.05). However, the data obtained are within the optimum range for the cultivation, except for electrical conductivity. The results referring to productive parameters indicated growth inhibition in the three treatments during the first 4 weeks, after which there was an increase in weight, reaching T2 and T3 greater weight gain, with respect to T1. In turn, survival of more than 95% was obtained in all treatments.

Keywords: crop density, stress, cortisol, glucose, *Oreochromis niloticus*

I. INTRODUCCIÓN

Gracias a su resistencia a diferentes condiciones adversas, como la presencia de patógenos (Silveira-Coffigny *et al.*, 2004), a elevadas densidades de cultivo (Widanarni *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2015), o al cultivo en aguas altamente ácidas (Rebouças *et al.*, 2015), la tilapia es la especie elegida por muchos piscicultores, para ser cultivada en diferentes partes del mundo, lo que hace que este recurso ocupe el cuarto lugar en producción con más de cuatro millones de toneladas métricas a nivel mundial, siendo China el mayor productor de esta especie (FAO, 2018).

El desarrollo de la Acuicultura en el Perú ha experimentado un gran aumento en los últimos años, y entre las especies ícticas más representativas de la acuicultura nacional que se cultivan en el ámbito continental, se cuenta con *Oncorhynchus mykiss* “trucha arco iris” y *Oreochromis niloticus* “tilapia del Nilo”, quienes ocupan la mayor producción acuícola al año 2016, con 52 245 y 2 950 toneladas métricas, respectivamente (PRODUCE, 2017).

En los últimos años se ha aplicado la tecnología Biofloc (SBF) en diferentes partes del mundo al cultivo de peces y crustáceos. Esta tecnología se caracteriza por permitir el tratamiento del agua, mediante la adición externa de una fuente de carbono al sistema que permite el consumo de compuestos nitrogenados por medio de bacterias heterotróficas, quienes reducen las concentraciones de nitrógeno amoniacal total y de nitritos, transformando estos sustratos en proteína microbiana (Crab *et al.*, 2012). De esta manera el SBF permite el reciclaje del agua, disminuyendo considerablemente su uso en zonas donde este recurso es escaso (Hargreaves, 2013). Esta tecnología es relativamente nueva, ya que viene siendo usada desde hace más de 20 años en diferentes países, tales como Brasil y Colombia (Suramérica) o China (Asia). Su implementación es aún limitada debido al desconocimiento de sus beneficios en materia de costos, impacto ambiental y productividad.

Las diferentes especies de *Oreochromis* pueden cultivarse en este sistema, ya que se ha obtenido buen desempeño productivo (Cedano-Castro *et al.*, 2013; Long *et al.*, 2015),

incluso en altas densidades de cultivo (Luo *et al.*, 2014), lo que demuestra su gran adaptabilidad a diferentes ambientes de cultivo.

También se han realizado diversas evaluaciones respecto al efecto del SBF sobre la tilapia, tales como la retención de nitrógeno (Avnimelech, 2007; Avnimelech y Kochba, 2009), tamaño del floc (Ekasari *et al.*, 2014), crecimiento, actividad digestiva y rentabilidad (Luo *et al.*, 2014), pero se han reportado pocos trabajos que indiquen el estado fisiológico, expresado a nivel hematológico, bioquímico, celular y molecular de la tilapia criada en este sistema. En cautiverio, los peces son sometidos constantemente a diferentes estresores, ya sea de origen antropogénico o de origen natural, que pueden ser de corta o de larga duración. La respuesta a estresores de corta duración está mediada por un gasto energético que involucra una respuesta adaptativa que le permite a los peces hacer frente al agente estresor mediante el ataque o la huida. Si el estresor permanece continuamente, esta respuesta adaptativa se ve comprometida (Pickering y Pottinger, 1995).

Algunos investigadores han demostrado que la densidad de cultivo y las interacciones sociales entre peces de la misma especie en un mismo estanque, presentan una incidencia significativa sobre la respuesta al estrés (Barton e Iwama, 1991; Pickering, 1993; Barcellos *et al.*, 1999), lo que genera un impacto negativo en la salud y bienestar de los peces cultivados, con efecto en el comportamiento y ocasionando inmunodepresión. En sistemas intensivos de producción, si la densidad de cultivo no se determina adecuadamente, se genera hacinamiento, el cual está considerado como un agente estresor crónico (Wendeelar Bonga, 1997). Como consecuencia del estrés generado por el hacinamiento, se presenta elevación en los niveles de cortisol en sangre y a su vez, puede presentar un incremento de nivel de glucosa (Barcellos *et al.*, 1999; Vijayan *et al.*, 1997). También pueden verse afectados los parámetros hematológicos y productivos, donde se observa un menor crecimiento y aumento de la mortalidad (Fernandes y Volpato, 1993; Santos *et al.*, 2010), por lo que la determinación de una densidad apropiada es una operación comercialmente beneficiosa.

El objetivo del presente estudio es evaluar el nivel de estrés, a partir de la cuantificación de cortisol y glucosa en sangre, monitorear las variaciones en los parámetros hematológicos y evaluar algunas variables del desempeño productivo en juveniles de *Oreochromis niloticus* “tilapia del Nilo” en tanques manejados con SBF, a tres densidades de cultivo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. La tilapia del Nilo

2.1.1. Ubicación taxonómica y distribución geográfica

Oreochromis niloticus (“tilapia del Nilo”) es un pez nativo de África, posiblemente el más importante dentro del grupo de peces de aguas cálidas y una de las especies predominantes en el comercio a nivel mundial (FAO, 2018) debido a que se conoce las tecnologías de manejo en cautiverio y por su accesible precio para la población. Pertenece a la familia Cichlidae y el género está conformado por cerca de 100 especies. Varias especies se encuentran diseminadas a nivel mundial, siendo la tilapia del Nilo la de mayor distribución. En un análisis filogenético realizado por Nagl *et al.* (2001), se determinó que los géneros que componen la familia Cichlidae son *Sarotherodon*, *Tilapia* y *Oreochromis*. La taxonomía correspondiente a tilapia del Nilo, se muestra a continuación.

Reino	:	Animalia
Phylum	:	Chordata
Clase	:	Actinopterygii
Orden	:	Perciformes
Familia	:	Cichlidae
Género	:	<i>Oreochromis</i>
Especie	:	<i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1757)
Nombre común	:	tilapia del Nilo

2.1.2. Características biológicas de la especie

La tilapia del Nilo presenta muchos atributos que la denotan como una especie potencial para la acuicultura: presenta rápido crecimiento, tolera cambios medioambientales, resiste a enfermedades y acepta alimentos naturales y artificiales (El-Sayed, 2006).

Es una especie tropical que habita normalmente en aguas poco profundas, y es de hábito alimenticio omnívoro. Dentro de su alimento se encuentra el fitoplancton, rotíferos, cladóceros, plantas acuáticas, pequeños invertebrados, semillas de gramíneas, insectos, restos de peces y también puede filtrar partículas suspendidas; las que atrapa en la mucosa de la cavidad bucal (Engdaw *et al.*, 2013).

Presenta un cuerpo aplanado e hidrodinámico y bandas verticales pigmentadas a nivel de la aleta caudal (Popma y Masser, 1999), boca protráctil, aletas pares (la ventral y la pectoral) e impares (la dorsal, la caudal y la anal). La aleta dorsal y la aleta anal presentan espinas duras, las cuales son de mucho cuidado al momento de la manipulación (Saavedra, 2006). El sistema digestivo de las tilapias es simple, consiste de un corto esófago, un pequeño estómago en forma de saco y un intestino muy largo, el cuál puede alcanzar hasta 6 veces el tamaño de la tilapia (El-Sayed, 2006). Estas características reflejan sus hábitos herbívoros.

Los sexos pueden diferenciarse al comparar la morfología de sus orificios genitales: el macho presenta dos orificios, los cuales son el ano y el orificio urogenital; mientras que la hembra posee tres, el ano, el poro genital y el orificio urinario (Saavedra, 2006). Es considerada una especie muy prolífera, ya que alcanza su madurez sexual aproximadamente a los 50 g de peso y se reproduce alrededor de los 25 °C en áreas tropicales (Meyer, 2004).

El crecimiento de tilapia se divide en tres etapas (Tabla 1), las cuales coinciden con las fases de producción comercial: etapa de alevín, etapa de juvenil o pre-engorde, y la etapa de adultez o engorda. No se ha estandarizado un peso determinado para la separación de las etapas, por lo que su clasificación se rige por la programación de la producción (Meyer, 2004).

Tabla 1: Etapas de crecimiento de *Oreochromis niloticus* “tilapia del Nilo”.

Alevín (g)	Juvenil (g)	Adulto (g)	Referencia
0.12 – 5.00	5.00 – 100.00	> 100.00	SAGARPA (s.f.)
1.00 – 10.00	10.00 – 25.00	> 25.00	FAO (2016)
0.838	40.00	--	Siddiqui <i>et al.</i> (1988)
5.71	--	123.3	Wambach (2013)

2.1.3. Cultivo

La tilapia es una de las especies ícticas más relevantes para la acuicultura continental, siendo la segunda en importancia comercial, después de *Oncorhynchus mykiss* “trucha arco iris”, siendo la producción del año 2003 menor a 200 TM (PRODUCE, 2013), variando significativamente hasta el 2016, donde obtuvo 2 950 TM (PRODUCE, 2017) (Figura 1).

A pesar de los avances en tecnología e innovación a nivel mundial, en el Perú la forma más práctica de producción de tilapia en cualquier etapa de cultivo son los estanques excavados, y en menor grado, en jaulas y sistema de reúso de agua. Muy pocos cultivos de tilapia se realizan en sistemas de recirculación o en sistemas biofloc (Baltazar, 2007; Díaz *et al.*, 2012).

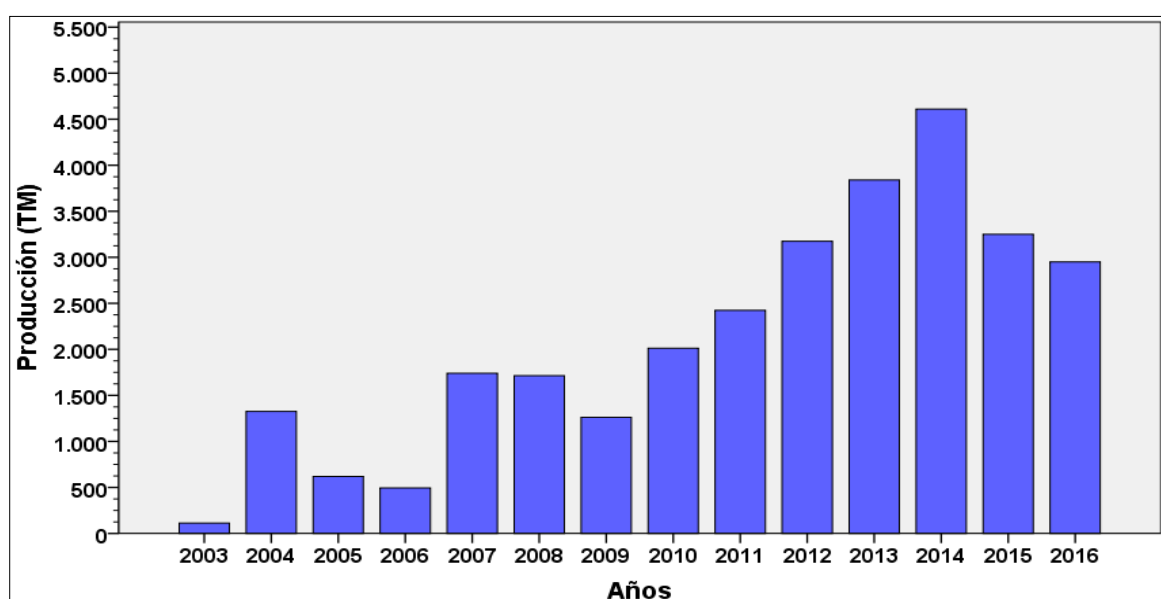


Figura 1: Producción de tilapia en el Perú (en TM), desde el año 2003 hasta el 2016.

FUENTE: Adaptado de PRODUCE (2013) y PRODUCE (2017).

El éxito de un ciclo de producción acuícola está relacionado con tres factores, los cuales presentan incidencia directa en el desarrollo de los organismos cultivados: calidad de agua, nutrición y salud, y la densidad de cultivo.

a. Requerimientos de calidad de agua

- **Temperatura**

Es uno de los parámetros físicoquímicos más importantes a controlar en un sistema de cultivo, ya que por lo general presenta una influencia directa en la dinámica de la actividad

biológica, la absorción de oxígeno, la precipitación de compuestos, sedimentación y filtración. La temperatura ideal de crecimiento para tilapias se encuentra entre 25-32°C, mientras que la temperatura mortal es inferior a 11-12°C y superior a 42°C según FAO (2014). Las investigaciones referidas a éste parámetro coinciden en afirmar que la temperatura aceptable para el buen desarrollo productivo se encuentra en el rango de 25 a 30 °C (Tabla 2).

Tabla 2: Variables fisicoquímicas recomendadas para el cultivo adecuado de tilapia.

Parámetros fisicoquímicos					Referencia
Temp (°C)	OD (mg O ₂ /L)	pH	NH ₃ (mg NH ₃ /L)	NO ₂ ⁻ (mg NO ₂ ⁻ /L)	
27.5 – 30	> 5	-	<2	< 5	Rakocy (1989)
29 – 31	> 3	5 – 10	< 2	27	Popma y Lovshin (1995)
25 – 32	5 – 7	6 – 9	< 1	< 5	DeLong <i>et al.</i> (2009)
25 – 29	6.4	6.9	0.22	-	Venturoti <i>et al.</i> (2015)

Temp: temperatura; OD: oxígeno disuelto; pH; potencial de hidrógeno; NH₃: amonio no ionizado; NO₂⁻: nitrito

- **Oxígeno disuelto**

La concentración de oxígeno en el agua de un estanque es considerada como el parámetro fisicoquímico más importante en un sistema de producción acuícola, es por esto que se recomienda que la concentración de oxígeno sea mayor de 5 mg O₂/L (Rakocy, 1989; DeLong *et al.*, 2009; Venturoti *et al.*, 2015). En la Tabla 3 se indica que las consecuencias de la exposición a concentraciones menores de 4 mg/L y por periodos prolongados son diversas: desde la inhibición del metabolismo, el retardo en el crecimiento y la susceptibilidad a enfermedades (Popma y Masser, 1999; FONDEPES, 2004).

Tabla 3: Efectos de la concentración de oxígeno sobre la producción de tilapia.

Oxígeno (mg/L)	Efectos
0.00 – 0.30	Sobrevivencia de peces pequeños en un periodo corto
0.30 – 2.00	Letal en exposiciones prolongadas
3.00 – 4.00	Presentan sobrevivencia, pero reducen crecimiento
5.00 a más	Permite el crecimiento óptimo

FUENTE: FONDEPES, 2004

La tilapia es muy reconocida por su capacidad de tolerar niveles muy bajos de oxígeno disuelto, ya que pueden sobrevivir en concentraciones menores de 0.5 mg/L, según Popma y Lovshin (1995), por un corto periodo de tiempo; sin embargo, los efectos sobre su rendimiento se ven afectados por el incremento de la tasa respiratoria al aumentar el estrés por condiciones de hipoxia o anoxia.

- **pH**

Es un parámetro que indica el grado de acidez o basicidad del agua y se define como la concentración de iones hidrógeno en el agua. Se considera rangos de pH de 5 – 10 como aceptables para la producción de tilapias (Popma y Lovshin, 1995), mientras que Delong *et al.* (2009) recomienda valores que se mantengan entre 6 – 9. Cavalcante y Sá (2010) mencionan que si los valores de pH están fuera de dicho rango, se puede generar estrés y retardo en el crecimiento. Por el contrario, Rebouças *et al.* (2015) han demostrado que el rendimiento productivo de tilapia del Nilo no se ve afectado cuando se cultiva en agua con pH 4, lo que demuestra la capacidad de este pez para tolerar ambientes desfavorables.

- **Compuestos nitrogenados**

El nitrógeno amoniacal total (NAT) es la suma del ion amonio (NH_4^+) y el amoniaco (amonio no ionizado, NH_3). El NAT es transformado en nitritos (NO_2^-), y éstos a su vez, en nitratos (NO_3^-) en un proceso llamado nitrificación. De los compuestos que conforman el NAT, el amoniaco es tóxico y su concentración en el agua depende del pH y la temperatura, pues en baja temperatura y pH ocurre la reducción del NH_3 , disminuyendo así la concentración de la forma no ionizada (Summerfelt, s.f.). Rakocy (1989), Popma y Lovshin (1995), Popma y Masser (1999) recomiendan valores de amoniaco menores a 2 mg/L, mientras Delong *et al.* (2009) los recomienda menores a 1 mg/L.

El nitrito es tóxico para los peces ya que, al reaccionar con la hemoglobina, afecta el transporte de oxígeno a los tejidos. Rakocy (1989) y Delong *et al.* (2009) recomiendan que los niveles de nitrito sean menores de 5mg/L en el agua de cultivo, mientras Popma y Lovshin (1995) recomiendan no sobrepasar los 27 mg/L. En un estudio realizado por Luo *et*

al. (2014), se alcanzó valores de 60 mg/L en los primeros días de cultivo, sin embargo, no se reportó mortalidad asociada al nitrito. La toxicidad por nitrato puede ocurrir en concentraciones mayores de 400 mg/L (DeLong *et al.*, 2009).

- **Dureza y alcalinidad**

En un sistema de cultivo, la dureza del agua se refiere a la concentración, principalmente, de iones Calcio (Ca^{++}) y Magnesio (Mg^{++}); y la alcalinidad, a la cantidad de carbonatos y bicarbonatos. Tanto dureza como alcalinidad son expresados en mg CaCO_3/L . En combinación, presentan influencia sobre la capacidad buffer del agua de cultivo. Egna y Boyd (1997) recomiendan mantener los niveles de alcalinidad por encima de 30 mg/L para no limitar la producción primaria en un estanque de cultivo, mientras que DeLong *et al.* (2009) recomiendan mantenerla en el rango de 100 – 250 mg/L mediante la adición de fuentes carbonadas solubles, como el bicarbonato de sodio. Cavalcante *et al.* (2014) mencionan que la relación entre dureza total y alcalinidad afecta los parámetros productivos cuando dicha relación presenta un desbalance de 5:1 o de 1:2, sugiriendo que para un menor efecto de la dureza y alcalinidad sobre el cultivo se maneje una relación de 1:1.

- **Conductividad**

La conductividad es una expresión numérica de la capacidad de una solución para transportar una corriente eléctrica, a su vez, indica la presencia de sales en el agua, lo que hace aumentar su capacidad de transmitir una corriente eléctrica. La conductividad es una expresión indirecta de la dureza del agua, ya que al medir la presencia de iones, también podría medir la presencia de Calcio y Magnesio en el agua de cultivo. Venturoti *et al.* (2015) reportaron conductividades menores de 90 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en cultivo en jaulas de tilapias cultivadas en Brasil, mientras Cavalcante *et al.* (2014) reportaron un máximo de 1567 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

b. Requerimientos nutricionales

La alimentación es uno de los componentes principales en la producción acuícola, y esa demanda ocupa aproximadamente el 50 % de los costos operativos. La tilapia del Nilo

presenta requerimientos de macronutrientes como cualquier otro organismo vertebrado, tal como las proteínas, los lípidos y los carbohidratos, aunque el porcentaje de uso de dichos sustratos energéticos varíe entre vertebrados superiores e inferiores (El-Sayed, 2006).

Las proteínas son los principales constituyentes de los tejidos y órganos del cuerpo. Para alevines, el requerimiento oscila entre 35 a 40 %; para juveniles, de 30 a 35 %, mientras que, para adultos, de 28 a 32 % (FAO, 2016). Los aminoácidos, monómeros de proteína, tienen un rol importante ya que representa cerca del 42 % de la energía requerida para el crecimiento. En particular, la tilapia del Nilo requiere los mismos aminoácidos esenciales como otros peces de sangre caliente. Santiago y Lovell (1988), reportaron el porcentaje que deben tener dichos aminoácidos en el alimento con 28% de proteína dietaria para un mayor nivel de crecimiento en juveniles (Tabla 4).

Tabla 4: Requerimientos de aminoácidos para el crecimiento de *O. niloticus*

	Porcentaje en la proteína dietaria	PORCENTAJE DE REQUERIMIENTOS DE AA (%) PARA LOS DIFERENTES ESTADIOS		
		Alevín (1 – 40 g)	Juvenil (40 – 100 g)	Adulto (100 – cosecha)
Proteína	---	35	30	25
Lisina	5.12	1.79	1.54	1.28
Arginina	4.20	1.47	1.26	1.05
Fenilalanina	3.75	1.31	1.13	0.94
Treonina	3.75	1.31	1.13	0.94
Leucina	3.39	1.19	1.02	0.85
Isoleucina	3.11	1.09	0.93	0.78
Valina	2.80	0.98	0.84	0.70
Metionina	2.68	0.94	0.80	0.67
Histidina	1.72	0.60	0.52	0.43
Triptófano	1.00	0.35	0.30	0.25
Cistina	0.53	0.19	0.16	0.13
Tirosina	1.79	0.63	0.54	0.45

AA: Aminoácidos.

FUENTE: Adaptado de SANTIAGO Y LOVELL (1988).

En otros estudios realizados a tilapias de 30 g de peso, se evaluó qué relación entre energía digestible (ED) y proteína digestible (PD) es la adecuada para obtener una mayor tasa de crecimiento. Gonçalves *et al.* (2009) no determinó diferencias significativas entre distintos

niveles de PD en función de la tasa de crecimiento, sin embargo, determinó que con un 30 % de PD y 3000 Kcal/Kg de ED se obtuvo un mejor índice de eficiencia económica y mayor ganancia de peso en filete. Del mismo modo, Botaro *et al.* (2007) obtuvo resultados similares con 24.3 % PD y 3.075 Kcal/Kg de ED. Dichos resultados recomiendan ajustar la cantidad de aminoácidos presentes en las dietas mediante la aplicación del concepto de proteína ideal. Los lípidos son moléculas con elevada energía digestible en forma de ATP, la cual se obtiene a través de la β -oxidación de los ácidos grasos. A su vez, los lípidos constituyen la única fuente de ácidos grasos esenciales para el desarrollo y mantenimiento de la salud del organismo (Lim *et al.*, 2011). Las tilapias requieren aproximadamente el 10 % de lípidos totales, mientras que en ácidos grasos esenciales han mostrado tener un mayor requerimiento por el ácido linoleico (n-6) más que por el ácido linolénico (n-3), ya que presentan un mayor efecto sobre el crecimiento, sin embargo, las tilapias no pueden sintetizar estos ácidos grasos, por lo que su suministro en la dieta es requerido. El requerimiento de n-6 es de 0.5 % de la dieta, mientras que se desconoce la cantidad de n-3 requerido (Takeuchi *et al.*, 1983).

2.2. Los sistemas con tecnología biofloc

2.2.1. Generalidades del sistema biofloc (SBF)

Los sistemas con tecnología biofloc (SBF) permiten minimizar el recambio de agua y reusar esta agua por medio de un adecuado mantenimiento de su calidad (Crab *et al.*, 2012). Estas ventajas permiten la intensificación de un cultivo con una inversión y costo de operación relativamente razonables. Se basa en el desarrollo de poblaciones de algas, bacterias, zooplancton, protozoarios, nematodos y otras clases de material orgánico como heces y alimento no consumido, unidos por una matriz mucosa secretada por las bacterias, o por fuerzas físicas como la atracción electrostática (De Schryver *et al.*, 2008). Agrupados, son denominados flóculos, los cuales degradan principalmente los compuestos nitrogenados como el nitrógeno amoniacal total o los nitritos, reduciendo su cantidad presente en el agua y convirtiéndola en proteína microbiana, que puede ser reaprovechada por los peces. En el SBF se presentan poblaciones autotróficas y heterotróficas, estas últimas se manejan a través del ajuste de la relación de carbono y nitrógeno (C:N) para controlar la concentración de nitrógeno inorgánico en el agua (Avnimelech, 1999; Hargreaves, 2013). A su vez, las diferentes poblaciones bacterianas que se desarrollan, interactúan por relaciones de competencia por el espacio y por la fuente alimenticia en este microambiente, lo que

beneficia en el control de organismos potencialmente patógenos (Hargreaves, 2013; Monroy-Dosta *et al.*, 2013).

2.2.2. Relación carbono – nitrógeno

En sistemas de producción acuícola el control de la acumulación de nitrógeno inorgánico en la unidad de cultivo se basa en el metabolismo del carbono y la inmovilización de nitrógeno por células microbianas. Las bacterias y otros microorganismos usan carbohidratos como el azúcar, el almidón o la celulosa como alimento, para la generación de energía y crecimiento. La capacidad de controlar la fuente de carbono y la relación de C:N permite definir qué tipo de sistema podemos usar. Muchos investigadores han variado sus relaciones de C:N, alcanzando relaciones mayores a 12 (Avnimlech, 1999; Crab *et al.*, 2009; Monroy-Dosta *et al.*, 2013). Los aportes de restos nitrogenados de los peces como son los productos de excreción y alimento no consumido, al disolverse desequilibran la relación del nitrógeno con el carbono. Para controlar tal desequilibrio se propone agregar algún material rico en carbono soluble. La cantidad de carbohidrato requerido para mantener la relación C:N, y así mantener reducido los compuestos nitrogenados, depende de la concentración de carbono en el carbohidrato y la cantidad de alimento suministrado. Por lo tanto, las estimaciones deben tener en cuenta el porcentaje de proteína del alimento, el porcentaje de nitrógeno presente en la proteína, y el porcentaje de excreción de dicho nitrógeno (75% por excreción + alimento no consumido) (De Schryver *et al.*, 2008), descontado previamente el porcentaje de humedad propio de cada alimento, lo cual no siempre es considerado. Mediante el suministro de un alimento con 35 % de proteína, la relación C:N será aproximadamente de 9:1, ésta relación puede aumentar al agregar una cantidad de melaza, glucosa o almidón, hasta alcanzar la relación deseada.

2.2.3. Estructura y dinámica del biofloc

Los bioflocs son por lo general de forma irregular, presentan una distribución desigual respecto del tamaño de la partícula, son finos, compresibles, porosos y permeables a los fluidos (Ekasari *et al.*, 2014). De acuerdo a los requerimientos de calidad de agua para caracterizar a un biofloc, De Schryver *et al.* (2008) definen algunos parámetros físicos y químicos de buen desempeño y calidad (Tabla 5).

La dinámica microbiana que gobierna en un SBF, aparte de permitir mantener una adecuada calidad del agua, es una fuente de alimento suplementario al acumularse en pequeños flóculos (Hargreaves, 2013). Los conocimientos acerca de cómo promover la formación de floc en sistemas de lodos activados, puede ser utilizado para su aplicación en SBF.

Tabla 5: Parámetros físicos y químicos para la caracterización de un biofloc.


Parámetros	Definición	Rango sugerido	Referencia
Sólidos suspendidos totales (SST)	Cantidad de materia particulada presente en un litro de agua de cultivo.	200 – 1000 mg/L	De Schryver <i>et al.</i> , 2008
Sólidos suspendidos volátiles (SSV)	Cantidad de materia orgánica en forma particulada en un litro de agua de cultivo.	91 – 323 mg/L	Azim <i>et al.</i> , 2008; Poli <i>et al.</i> , 2015
Demanda química de oxígeno (DQO)	Cantidad de oxígeno requerida para oxidar químicamente la materia orgánica	--	--
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)	Cantidad de oxígeno que es usada por microorganismos para convertir bioquímicamente materia orgánica en metabolitos	130 mg/L	Azim <i>et al.</i> , 2008;

FUENTE: Adaptado de De Schryver *et al.*, 2008.

Para un adecuado manejo, De Schryver *et al.* (2008), recomiendan algunos parámetros operacionales que ayudarían a obtener una buena calidad de los flóculos para un óptimo crecimiento de la especie a cultivar (Tabla 6). También indicaron que los biofloc tienen un valor agregado y son ricos en nutrientes. Sin embargo, la caracterización de un biofloc es importante para determinar la calidad de los flóculos. Algunos trabajos han sido dirigidos para este fin, y es en esa búsqueda que Monroy-Dosta *et al.* (2013) determinaron, a través de pruebas bioquímicas, la composición y abundancia de poblaciones microbianas asociadas a un SBF en un cultivo de tilapia. En su trabajo hallaron microorganismos que metabolizan el nitrógeno presente, aquellos que son antagonistas de patógenos, y otros con capacidad probiótica, además de ciliados, rotíferos y nematodos (Monroy-Dosta, *comun. pers.*¹). En función de la retención de nitrógeno, Ekasari *et al.* (2014) determinaron que el tamaño del flóculo tiene un rol importante en la calidad del biofloc y afecta la capacidad de retención de nitrógeno en tilapias.

¹ Monroy-Dosta, MC. 11 jun. 2014. Formación de consorcios microbianos en sistemas con tecnología biofloc (correo electrónico). México, Universidad Autónoma Metropolitana de Xochimilco.

Tabla 6: Principales parámetros operacionales para el desarrollo del SBF

	Influencia sobre	A través de	Relacionado a
Intensidad de mezcla	- Estructura y tamaño del floc	- Dispositivo de aireación	- Oxígeno disuelto
Oxígeno disuelto	- Composición microbiana del floc - Estructura y volumen del floc	- Fuerza del aireador - Dispositivo de aireación - Producción de floc	- Intensidad de mezcla - Fuente de carbono - Carga orgánica
Fuente de carbono	- Composición química del floc	- Tipo de fuente de carbono	- Carga orgánica - Oxígeno disuelto
Carga orgánica	- Composición microbiana y química del floc.	- Estrategias de alimentación	- Oxígeno disuelto
Temperatura	- Actividad y estructura del floc	- Adición de calor	- Oxígeno disuelto
pH	- Estabilidad del floc	- Adición de sustancias ácido-básicas	- Alcalinidad - Conductividad

FUENTE: Adaptado de De Schryver *et al.*, 2008.

Luo *et al.* (2014) indicaron que se obtuvo una mayor tasa de crecimiento y elevadas sobrevivencias de tilapias mejoradas genéticamente cultivadas en sistemas biofloc que en sistemas de recirculación, sin embargo, la calidad de agua fue afectada al inicio del experimento por elevadas concentraciones de compuestos nitrogenados, lo que generó un efecto sobre el bienestar, expresado en una inmunidad superior a través de la detección de la enzima superóxido dismutasa del suero en tilapias. Aun así, estos autores recomiendan el uso del SBF a diferencia del sistema de recirculación basándose en el análisis de rentabilidad.

2.3. Crecimiento, densidad de cultivo y estrés

Las estrategias de crecimiento de peces van de técnicas simples a complejas. Las técnicas simples presentan un bajo control de la calidad de agua, del suplemento alimenticio y bajo rendimiento productivo, lo que generaría un mayor costo por unidad de área si aplicáramos un mayor control sobre dichos parámetros. Popma y Lovshin (1995) describen una progresión de los tipos de cultivo en función del manejo (Tabla 7), los cuales también están asociados a densidad de cultivo. Cualquier tipo de sistema de cultivo puede ser el más apropiado, lo que depende de un conjunto de condiciones, tales como fuente natural de alimento, infraestructura, capital de trabajo, habilidad del manejo, entre otros.

Tabla 7: Sistemas de cultivo y densidad de carga para la producción de *Oreochromis niloticus*

Tipos de cultivo en función del manejo		Densidad de carga
1	Extensivo	1000 – 2000 peces/ha
2	Semi-intensivo	5000 – 20000 peces/ha
3	Intensivo – Aireación de emergencia	10000 – 30000 peces/ha
4	Intensivo – Aireación de rutina	10000 – 30000 peces/ha
5	Intensivo – Aireación continua con recambio parcial de agua	5 – 10 peces/m ²
6	Flujo de agua continuo (raceways)	70 – 200 peces/m ³
7	Jaulas	50 – 100 peces/m ³
8	Reúso del agua	50 – 100 peces/m ³

ha: hectárea

FUENTE: Adaptado de Popma y Lovshin (1995).

La densidad de cultivo es un término usado generalmente para hacer mención a la densidad de peces en cualquier punto del tiempo de producción, a su vez, es un factor de gran relevancia ya que afecta el crecimiento de los peces, la utilización del alimento y el rendimiento de la producción (Chakraborty y Banerjee, 2010). Las densidades de cultivo utilizadas a nivel mundial son variables, incluso en SBF para un cultivo intensivo (Tabla 8) ya que pueden oscilar entre 16 a más de 300 peces por metro cúbico de agua.

En condiciones de cultivo intensivo, los agentes estresantes, como la densidad de cultivo, son por lo general, de larga duración y el estrés crónico que puede conllevar este hecho sugiere una pérdida continua de la homeostasis, para la cual la aclimatación no es posible y si ésta ocurre, sería después de un largo periodo (Van Weerd y Komen, 1998). Entonces, la respuesta al estrés cambia de adaptativa a maladaptativa, lo que permite que la energía disponible para el crecimiento derive casi en su totalidad a la restauración de la homeostasis (Pickering, 1993), resultando eventualmente en daños en la reproducción, susceptibilidad a agentes patógenos, disminución de la respuesta a otros estresores de menor intensidad, y reducción del crecimiento (Barton e Iwama, 1991). La información disponible, respecto del efecto de la densidad de cultivo sobre el desempeño productivo durante el cultivo intensivo es limitada y algunas veces controversial (El-Sayed, 2002).

Tabla 8: Densidades de siembra aplicados al cultivo de tilapia en diferentes sistemas de cultivo.

SISTEMA	DENSIDAD DE SIEMBRA	PESO INICIAL DE SIEMBRA	ETAPA	ESPECIE	REFERENCIA
Biofloc	200 peces/m ³	5.71 g	Alevín	<i>O. niloticus</i>	Wambach (2013)
Semi-intensivo	160 peces/ m ³	0.87 g	Alevín	<i>O. niloticus</i>	Díaz <i>et al.</i> (2012)
Estanques	12 peces/ m ³	5.00 g	Juvenil	<i>O. niloticus</i>	Díaz <i>et al.</i> (2012)
Biofloc	60 peces/ m ³	50.43 g	Juvenil	<i>O. niloticus</i> GIFT	Long <i>et al.</i> (2015)
Tanque sin recambio	14 peces/m ²	25.00 g	Juvenil	<i>Oreochromis</i> sp.	Popma y Lovshin (1995)
Biofloc	45 peces/ m ³	123.30 g	Adulto	<i>O. niloticus</i>	Wambach (2013)
Biofloc	16 peces/ m ³	110.20 g	Adulto	<i>O. niloticus</i> variedad Chitralada	Cedano-Castro <i>et al.</i> (2013)
Biofloc	333 peces/ m ³	24.17 g	Adulto	<i>O. niloticus</i> GIFT	Luo <i>et al.</i> (2014)
SRA	333 peces/ m ³	24.17 g	Adulto	<i>O. niloticus</i> GIFT	
Biofloc	60 peces/ m ³	50.43 g	Adulto	<i>O. niloticus</i> GIFT	Long <i>et al.</i> (2015)

Muchos estudios han señalado diversas relaciones entre diferentes densidades de cultivo y el desempeño productivo de la tilapia. Chakraborty y Banerjee (2010) han reportado un mejor rendimiento en la producción de alevines de tilapia del Nilo en una densidad de cultivo de 20 000/ha, sin embargo, siembras mayores o menores a dicha cantidad han resultado tener menor productividad; Alam *et al.* (2014) también consiguieron resultados similares, siendo la densidad de 150 peces/m³ la de mejor rendimiento. Por otra parte, Suresh y Lin (1992), Osofero *et al.* (2009) y Dai *et al.* (2011) reportan una relación inversa entre la densidad de cultivo y la ganancia de peso en tilapias cultivadas en sistemas de recirculación y jaulas, respectivamente, donde el crecimiento disminuye con el incremento de la densidad de cultivo.

En peces, las hormonas que influyen en el crecimiento se pueden dividir en hormonas anabólicas, que son la hormona del crecimiento (GH, *Growth hormone*), los esteroides gonadales, las hormonas tiroideas y la insulina; y en hormonas catabólicas, que son el cortisol y las catecolaminas (Pickering, 1993). A nivel molecular y celular, durante la

exposición a un estresor crónico, las hormonas involucradas en la regulación del crecimiento y el metabolismo son afectados por la activación del eje hipotálamo-hipófisis-células interrenales (HHI), a través de la acción del cortisol (Vijayan y Leatherland, 1988; Van Weerd y Komen, 1998). La GH es sintetizada en las células somatotropas de la adenohipófisis y su regulación se encuentra bajo un control estimulador por parte de la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH, *Growth hormone-releasing hormone*) y de uno inhibidor por parte de la somatostatina (SRIF, *Somatotropin releasing-inhibitor factor*) (Leatherland, 2010). Cuando la GH es liberada, actúa mayoritariamente de un modo indirecto al estimular la síntesis hepática de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF, *Insuline-like growth factor*, del tipo I y II) y su liberación hacia los tejidos, donde promoverán el crecimiento y la diferenciación celular. Cuando se relacionan estos dos parámetros, estrés y GH con la tasa de crecimiento, se observó niveles elevados de la GH plasmática y una disminución en la tasa de crecimiento tanto en *Oncorhynchus mykiss* como en *Salmo salar* sometidos a condiciones de estrés, agudo o crónico (Pickering, 1993). A su vez, el efecto inhibitor del estrés sobre el crecimiento esta mediado a través de la acción del cortisol sobre el eje GH-IGF. Se ha observado que el cortisol disminuye la expresión hepática del mRNA-IGF-I y de los niveles plasmáticos de la IGF-I, lo que parece indicar que el cortisol ejerce una acción desensibilizadora de los receptores hepáticos de la GH (Kajimura *et al.*, 2003). Más aún, los transcritos que codifican para la IGF-I son encontrados en muchas células no hepáticas, lo que sugiere que la hormona actúe como una hormona de crecimiento paracrina o autocrina (Li y Leatherland, 2008).

De manera resumida, se puede señalar que la inhibición del crecimiento bajo condiciones de estrés es consecuencia de las acciones del cortisol en diferentes niveles. Por un lado una acción directa actuando sobre el eje GH-IGF, y por el otro, sus acciones indirectas al actuar sobre otras hormonas promotoras del crecimiento.

2.4. El estrés en peces

El estrés fisiológico y el daño físico son los principales detonantes de enfermedades en los peces y la principal fuente de mortalidad. Muchos agentes patógenos potenciales de los peces se encuentran presentes en el mismo pez o en su mismo entorno. En la naturaleza, los peces suelen ser menos afectados por variables fisicoquímicas debido a que no deben competir por

el espacio ni por alimento, manteniendo su homeostasis; en cambio, en cautiverio, el aumento de la densidad de cultivo y el deterioro de la calidad del agua (Skov *et al.*, 2011), lesiones durante la manipulación, nutrición inadecuada y la falta de saneamiento (Rottman *et al.*, 1992) son factores causantes de estrés. Estas condiciones pueden dar lugar a la inmunosupresión en los peces (Domínguez *et al.*, 2004; Sadhu *et al.*, 2014), el cual se caracteriza por una inhibición en la respuesta mediada por el sistema inmunológico, dando como resultado la disminución de las respuestas innatas y adaptativas de defensa del organismo y por ende, la propagación de cualquier enfermedad, tal como la infección por *Corynebacterium* sp (Silveira-Coffigny *et al.*, 2004).

El estrés es definido por Iwama (2006) “*como la respuesta de la célula, u organismo, a cualquier demanda colocada sobre el mismo, tal que provoca una extensión de un estado fisiológico más allá del estado normal de reposo*”. Aquellos agentes que afecten la homeostasis, que en el ambiente acuático puede incluir contaminantes, temperaturas desfavorables, sedimentos, bajo nivel de oxígeno, hacinamiento, etc., son denominados estresores, quienes tienen doble efecto: producen efectos que amenazan el equilibrio homeostático, y provocan un coordinado conjunto de respuestas fisiológicas y conductuales pensadas para ser compensatorias y/o adaptativas, permitiendo al individuo superar la amenaza (Adams *et al.*, 1989; Wendelaar Bonga, 1997).

Se puede definir dos tipos de estrés en función de la duración del agente estresor. El estrés agudo (letal, de corta duración), el cual ocurre rápidamente como respuesta a perturbaciones a corto plazo, tales como manipulación y transporte de peces (Gomes *et al.*, 2003; Deriggi *et al.*, 2006), hacinamiento (Rotllant y Tort, 1997; Barcellos *et al.*, 1999; Breves *et al.*, 2014), derrames de sustancias químicas (Adamu y Audu, 2008) o cambios radicales en los factores ambientales o en los parámetros fisicoquímicos del cultivo, como oxígeno disuelto, temperatura o pH (Donaldson *et al.*, 2008). El estrés crónico (subletal, de larga duración) es más común, porque los efectos adversos se manifiestan primero a nivel celular, tisular u orgánico, y resulta de exposiciones continuas a bajos niveles de agentes causantes de estrés en periodos de días, semanas, meses o incluso años, tales como alta densidad poblacional o la calidad de agua en niveles límite inferiores o superiores recomendados para la especie (Vijayan *et al.*, 1990; Santos *et al.*, 2010). Los efectos ocasionados por el estrés agudo en el individuo incluyen sólo parte del ciclo vital, mientras que los efectos del estrés crónico

incluyen el ciclo de vida completo del individuo (Auro y Ocampo, 1999). Si un animal experimenta estrés crónico intenso, la respuesta al estrés puede perder su valor adaptativo y ser disfuncional, lo que resulta en una inhibición del crecimiento, fallas reproductivas y susceptibilidad a patógenos (Wendelaar Bonga, 1997; Iguchi *et al.*, 2003).

El impacto de estímulos estresores, tales como cambios extremos en el ambiente físico, interacciones interespecíficas negativas o interferencia humana, depende de factores como la intensidad del estresor o de la situación y la forma en que es experimentado el estrés por los animales; así, el animal experimenta niveles de respuesta al estrés, los cuales son primarios, secundarios y terciarios (Barton, 2002) (Figura 2).

La respuesta primaria representa la percepción de un estado alterado, esta respuesta incluye la activación de los centros cerebrales y la rápida liberación de catecolaminas y cortisol en la circulación (Pickering y Pottinger, 1989). La respuesta secundaria comprende muchos cambios fisiológicos y bioquímicos en el pez, mediados por las hormonas liberadas previamente. Los efectos se dan a nivel tisular y sanguíneo, ocasionando incremento del flujo cardíaco, consumo de oxígeno, movilización de sustratos energéticos, disturbios del balance hidromineral y daños en las vías metabólicas que resultan en la alteración de los parámetros hematológicos (Vijayan *et al.*, 1994). La respuesta terciaria representa cambios a nivel de individuo y población, por medio de la inhibición del crecimiento, reproducción, inmunosupresión y reducción de la tolerancia para otros estresores (Van Weerd y Komen, 1998).

Las reacciones de respuesta al estrés son, por lo general, respuestas inespecíficas. El sistema endocrino tiene una respuesta para cada estresor, pero el rol dominante de la respuesta la tienen las catecolaminas y los glucocorticoides (cortisol); éstas hormonas son los mensajeros primarios de las dos rutas a través de las cuales el cerebro coordina la respuesta al estrés: el eje hipotálamo – sistema nervioso autónomo – células cromafines; y el eje hipotálamo – pituitaria – células interrenales, respectivamente (Wendelaar Bonga, 1997; Bernier y Peter, 2001; Barton, 2002) (Figura 3).

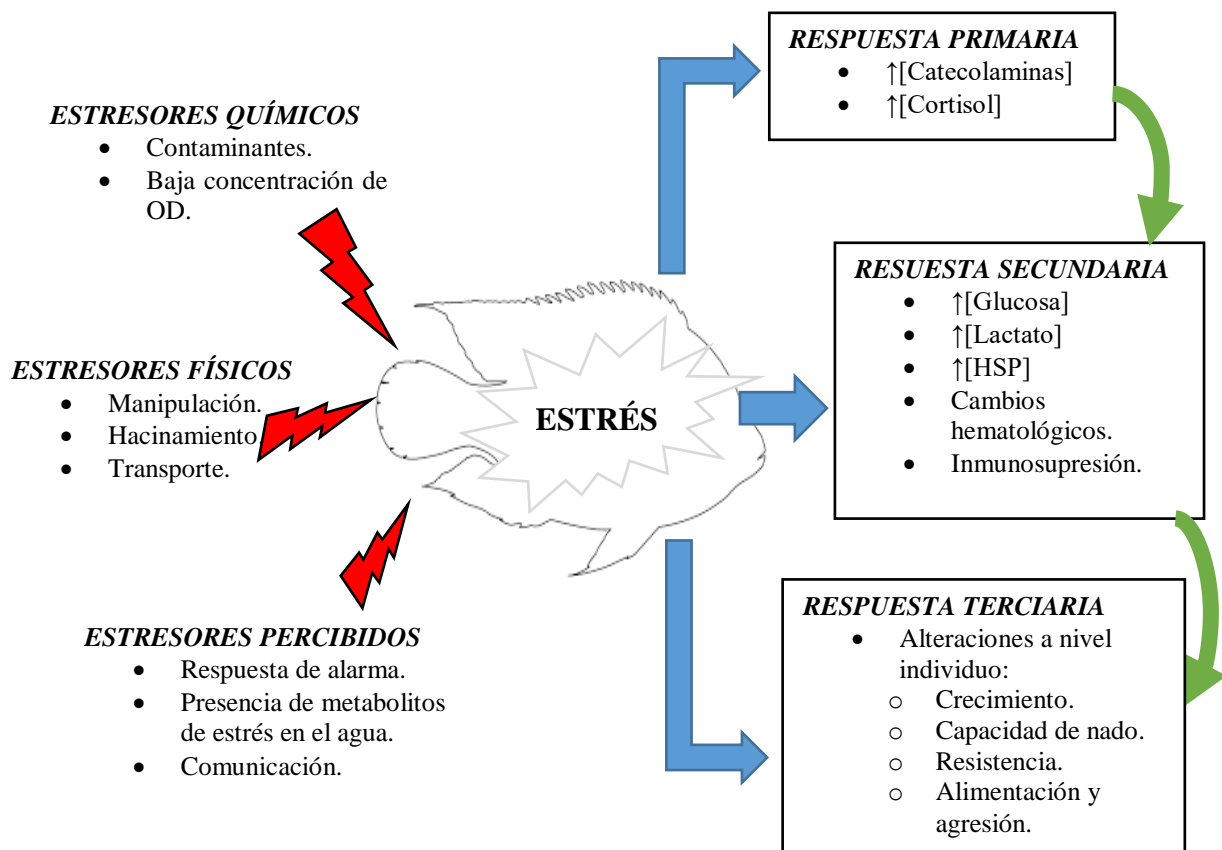


Figura 2: Respuestas asociadas a un cuadro de estrés en peces.

HSP: Proteínas del shock de calor (*Heat Shock Protein*); OD: Oxígeno disuelto.

FUENTE: Adaptado de Barton (2002).

2.4.1. Eje hipotálamo – simpático – células cromafines

Tanto en peces como en mamíferos, la secreción de catecolaminas como la epinefrina y norepinefrina hacia la circulación sanguínea requiere un aumento del transporte de oxígeno y la movilización de sustratos energéticos, por lo que la liberación de catecolaminas es una parte integral de la respuesta a los estresores en todos los vertebrados. En peces, las catecolaminas se sintetizan en el tejido cromafín que se encuentra disperso, en grupos celulares o individualmente, en la zona cefálica del riñón particularmente revistiendo las paredes de las venas poscardinales (Pickering y Pottinger, 1995; Weendelar Bonga, 1997). Su liberación desde las células cromafines se encuentran bajo el control del sistema nervioso simpático, estando por tanto inervadas por fibras colinérgicas preganglionares, sin embargo, la inhibición de dichas fibras no previene completamente la liberación de catecolaminas. Esta liberación no colinérgica se debe probablemente a la acción de factores endocrinos y no endocrinos que incluyen cortisol, aumento de la concentración de potasio y dióxido de carbono.

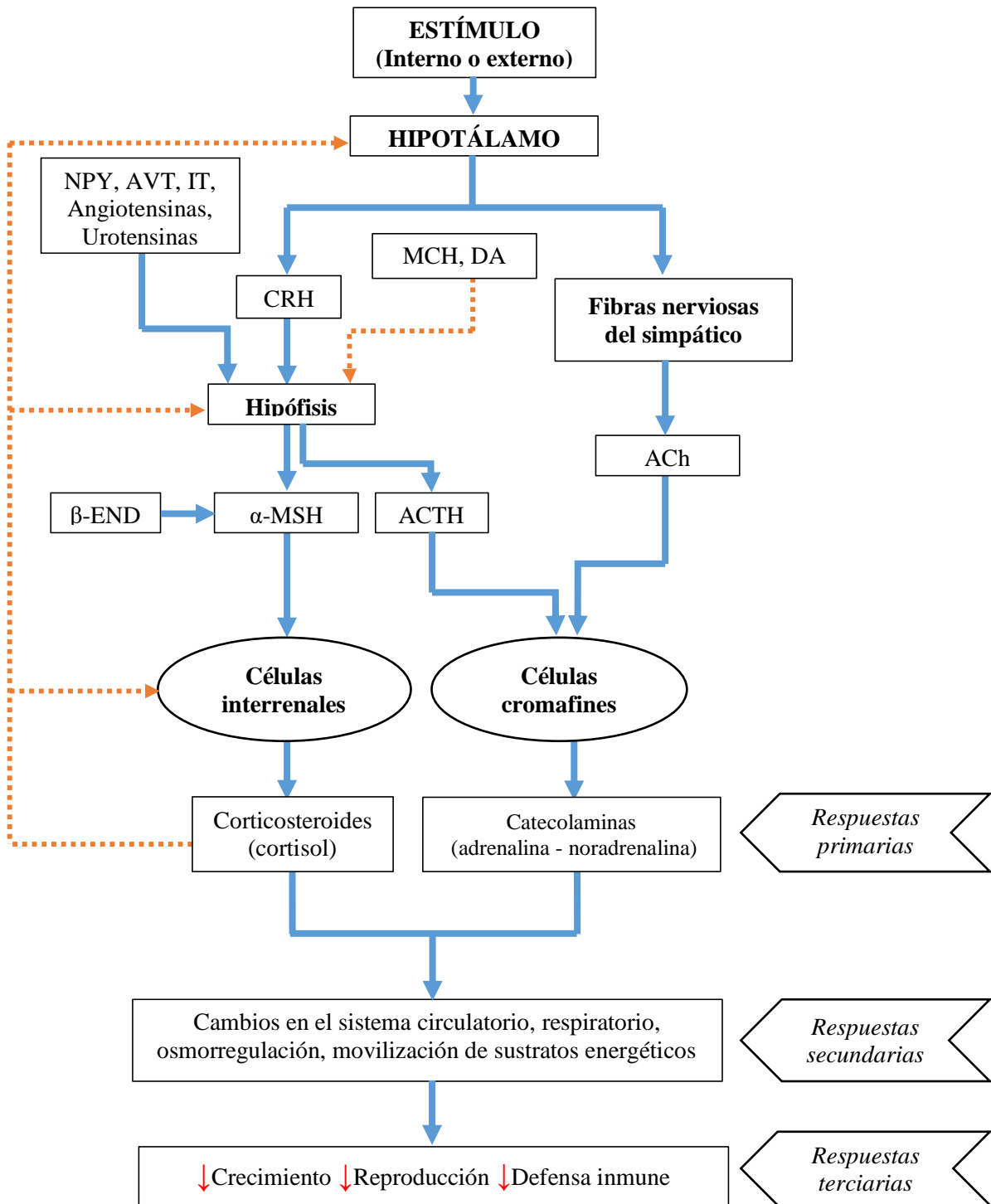


Figura 3: Diagrama general de los principales elementos neuroendocrinos en la respuesta al estrés en peces. (→): Efecto estimulante. (→): Efecto inhibitorio.

Ach: Acetilcolina; CRH: Hormona liberadora de corticotropinas; ACTH: Hormona adrenocorticotrópica; NPY: Neuropeptido Y; MCH: Hormona concentradora de melanina; DA: Dopamina; TRH: Hormona liberadora de tirotrina; α-MSH: Hormona estimuladora de los melanocitos; AVT: Arginina vasotocina; IT: Isotocina; β-END: β-endorfina; ↓: Efecto negativo
FUENTE: Adaptado de Weber (2009).

Situaciones de estrés como pueden ser la hipoxia, manipulación, captura, transporte o estrés térmico provocan un rápido incremento de las catecolaminas en la sangre (Mazeaud *et al.*, 1977; Barton, 2002). Las catecolaminas presentan variados efectos sobre la fisiología del individuo. Uno, es el efecto sobre el sistema respiratorio y cardiovascular. Las catecolaminas aumentan la tasa de consumo de oxígeno branquial debido a una mayor tasa de ventilación, por estimulación β -adrenérgica del corazón. Otro, es el efecto sobre la capacidad transportadora de oxígeno en la sangre. En truchas, la epinefrina incrementa el pH de los eritrocitos mediado por un receptor β -adrenérgico afectado por la estimulación de la bomba de intercambio de iones Na^+/H^+ e inhibición de la bomba $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ en la membrana plasmática (Weendelaar Bonga, 1997; Walsh *et al.*, 1998). Esto genera alcalinización citoplasmática y acidificación plasmática que incrementa la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Como resultado, las propiedades de transporte de oxígeno son mejoradas. Por otra parte, las catecolaminas presentan acción hiperglucemiante, siendo la epinefrina más potente que la norepinefrina. Su misión es la de preparar al organismo frente a un aumento de la demanda energética, que será necesaria para el mantenimiento de las funciones vitales. Para ello incrementará la movilización de la glucosa, a través de la estimulación de la glucogenólisis, desde sus depósitos de reserva hepáticos. En el hígado de diferentes especies de peces se ha demostrado que el efecto hiperglucémico de las catecolaminas es promover la glucogenólisis a través de la estimulación de la glucogenofosforilasa, la cual es el resultado final de su acción sobre los receptores β -adrenérgicos, aunque hay estudios que señalan también la presencia de receptores α -adrenérgicos mediando su acción (Wendelaar Bonga, 1997). Durante el estrés crónico el papel de las catecolaminas en la homeostasis de la glucosa no parece ser tan evidente, y en este caso, el incremento de los niveles de glucosa parece ser dependiente de la acción del cortisol (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997).

2.4.2. Eje hipotálamo – hipófisis – células interrenales (HHI)

El eje HHI consiste de una vía hormonal jerárquica que inicia con la estimulación del hipotálamo, el cual sintetiza la hormona liberadora de corticotropina (CRH, por sus siglas en inglés *Corticotropin-releasing hormone*) en los cuerpos celulares de las neuronas secretoras de la CRH y la transporta a la glándula pituitaria anterior (hipófisis) a través de axones y la libera a través de exocitosis en las sinapsis que ocurren en la región cercana de la hipófisis que contiene a las células corticotrópicas, generando la hormona

adrenocorticotrópica (ACTH, del inglés *Adrenocorticotropic hormone*). La CRH es el principal estímulo para la síntesis de proopiomelanocortina (POMC, *Proopiomelanocortin*), que es el precursor de la ACTH (Volkoff *et al.*, 2005). La CRH también estimula la síntesis de convertasas que catalizan la liberación de ACTH y β -endorfinas de una larga molécula de POMC. La ACTH es el factor principal que regula la función de las células esteroidogénicas del tejido interrenal; activa receptores como el receptor de melanocortina 2 (MC2R, *Melanocortin 2 receptor*), acoplados a la proteína G (proteína asociada al guanosin trifosfato), provocando la cascada intracelular que resulta en la traslocación del colesterol dentro de las mitocondrias del tejido interrenal, a través de la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR, *Steroidogenic acute regulatory protein*), donde es convertido en pregnenolona. La pregnenolona sale de la mitocondria y es biotransformada por el sistema enzimático citoplásmico en esteroides que son precursores para la formación de cortisol, estos precursores entran en la mitocondria, y la fase final de formación de cortisol es llevada a cabo por enzimas mitocondriales. El control endocrino en vertebrados es complejo. En la secreción hipofisaria de la ACTH pueden intervenir otras hormonas, mediante estimulación, tales como las angiotensinas I y II, las urotensinas y el neuropéptido Y (NPY, *Neuropeptide Y*), mientras que por modulación inhibitoria, la hormona concentradora de la melanina (MCH, *Melanophore-concentrating hormone*) y la dopamina (Volkoff *et al.*, 2005). Sin embargo, en peces teleósteos, el control de la secreción del cortisol es aún más complejo dado que, aparte del control hipofisario por parte de la ACTH, la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH, *Melanophore-stimulating hormone*) también estimula su secreción, indicando que no solo la ACTH es responsable de la secreción de cortisol. Además, en ambos casos la β -endorfina puede actuar como un factor que potencia sus acciones. Por último, la concentración plasmática de cortisol retroalimenta a las neuronas secretoras de la CRH del hipotálamo y a las células secretoras de la ACTH y de la α -MSH en la hipófisis, logrando reducir la secreción de dichas hormonas para controlar el nivel de actividad del eje HHI (Van der Boon, *et al.*, 1991; Weber, 2009; Vijayan *et al.*, 2010).

Muchos de los efectos asociados con el cortisol en peces están mediados por señalización genómica que involucra receptores de glucocorticoides (RG) citosólicos. Los RG son factores de transcripción activados por ligandos, que tras la activación se traslocan al núcleo e interactúan con secuencias de DNA específicos, llamados elementos de respuesta a glucocorticoides, en las regiones regulatorias de los genes diana, modulando la transcripción

génica de RNAs mensajeros específicos (Stolte *et al.*, 2006). La inducción de esta síntesis de RNAs mensajeros tiene como consecuencia la síntesis de muchas clases de enzimas, que finalmente determinarán el efecto de la hormona (Van der Boon *et al.*, 1991).

2.5. Parámetros bioquímicos

La concentración de cortisol plasmático como respuesta primaria, puede indicar la duración e intensidad del estresor, pero la respuesta de las células, los tejidos o los órganos no refleja una relación directa con la concentración de la hormona. En la revisión hecha por Barton e Iwama (1991) se reportan concentraciones de cortisol que van desde <2 ng/mL hasta 500 ng/mL en salmónidos y de 4 a 50 ng/mL en *Ictalurus punctatus*, lo que sugiere que el cortisol en sangre es variable según la especie y la situación en la que se toma la muestra (Auperin *et al.*, 1997). La Tabla 9 indica concentraciones referenciales de cortisol para *O. niloticus* en situaciones de reposo.

Tabla 9: Concentración de cortisol en especies de *Oreochromis* en estado de reposo.

Estado	Cortisol (ng/mL)	Referencia
Basal	<10	Fontainhas-Fernandes <i>et al.</i> (2003)
Basal	[5 – 60]	Auperin <i>et al.</i> (1997)
Basal	20.16	Barcellos <i>et al.</i> (1999)
Basal (<i>O. mossambicus</i>)	20	Vijayan <i>et al.</i> (1997)

Cuando los peces son sometidos a situaciones de estrés, la concentración de cortisol suele aumentar de tres a cuatro veces su valor (Auperin *et al.*, 1997; Vijayan *et al.*, 1997), lo que convierte al cortisol en un indicador (marcador) bioquímico de gran ayuda en el diagnóstico de cuadros de estrés, ya que se encuentra tanto en el pez (Barcellos *et al.*, 2011) como en el agua de cultivo (Ellis *et al.*, 2004).

Respecto de la respuesta secundaria en peces, se puede sugerir que el cortisol opera generalmente como una hormona hiperglicémica. Para ello, estimula la movilización de las proteínas y lípidos, aunque de manera menos consistente que en los mamíferos, para su conversión a glucosa a través de la gluconeogénesis. El cortisol incrementa la tasa gluconeogénica hepática al estimular la actividad de las enzimas claves como la glucosa 6-fosfatasa, la fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la fructosa 1,6 bifosfatasa, y

aparentemente estimula la tasa glucolítica, ya que se produce una rápida elevación de los transcritos de piruvato quinasa y glucoquinasa, lo que sugiere la regulación de la oxidación y consumo de glucosa hepática en respuesta a un estímulo estresor. No obstante, la exposición a niveles elevados de cortisol no siempre se traduce en una hiperglucemia, dado que también se han detectado casos en los que puede disminuir o no producir ningún efecto sobre los niveles de la glucosa plasmática y del glucógeno hepático (Mommsen *et al.*, 1999). En la Tabla 10 se detalla algunas concentraciones basales de glucosa, las cuales oscilan entre 30 y 70 mg/dL en condiciones de reposo. Cuando los peces son expuestos a un agente externo, como puede ser la administración de 17- α -metiltestosterona (17-MT) (Sayed y Moneeb, 2015), los niveles de glucosa podrían aumentar con la finalidad de cubrir una demanda energética, sin embargo, para otros autores los efectos hiperglicémicos del cortisol podrían justificarse por la baja utilización de la glucosa en los tejidos periféricos (Van der Boon *et al.*, 1991). También se sugiere el caso contrario, en la cual la ausencia de efectos sobre la glucemia podría ser el resultado de su elevada utilización (Mommsen *et al.*, 1999).

Tabla 10: Concentración referencial de glucosa en especies de *Oreochromis*.

Estado	Glucosa (mg/dL)	Referencia
Basal	30 – 69	Hrubec <i>et al.</i> (2000)
Basal	70	Kajimura <i>et al.</i> (2003)
Basal	39	Silva <i>et al.</i> (2012)
Semi-intensivo	60.32	Bittencourt <i>et al.</i> (2003)
Sometidos a 17-MT	98.75 – 105.78	Sayed y Moneeb (2015)
Basal (<i>O. mossambicus</i>)	50 – 60	Vijayan <i>et al.</i> (1997)

2.6. Parámetros hematológicos

El conocimiento y análisis de los parámetros hematológicos son herramientas muy útiles como medio evaluador de las condiciones fisiológicas, lo que posibilita un adecuado tratamiento ictiosanitario de peces en cautiverio. La medición de dichos parámetros permite el diagnóstico de enfermedades, así como también, permite determinar los efectos de la dieta y otros factores medioambientales (Badawi y Said, 1971; Allen, 1994; Silveira-Coffigny *et al.*, 2004). Así un examen sanguíneo comprendería el cálculo de la concentración de hemoglobina (Hb) que es la proteína encargada del transporte de oxígeno a través de los capilares y vasos sanguíneos; porcentaje de hematocrito (Hto), que se define como el

volumen de sangre que es ocupado por los glóbulos rojos; la cantidad de eritrocitos (RBC, *Red Blood Count*, por sus siglas en inglés), y el cálculo de los índices hematimétricos, los cuales son el volumen corpuscular medio (VCM), la hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de la hemoglobina corpuscular media (CHCM) (Hesser, 1960; Salazar *et al.*, 2011).

Algunos trabajos han buscado establecer valores basales de los parámetros hematológicos, pero dichos resultados han mostrado ser muy variables. En la Tabla 11, se señalan algunos trabajos enfocados a este objetivo. Ueda *et al.* (1997) trabajaron con peces adultos de la especie *Oreochromis niloticus*, mantenidos en laboratorio, con la finalidad de establecer un valor basal para condiciones de reposo; Hrubec *et al.* (2000), trabajaron en la determinación de valores basales de tilapia híbrida (*Oreochromis* sp.) en un sistema de recirculación con alta densidad de cultivo; mientras que Bittencourt *et al.* (2003) trabajaron en un sistema de cultivo semi-intensivo en campo, donde la tilapia mostró una gran oscilación a nivel de conteo de eritrocitos. Delbon (2010) determinó los parámetros hematológicos de tilapia a través del uso de eugenol como anestésico; mientras Guimaraes (2011) estudió el perfil hematológico de tilapias en el estado de Pernambuco (Brasil) en jaulas flotantes sometidas a variables ambientales. Mirea *et al.* (2013) han caracterizado hematológicamente a tilapias cultivadas en sistemas de recirculación afectados por temperatura. Todos los trabajos mencionados en la Tabla 11, indican que la respuesta hematológica es variable en condiciones de reposo o frente a algún elemento estresor.

Una de las condiciones adversas que puede enfrentar el pez es el hacinamiento en reducidos espacios de cultivo, generado por el mismo productor con la finalidad de obtener mayor productividad. Se han realizado investigaciones dirigidas a determinar sistemas de cultivo adecuados y densidades óptimas de cultivo en diferentes estadios de crecimiento sin afectar el bienestar. Long *et al.* (2015) evaluaron el efecto del biofloc sobre el crecimiento, actividad enzimática digestiva, hematología y la respuesta inmune en *Oreochromis niloticus* mejoradas genéticamente, donde reportan que el biofloc tiene un efecto beneficioso en los parámetros evaluados, sin embargo, no evaluaron que densidad inicial de cultivo es la adecuada. En el trabajo realizado por Widanarni *et al.* (2012) evaluaron el rendimiento productivo de *Oreochromis* sp. (tilapia roja) en cultivo con biofloc a diferentes densidades de cultivo, encontrando que existe un efecto del biofloc y de la densidad de cultivo en la

sobrevivencia y ganancia de peso. Silva *et al.* (2012) evaluaron los efectos sobre la hematología de tilapia sobreestresadas por exposición al aire en un tiempo determinado; sus resultados demuestran que el nivel de leucocitos disminuye y la glicemia aumenta pero no se afectaron los índices hematológicos.

Tabla 11: Valores hematológicos referenciales de *Oreochromis niloticus* en diferentes sistemas de cultivo.

ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS							REFE- RENCIA
Sistema de cultivo	RBC (10 ⁶ /uL)	Hb (mg/dL)	Hto (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	
Extensivo	2.35±0.12	7.04±0.38	27.85±1.62	118.6±3.53	30.31±1.64	25.78±1.72	Ueda <i>et al.</i> , 1997
Intensivo	1.90 -2.83	7.0 – 9.8	27 – 37	115 – 183	28.3 – 42.3	22 – 29	Hrubec <i>et al.</i> , 2000
Semi-intensivo	6.93±8.28	10.52±3.09	31.85±8.45	148.80±153.19	40.74±34.19	35.24±14.92	Bittencourt <i>et al.</i> , 2003
	1.79±0.11	6.66±0.28	24.80±2.02	1.39±0.17	-	270.36±8.55	Delbon, 2010
Intensivo	1.96±0.08	7.08±0.24	30.23±1.28	157.92±8.349	37.51±2.056	24.32±1.178	Guimaraes, 2011
Intensivo	2.23	8.41	23.67	115.02	37.66	35.85	Mirea <i>et al.</i> , 2013

Hb: Hemoglobina; Hto: Hematocrito; RBC: Células rojas (Red Blood Cell, por sus siglas en inglés); VCM: Volumen corpuscular medio; HCM: Hemoglobina corpuscular media; CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media.

En Centroamérica, en Cuba, se determinó que los parámetros hematológicos de la tilapia *O. aureus* criados en sistema semi-intensivo fueron afectados por diferentes agentes estresantes como la infección por *Corynebacterium* sp., altas dosis de verde de malaquita y exposición al nitrito (Silveira-Coffigny *et al.*, 2004). También se ha estudiado el estado inmuno-hematológico de *O. mossambicus*. En este caso, en La India, Kumar *et al.* (2011) evaluaron la toxicidad del endosulfano, que es un pesticida organoclorado, y determinaron que el perfil inmuno-hematológico y la glucosa sanguínea son influenciados de acuerdo a la dosis administrada de este pesticida.

Hay muchos reportes asociados con la implementación en la dieta de inmunoestimulantes y microorganismos probióticos asociados a la disminución del estrés en peces cultivados en

altas densidades de siembra. Ran *et al.* (2016) han evaluado la viabilidad de una cepa probiótica de *Saccharomyces cerevisiae* “levadura del panadero” en el cultivo de *O. niloticus* en altas densidades de siembra, demostrando que ésta levadura puede aliviar los efectos negativos ocasionados por la alta densidad de siembra, tales como reducción de la expresión de hsp70 (*Heat shock protein*), aumento del tamaño de las microvellosidades intestinales y aumento de la resistencia contra *A. hydrophila*. A su vez, Telli *et al.* (2014) sugiere la inclusión de *Bacillus subtilis* en el alimento de tilapias cultivadas en altas densidades, ya que mejora el sistema inmune innato e incrementa la media corpuscular media.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Etapa pre-experimental

3.1.1. Acondicionamiento de los tanques con sistemas biofloc (SBF)

En un experimento previo, en el invernadero donde se llevó a cabo el presente estudio se tuvo 12 tanques de 0.5 m³ de capacidad, de los cuales 8 de ellos eran de cemento con las siguientes dimensiones: 0.88 m de largo por 0.88 m de ancho por 0.80 m de altura, revestidos con pintura epóxica blanca; y los 4 restantes fueron circulares de fibra de vidrio de 0.80 m de diámetro por 1 m de altura. Los 12 tanques se dividieron en 6 tanques con SBF y 6 tanques con recambio diario de agua, con un volumen útil de 350 L por tanque. Cada tanque contenía 30 peces juveniles de *Oreochromis niloticus* de diferente peso y talla (ver 3.1.2.).

Se mezcló el agua de cultivo del SBF y el del sistema con recambio con la finalidad de disponer de suficiente biofloc para la fase experimental, además de uniformizar la concentración de los sólidos sedimentables y de reducir el valor de la conductividad. Las características fisicoquímicas de los sistemas de cultivo antes de la mezcla se encuentran resumidas en la Tabla 12. Por medio de una bomba de agua sumergible marca *Venusaqua*, primero se trasvasó el contenido de los 6 tanques con SBF a un tanque circular de fibra de vidrio de 3.5 m³ de capacidad, situado en un invernadero adyacente, y luego el agua de cultivo con recambio de agua hasta completar la capacidad total del tanque circular. Éste tanque se mantuvo durante dos horas con aireación constante para mantener los flóculos en suspensión y lograr una homogenización eficiente (Tabla 13).

Con el vaciado de los 12 tanques del invernadero, se siguieron las recomendaciones dadas por Mejía (2014) para el correcto establecimiento y manejo del biofloc. Se realizó una limpieza preventiva de las mismas, que posteriormente nos permitió mantener los parámetros de calidad de agua.

Tabla 12: Características fisicoquímicas de los tanques de cultivo antes de la mezcla de agua de los sistemas.

	Tanques con SBF	Tanques con recambio de agua
Temperatura (° C)	26.17 ± 0.69	24.54 ± 0.64
Oxígeno disuelto (mg O ₂ /L)	6.66 ± 0.26	7.23 ± 0.20
Porcentaje de saturación (%)	84.80 ± 2.69	89.32 ± 2.58
Conductividad (mS/cm)	5.31 ± 0.56	3.12 ± 0.02
Sólidos sedimentables (mL/L)	39.17 ± 10.69	0.00 ± 0.00

Cada tanque fue acondicionado con un sistema de aireación conformado por un soplador de aire, común para todos los tanques, de ½ HP; una red de tuberías de PVC de 1 ½ y ½ pulgada de diámetro, regulada por llaves de operación manual; una red de mangueras de silicona de 3/16 pulgadas de diámetro conectadas a piedras difusoras de 6 pulgadas de largo de la marca *Marina*. Se colocaron 3 piedras difusoras en el fondo de cada tanque, que favorecieron una correcta aireación y mantenimiento de la suspensión del biofloc procurando no generar zonas anaeróbicas. También se dispuso de un calefactor de 300 W por cada tanque. El SBF fue mantenido mediante la adición de melaza líquida, la cual presentó 40 por ciento de contenido de carbono, para obtener una relación constante de C:N = 15:1 según lo recomendado por Avnimelech *et al.* (2008). La concentración de sólidos sedimentables fue controlada mediante la eliminación de su exceso por sedimentación, con la finalidad de mantener un rango de concentración que varíe entre 25- 30 mL/L (Hargreaves, 2013).

3.1.2. Aclimatación de peces al SBF

Se seleccionó al azar 9 tanques de 0.5 m³ de capacidad, y se procedió a distribuir 0.25 m³ del agua de biofloc del tanque circular de 3.5 m³ a cada una. Las características fisicoquímicas de los sistemas de cultivo después de la mezcla se encuentran resumidas en la Tabla 13. Se distribuyó 22 peces por tanque con un promedio de 81.45 ± 1.30 g de peso y carga de 5.97 ± 0.96 Kg/m³. La finalidad de la distribución de éste número de peces responde a la necesidad de aclimatación de los peces al SBF. El tiempo de aclimatación fue de 28 días, en los cuales se les administró alimento extruido comercial con 35 por ciento de proteína a una tasa de alimentación que varió entre 3 y 2.5 por ciento de la biomasa total.

Tabla 13: Características fisicoquímicas de los tanques con SBF después de la mezcla de agua de los sistemas

	Tanques con SBF
Temperatura (° C)	28.31 ± 0.90
Oxígeno disuelto (mg O ₂ /L)	6.23 ± 0.52
Porcentaje de saturación (%)	82.44 ± 6.05
Conductividad (mS/cm)	4.62 ± 0.03
Sólidos sedimentables (mL/L)	26.56 ± 2.19

3.2. Etapa experimental

3.2.1. Lugar de ejecución y animales de experimentación

El experimento se realizó en un sistema invernadero, en las instalaciones del Centro de Investigación Piscícola (CINPIS), anexo de la Facultad de Pesquería, ubicado en el Campus de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) (12°05'02.9"S; 76°56'43.3"W), distrito de La Molina, departamento de Lima. El experimento se llevó a cabo desde el 28 de octubre hasta el 23 de diciembre del 2015, teniendo una duración de 57 días. Los peces fueron obtenidos del CINPIS. Se dispuso de 225 peces juveniles masculinizados de *Oreochromis niloticus* “tilapia del Nilo” (Anexo 1).

3.2.2. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con tres tratamientos (densidades, Tabla 14) y tres repeticiones por cada tratamiento.

Tabla 14: Descripción de los tratamientos experimentales en función de la carga, la densidad y el peso promedio de juveniles de *O. niloticus* en SBF.

	Carga	Densidad	Peso promedio
Tratamiento 1 (T1)	3.12 Kg/m ³	9 peces/0.25 m ³	86.64 ± 1.03 g
Tratamiento 2 (T2)	8.42 Kg/m ³	23 peces/0.25 m ³	89.90 ± 2.53 g
Tratamiento 3 (T3)	15.57 Kg/m ³	43 peces/0.25 m ³	88.47 ± 0.41 g

Se utilizaron 9 tanques (6 tanques de cemento y 3 tanques de fibra de vidrio), los cuales contaron con el SBF, con un volumen de agua de 0.25 m³ con las mismas características de implementación y diseño que los usados durante la etapa de aclimatación.

3.2.3. Manejo de la alimentación

Los peces fueron alimentados diariamente con una dieta comercial extruida con 35 % de proteína, a una tasa de alimentación del 2 % de su biomasa y una frecuencia de tres veces al día, a las 8:00, 12:00 y 16:00 horas. El fabricante del alimento comercial recomendó una tasa de alimentación del 2.5 %, pero durante el proceso de aclimatación, se observó que los peces no consumían la totalidad del alimento, haciendo que el exceso afecte los parámetros de calidad de agua, por lo que se determinó el uso de la tasa inicialmente mencionada.

3.2.4. Calidad y monitoreo de la calidad del agua en los SBF

En los tanques con SBF se controlaron los siguientes parámetros: temperatura del agua (°C), oxígeno disuelto (mg O₂/L), porcentaje de saturación (%) y conductividad (mS/cm) fueron medidos una vez al día (9:00 h) mediante el uso de un equipo multiparámetro marca *HACH* modelo *HQ40d* (Anexo 2). Los sólidos sedimentables (mL/L) fueron determinados diariamente según Hargreaves (2013), utilizando un cono Imhoff, de 1 L marca *Nalgene*, por un tiempo de sedimentación de 20 minutos (Anexo 3). El potencial de hidrógeno (pH) fue medido usando un potenciómetro de la marca *Hanna Instruments* modelo *HI 98103 Checker*[®], con un registro de dos veces por semana, los días martes y viernes.

La alcalinidad (mg CaCO₃), el nitrógeno amoniacal total (NAT, mg NAT/L) y el nitrato (mg NO₃/L) fueron medidos dos veces por semana mediante el método de titulación (APHA, 1998), de Nessler (solución reactiva, método 8038, HACH) y por el método de reducción del Cadmio (reactivo en polvo, método 8039, HACH), respectivamente (Tabla 15). Para la determinación de estos parámetros se utilizó una muestra de 100 mL, la cual fue centrifugada a 3500 RPM por 15 minutos (Abu Bakar *et al.*, 2015) en una centrífuga marca *Boeco Germany*, modelo *S-8*. Para determinar alcalinidad, se tomó 10 mL del sobrenadante para ser titulada con ácido sulfúrico 0.022 N. Se utilizó como indicador del punto final de titulación al indicador mixto, el cual fue preparado en base a rojo de metilo y azul de

bromocresol (APHA, 1998). Otro volumen de 5 mL del sobrenadante de la muestra fue diluido en agua destilada en relación de 1:10 en fioles de 50 mL de capacidad. Las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro marca *HACH* modelo *DR 3900*. Se siguió el procedimiento recomendado por el fabricante.

Tabla 15: Métodos de muestreo para la evaluación de parámetros fisicoquímicos en tanques de cultivo con SBF.

Parámetro	Unidad	Frecuencia	Instrumentos de medición	Método
Temperatura	°C	Diariamente una vez al día	Multiparámetro <i>HACH</i> modelo <i>HQ 40d</i>	-
Oxígeno disuelto	mg O ₂ /L			-
Porcentaje de saturación	%			-
Conductividad	mS/cm			-
Sólidos sedimentables	mL/L		Cono Imhoff <i>Nalgene</i>	Volumétrico
pH	---	2 veces por semana	Potenciómetro <i>Hanna Instruments</i> modelo <i>HI 98103 Checker</i>	-
NAT	mg NAT/L		Espectro-fotómetro	De Nessler (<i>HACH</i> 8038)
N-NO ₃	mg NO ₃ /L			De reducción del Cadmio (<i>HACH</i> 8039)
Medición de alcalinidad	mg CaCO ₃ /L		H ₂ SO ₄ 0.02N Indicador mixto	De titulación (APHA, 1998)
Corrección de alcalinidad	mg CaCO ₃ /L		NaHCO ₃	Loyless y Malone (1997).

Para el control de los compuestos nitrogenados inorgánicos, el SBF se manejó con una relación de C:N de 15:1, ésta relación se logró mediante la adición de una fuente de carbono externa, que fue la melaza, por ser un producto orgánico conveniente y de bajo costo (De Schryver *et al.*, 2008; Hargreaves, 2013). La melaza se agregó a todas las pozas, en dos horarios en el día, a las 8:00 y 16:00 h, con la finalidad de evitar cambios bruscos en el nivel de oxígeno disuelto en el biofloc. La cantidad de melaza fue controlada mediante la siguiente fórmula, según Avnimelech (1999):

$$M = \frac{D \times A \times \% N \times \% P \times \% Nex}{\% C}$$

Donde:

M = Cantidad de melaza (en g)

D = Diferencia entre la relación C:N que se quiere alcanzar y relación C:N en la poza.

A = Cantidad de alimento suministrado a los peces por día.

$\% N$ = Porcentaje de nitrógeno en la proteína (16%).

$\% P$ = Porcentaje de proteína en el alimento (35%).

$\% C$ = Porcentaje de carbono en la melaza. Fue del 40 por ciento, determinado por el Laboratorio de análisis de suelos, plantas, aguas y fertilizantes de la UNALM (Anexo 4).

Nex = Porcentaje de nitrógeno excretado por los peces y el nitrógeno del alimento no consumido (75 %) (Piedrahita, 2003).

El ajuste de la alcalinidad en los sistemas biofloc se realizó mediante la adición de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) para mantenerlo en un valor mayor de 100 mg CaCO_3/L (Hargreaves, 2013), con la finalidad que el agua de cultivo no pierda su capacidad neutralizante, lo que favorece la estabilidad del pH. Cada una de las pozas fue ajustada siguiendo la metodología de Loyless y Malone (1997). Si la alcalinidad presentaba valores menores de 100 mg CaCO_3/L , entonces se procedía al ajuste respectivo.

3.2.5. Evaluación del estrés en los juveniles de *Oreochromis niloticus*

a. Obtención de muestras sanguíneas

Cada uno de los nueve tanques fue muestreado tres veces: al inicio, día 1 (28 de octubre); a la mitad, el día 29 (26 de noviembre); y al final, día 57 del experimento (23 de diciembre). La muestra correspondió al 40 % de la población en cada tanque, siendo submuestreado 20 % para los análisis bioquímicos y el 20 % restante para realizar los análisis hematológicos.

Se realizó un manejo y una captura cuidadosos con la finalidad de minimizar el estrés. Los peces fueron anestesiados con eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol), en una concentración de 80 mg/L, por el método de inmersión, en un recipiente con 5 L de agua, de manera individual. Inmediatamente fueron pesados en una balanza marca *Ohaus* modelo

Scout™ Pro SP 4001 de 4000 ± 0.1 g de capacidad y rápidamente colocados sobre una esponja húmeda y cubiertos hasta la mitad del cuerpo con una tela húmeda, dejando expuesta la parte caudal para la correspondiente extracción sanguínea (Figura 4). Se utilizó jeringas de tuberculina de 1 mL (sin anticoagulante) para la obtención de muestras de sangre mediante punción de la vena caudal.



Figura 4: Extracción de sangre de la vena caudal

Para la realización de los análisis bioquímicos, se colectó 0.5 mL de sangre que se depositó en tubos *microcollet* (Anexo 5a), que contienen factores de coagulación y que permiten la obtención de suero sanguíneo. Este suero se obtuvo mediante centrifugación de los *microcollet* a 4000 RPM durante 10 minutos en una máquina centrífuga del fabricante *Andreas Hettich GmbH & Co. KG*, modelo *MIKRO 185*, tipo *1203*. Se tomó el sobrenadante, que es el suero sanguíneo, y se trasvasó a tubos centrífuga *Eppendorf* de 1.5 mL que fueron almacenados en una congeladora a -80°C hasta su uso.

Para la realización del análisis hematológico, también se colectó 0.5 mL de sangre, que se depositó en tubos *BD Microtainer* que contienen K_2EDTA (Etilendiamintetraamino dipotásico) (Anexo 5b) para la obtención de sangre sin coagular. Las muestras colectadas fueron colocadas en un cooler con hielo, las muestras que se encontraron hemolisadas o coaguladas fueron descartadas. Después del muestreo, los peces fueron colocados en tinas con 50 L de agua fresca, con aireación constante, para inducir su recuperación por un tiempo mínimo de 2 minutos, en el cual vuelve a tener equilibrio en el nado.

b. Determinación de parámetros bioquímicos

La determinación de cortisol y glucosa en suero sanguíneo fue realizada en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, a una temperatura ambiental constante de 22°C.

b.1. Determinación de cortisol

La medición de los niveles de cortisol en el suero sanguíneo se llevó a cabo por medio del uso de un kit comercial de determinación (AccuBind ELISA Microwells; Monobind Inc., Lake Forest, Estados Unidos) (Anexo 6). El método está basado en un inmunoensayo enzimático (ELISA, *Enzyme linked immunosorbent assay*) de competencia, en el cual la actividad enzimática de la fracción unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de antígeno (cortisol) en la muestra. El protocolo fue el siguiente: para la elaboración de la curva patrón se utilizaron controles de concentraciones de cortisol conocidas (0, 1, 4, 10, 20 y 50 ug/dL), los cuales fueron realizados simultáneamente al desarrollo del análisis. Se depositaron en una microplaca de 96 pocillos, alícuotas con un volumen de 25 µL de suero, a continuación se añadieron 50 µL de reactivo enzimático conjugado de cortisol, y se mezclaron ligeramente con movimientos manuales en forma de ‘ocho’ durante 30 segundos. Se agregaron 50 uL del reactivo que contiene al anticuerpo biotinilado, se volvió a mezclar ligeramente por 30 segundos y se cubrió la placa con papel aluminio para ser incubado por 60 minutos a temperatura ambiente de 22 °C. Después, la microplaca fue colocada en un lavador de placas automatizado de la marca *Kayto* modelo *RT 2600C* (Anexo 7), donde se depositaron en cada pocillo, 350 uL de solución de lavado (agua bufferada, pH 7), que fue eliminado posteriormente. Este proceso de lavado se ejecutó por triplicado. Una vez realizados estos lavados, se agregaron 100 uL de cromógeno a todos los pocillos y la microplaca se cubrió nuevamente con papel aluminio para ser incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente de 22 °C. Una reacción positiva resultó en una coloración azul de tonalidad variable, y a continuación se agregaron 50 uL de una solución de parada (HCl 1N) en cada pocillo y se mezclaron suavemente durante 20 segundos. La reacción provoca una coloración amarilla de intensidad variable, ésta intensidad de color es inversamente proporcional a la concentración de cortisol en las muestras y patrones (según estándar del fabricante).

La microplaca fue colocada en un lector de ELISA de marca *Sinnowa* modelo *ER-500* (Anexo 8) a una absorbancia de 450 nm, usando una longitud de onda referencial de 620 nm para minimizar errores asociados al pocillo. Los estándares y las muestras se hicieron por duplicado. Los resultados finales de concentración se extrapolaron de la curva estándar y se expresaron en ng/mL.

b.2. Determinación de glucosa

La medición de la cantidad de glucosa en el suero sanguíneo se llevó a cabo mediante el empleo de un kit comercial (Valtek Diagnostic, Ñuñoa, Santiago de Chile, Chile), que se basa en el método de la glucosa oxidasa por medio de la fotometría. Para realizar el ensayo, se siguieron las recomendaciones del fabricante. Se agregó 10 uL de suero problema y 1 mL del reactivo enzimático en una cubeta de plástico de 1 cm². Se mezcló ligeramente y se incubó durante 5 minutos; la reacción origina un producto de color rosado de intensidad variable. Se procedió a hacer la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro de marca *UNICO* modelo *1100*, a 505 nm (Anexo 9). Los análisis se realizaron por duplicado.

Previamente, se halló el factor de corrección para la determinación de la concentración de glucosa en los sueros problema, al calcular la absorbancia del calibrador sérico, el cual presentó una concentración de 100 mg/dL. Se procedió similarmente que con los sueros problema. El factor de corrección se calculó dividiendo la concentración del calibrador entre la absorbancia del calibrador. La concentración final de glucosa se obtuvo al multiplicar la absorbancia del suero problema por el factor de corrección. Los resultados se expresaron en mg/dL.

c. Determinación de los parámetros hematológicos

La sangre que se colectó en tubos con anticoagulante se utilizó para determinar los parámetros hematológicos, tales como la hemoglobina, el hematocrito y el conteo de eritrocitos. El nivel de hemoglobina (Hb) fue determinado por el método de la cianometahemoglobina según Blaxhall y Daisley (1973). Se utilizó un kit comercial de determinación fotométrica de hemoglobina (Valtek Diagnostics, Ñuñoa, Santiago de Chile,

Chile) y se siguió las recomendaciones del fabricante. Se agregó 40 μL de sangre total y 10 mL del reactivo de Drabkin y se dejó reposando durante 5 minutos. La lectura se realizó en un espectrofotómetro marca *HACH* modelo *DR 3900* (Anexo 9) con longitud de onda de 540 nm y en una cubeta cuadrada de cuarzo de 2.55 cm^2 . Previamente, se determinó el factor de corrección para la determinación de la concentración de hemoglobina en las muestras sanguíneas, al calcular la absorbancia de la solución estándar de hemoglobina, el cual consta de metahemoglobina disuelta en reactivo de hemoglobina y que equivale a 18 g/dL de hemoglobina. Se colocó 10 mL de la solución estándar en una cubeta y se leyó su absorbancia contra el blanco (solución Drabkin). El factor de corrección se calculó dividiendo la concentración de la solución estándar entre la absorbancia de la solución estándar. La concentración final de hemoglobina se obtuvo multiplicando la absorbancia de las muestras sanguíneas por el factor de corrección determinado previamente. Los resultados se expresaron en g/dL.

El conteo total de eritrocitos se realizó mediante el protocolo planteado por Oliveira-Junior *et al.* (2008). Se colocó 15 μL de sangre en 1500 μL de la solución Formol-citrato (dilución 1:100) y se homogenizó suavemente con la finalidad que todos los eritrocitos puedan ser fijados y coloreados. Se dispuso 10 μL de la mezcla en cada retículo de una cámara de Neubauer (duplicado). Se observó al microscopio al menor aumento para verificar que la distribución de células fuese homogénea, luego con un aumento de 400X se contó en 5 áreas de 0.04 mm^2 . En un microscopio marca *Nikon* modelo *Eclipse E200* se contabilizó la cantidad total en cada retículo y se calculó el promedio entre los dos, procurando evitar que la diferencia entre los conteos de cada retículo sea mayor del 25 % (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013). La cantidad total de eritrocitos se expresó en 10^6 eritrocitos/ μL de sangre, calculada mediante la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de eritrocitos} = \frac{\# \text{Células} \times 5 \times 10 \times 100}{1000000}$$

Dónde:

Células: Promedio de conteo de eritrocitos en los retículos de la cámara de Neubauer.

5: Factor de conversión para 1 mm^2 .

10: Factor de conversión para 1 μL .

100: Factor de conversión para la dilución.

Para la determinación de hematocrito (Hto) se siguió el protocolo diseñado por Soivio *et al.* (1975) con ligeras modificaciones en el tiempo de centrifugación. Se tomó una muestra de sangre con un tubo capilar de 75 mm de largo y de 1.1 mm de diámetro, de la marca *Marienfeld* con anticoagulante, el cual se llenó hasta el 75% de su volumen total. Se selló uno de los extremos en una placa de cera de marca *Virutex* y se colocó en una centrífuga para hematocrito marca *Boeco Germany* modelo *XC-3000* a 12,000 RPM durante 7 minutos. Después de centrifugar se obtuvo tres fases en el capilar, siendo la presentación de arriba hacia abajo, el plasma, los leucocitos y los eritrocitos (Figura 5). Para estimar el porcentaje de hematocrito se realizó la lectura empleando un ábaco de lectura de microhematocrito de la marca *Critocaps*, Oxford, Estados Unidos, midiendo la altura de los eritrocitos en el capilar. La lectura se expresó directamente como porcentaje (%) de hematocrito.

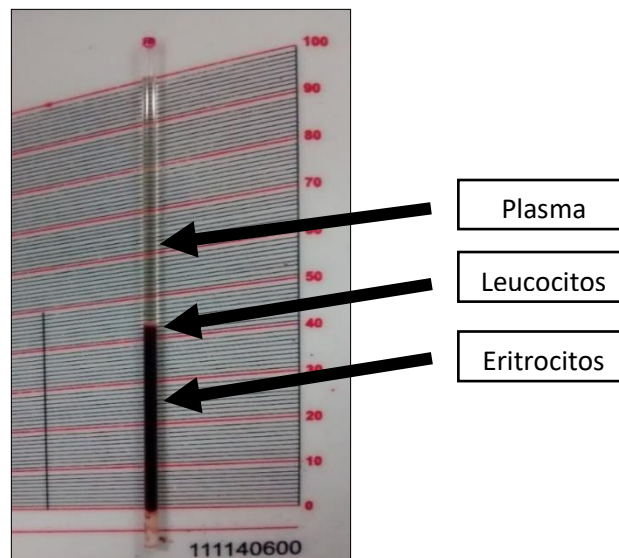


Figura 5: Tubo capilar centrifugado, mostrando la separación de plasma, leucocitos y eritrocitos

Se determinaron los índices hematimétricos según Ranzani-Paiva *et al.* (2013), mediante el cálculo del Volumen Corpuscular Medio (VCM), la Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) y la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CCMH). El VCM se expresó en micras cúbicas y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$VCM (u^3) = \frac{\text{Hematocrito (\%)} \times 10}{\text{Recuento de eritrocitos } \left(\frac{x10^6 \text{ cel.}}{uL} \right)}$$

La HCM se expresó en picogramos y se calculó por la siguiente fórmula:

$$HCM (pg) = \frac{\text{Hemoglobina} \left(\frac{g}{dL} \right) \times 10}{\text{Recuento de eritrocitos} \left(\frac{\times 10^6 \text{ cel}}{uL} \right)}$$

La CHCM se expresó en porcentaje y se calculó por la siguiente relación:

$$CHCM = \frac{\text{Hemoglobina} \left(\frac{g}{dL} \right) \times 100}{\text{Hematocrito} (\%)}$$

d. Evaluación de los parámetros productivos

Los controles biométricos se realizaron cada 15 días con la finalidad de minimizar el estrés asociado al manejo. El primer control biométrico coincidió con la primera extracción de sangre, por lo que el tamaño de muestra tomado para los análisis bioquímicos y hematológicos fue el mismo que para los parámetros productivos (40 por ciento de la población en cada tanque). En el segundo muestreo, después de 15 días, las mediciones se realizaron al 100% de la población. El tercer muestreo fue similar al primero y así sucesivamente, hasta llegar al último muestreo.

Durante los muestreos que coincidieron con la extracción de sangre, la medición del peso se hizo de manera individual, en una balanza digital de marca *Ohaus* modelo *Scout™ Pro SP 4001* de 4000 ± 0.1 g de capacidad. Sobre la balanza se colocó un recipiente de plástico con un volumen de agua de 2 L aproximadamente, el cual fue tarado a 0 g cada vez que fue colocado el pez para su respectiva medición. Para los muestreos totales, se pesaron en grupos de 3, con las mismas condiciones que se describieron anteriormente. Luego del pesado, los peces fueron colocados en tinas con 50 L de agua fresca y con aireación constante, mientras se realizaba limpieza de los tanques. Los parámetros de productividad fueron evaluados usando las siguientes fórmulas, según Long *et al.* (2015):

$$\text{Ganacia de peso} (\%) = \left(\frac{\text{Peso final del pez} - \text{Peso inicial del pez}}{\text{Peso inicial del pez}} \right) \times 100$$

$$\text{Sobrevivencia (\%)} = \left(\frac{N^{\circ} \text{ peces al final}}{N^{\circ} \text{ peces al inicio}} \right) \times 100$$

$$\text{Tasa de crecimiento específica} = \left(\frac{\text{Ln}(\text{peso final}) - \text{Ln}(\text{peso inicial})}{t \text{ (en días)}} \right) \times 100$$

$$\text{Densidad de carga} \left(\frac{\text{Kg}}{\text{m}^3} \right) = \text{Biomasa} / \text{Volumen de agua de cultivo}$$

3.2.6. Procesamiento y análisis de datos

Se usó un diseño experimental completamente al azar. Los datos fueron analizados con el paquete estadístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS), versión 22.0.0. El nivel de confianza para todos los análisis fue de 95 %. Para los análisis bioquímicos, hematológicos y productivos, las asunciones de normalidad necesarias se comprobaron mediante las pruebas de *Shapiro – Wilk* ($n < 30$), mientras que para los análisis de calidad de agua se utilizó la prueba estadística de *Kolmogorov-Smirnov*. Los parámetros productivos, (excepto la sobrevivencia), la alcalinidad, y el número de eritrocitos cumplieron el requisito de normalidad y se les aplicó un análisis de varianza de una vía para identificar diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos. En el caso de haber presentado diferencias entre los tratamientos, se aplicó la prueba de Tukey o Scheffe (solo en el caso del número de eritrocitos) para identificar que tratamientos son estadísticamente diferentes. La sobrevivencia, los parámetros de calidad de agua, cortisol, glucosa, hemoglobina y hematocrito no cumplieron el requisito de normalidad, por lo que los datos fueron analizados mediante un análisis no paramétrico a través de la prueba de *Kruskal – Wallis* y para hallar diferencias entre medianas, se aplicó la prueba de *Mann-Whitney*. En el caso de los parámetros bioquímicos se aplicó la prueba T y la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas, y poder determinar la relación de dichos parámetros dentro del tratamiento. Se elaboró tablas de resúmenes de resultados, gráficos de barras e histogramas y gráficos de dispersión. El análisis estadístico se encuentra registrado en los Anexos 11, 12, 13 y 14.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de parámetros de calidad de agua en el sistema biofloc (SBF)

Durante el periodo experimental, los parámetros de calidad de agua entre los tres tratamientos se muestran en la Tabla 16. Los valores promedio de las variables evaluadas, tales como la temperatura, la conductividad y los sólidos sedimentables no presentaron diferencias significativas entre T1 y T2, pero ambos sí presentaron diferencias significativas con T3. El oxígeno disuelto, el porcentaje de saturación, el pH, el NAT, el amoníaco y los nitratos presentaron diferencias significativas entre los tres tratamientos. La alcalinidad presenta diferencias significativas entre T1 frente a T2 y T3. Los promedios de las variables fisicoquímicas en los tres tratamientos se encuentran dentro de los rangos aceptables para el crecimiento adecuado de la tilapia, a excepción de la conductividad.

Tabla 16: Variables fisicoquímicas de calidad de agua del cultivo de juveniles de tilapia del Nilo en SBF a diferentes densidades

	Unidades	TRATAMIENTOS		
		T1 (3.12 Kg/m ³)	T2 (8.42 Kg/m ³)	T3 (15.57 Kg/m ³)
Temperatura	°C	29.19 ± 0.95 ^a	29.45 ± 1.51 ^a	29.10 ± 1.09 ^b
Oxígeno disuelto	mg/L	7.11 ± 0.37 ^a	6.45 ± 0.66 ^b	5.89 ± 0.78 ^c
Saturación	%	96.09 ± 2.27 ^a	88.20 ± 4.95 ^b	79.78 ± 8.67 ^c
pH		8.18 ± 0.30 ^a	7.69 ± 0.35 ^b	7.39 ± 0.44 ^c
Conductividad	mS/cm	5.49 ± 0.42 ^a	5.45 ± 0.42 ^a	5.77 ± 0.41 ^b
NAT	mg NAT/L	1.428 ± 0.758 ^a	2.121 ± 0.746 ^b	2.506 ± 0.715 ^c
Amoníaco	mg NH ₃ /L	0.222 ± 0.185 ^a	0.108 ± 0.078 ^b	0.073 ± 0.080 ^c
Nitrato	mg NO ₃ /L	121.09 ± 27.51 ^a	135.54 ± 25.15 ^b	149.22 ± 23.65 ^c
SS	mL/L	36.24 ± 13.38 ^a	36.01 ± 13.02 ^a	41.68 ± 15.64 ^b
Alcalinidad	mg CaCO ₃ /L	99.62 ± 27.13 ^a	81.67 ± 24.58 ^b	72.21 ± 25.26 ^b

NAT: Nitrógeno amoniacal total; SS: sólidos sedimentables. Los datos se expresan en media ± desviación estándar. Superíndices distintos indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

La temperatura promedio estuvo en el rango de 29.1 y 29.6 °C para los tres tratamientos y las variaciones a lo largo del experimento se encuentran en la Figura 6 y en el Anexo 15. Hubo diferencias significativas de T3 frente a T1 y T2; sin embargo, la temperatura promedio de los tres tratamientos concuerda con el rango óptimo recomendado por Rakocy (1989), Popma y Lovshin (1995), Delong *et al.* (2009) y Venturoti *et al.* (2015). Se detectó temperaturas bajas al inicio del experimento por el calentamiento del agua por efecto de la reciente instalación de los calefactores, y desde el día 39 hasta el día 41, la disminución se debió a cortes de energía eléctrica. A pesar de las variaciones de temperatura, no se reportó mortalidad de los juveniles de *Oreochromis niloticus* en los SBF, lo que concuerda con lo reportado por Crab *et al.* (2009), quien señala que las tilapias pueden soportar temperaturas de hasta 14°C sin ver afectado su cultivo.

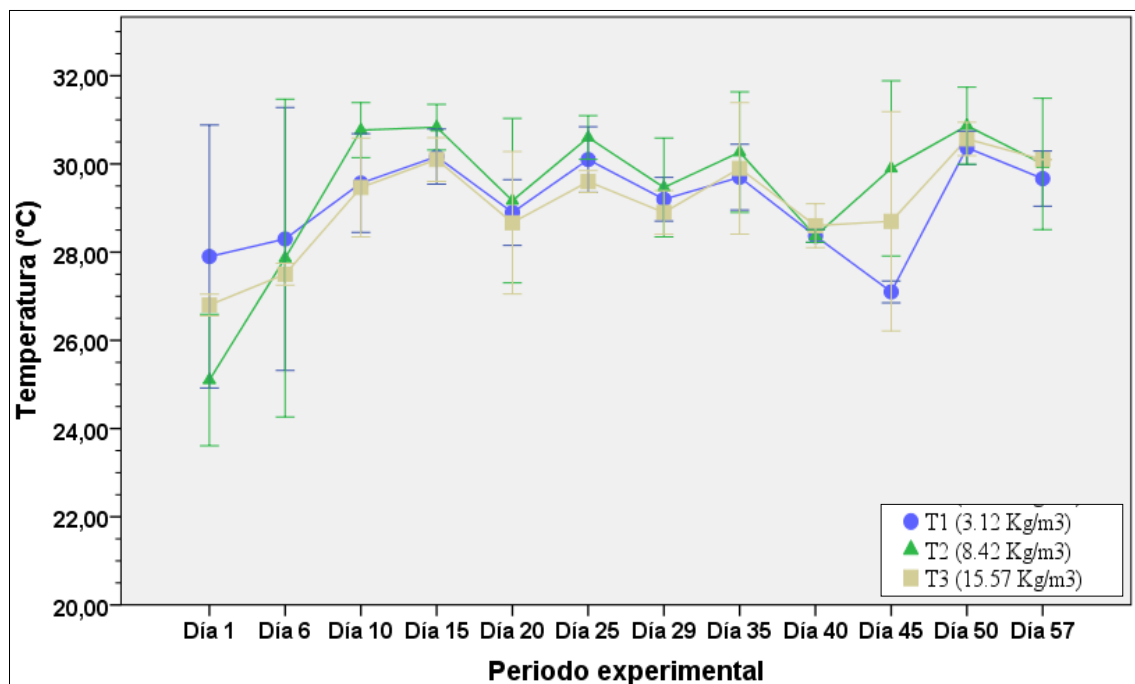


Figura 6: Variación de temperatura (°C) en el cultivo de tilapia en tres densidades.

El oxígeno disuelto promedio se encontró en el rango de 5.88 a 7.10 mg/L y el porcentaje de saturación de oxígeno en 79.70 a 95.98 % para los tres tratamientos, siendo el menor promedio de oxígeno disuelto y saturación para el tratamiento con mayor densidad (15.57 Kg/m³) y el mayor, para el de menor densidad (8.57 Kg/m³). Los tratamientos presentaron diferencias significativas. La variación de oxígeno disuelto a lo largo del periodo experimental se encuentra en el Anexo 16 y graficada en la Figura 7, mientras que los datos de porcentaje de saturación están registrados en el Anexo 17.

Según Widanarni *et al.* (2012) y Luo *et al.* (2014), el nivel óptimo de oxígeno disuelto para un adecuado rendimiento de peces en cultivo biofloc es mayor a 6.00 mg/L y el porcentaje de saturación de oxígeno debe ser como mínimo de 75 % para que exista un adecuado intercambio gaseoso a nivel branquial y pueda realizarse procesos metabólicos. En SBF, Long *et al.* (2015) han reportado una menor concentración de oxígeno disuelto respecto de su grupo control con agua clara, sugiriendo que la alta respiración es causada por el consumo de bacterias heterotróficas y quimioautotróficas. En este estudio se ha reportado una relación inversamente proporcional entre la concentración de oxígeno disuelto y la densidad de cultivo. Resultados similares han sido hallados por Widanarni *et al.* (2012) y Lima *et al.* (2015). La disminución de oxígeno en función de la densidad es atribuida a un mayor consumo de oxígeno por parte de una mayor biomasa de peces y mayor biomasa bacteriana a causa de una mayor deposición de compuestos nitrogenados (Ebeling *et al.*, 2006). Sin embargo, la concentración de oxígeno disuelto en los tres tratamientos se encuentra dentro de los rangos aceptables para el cultivo de tilapia (Rakocy, 1989; Delong *et al.*, 2009; Venturoti *et al.*, 2015).

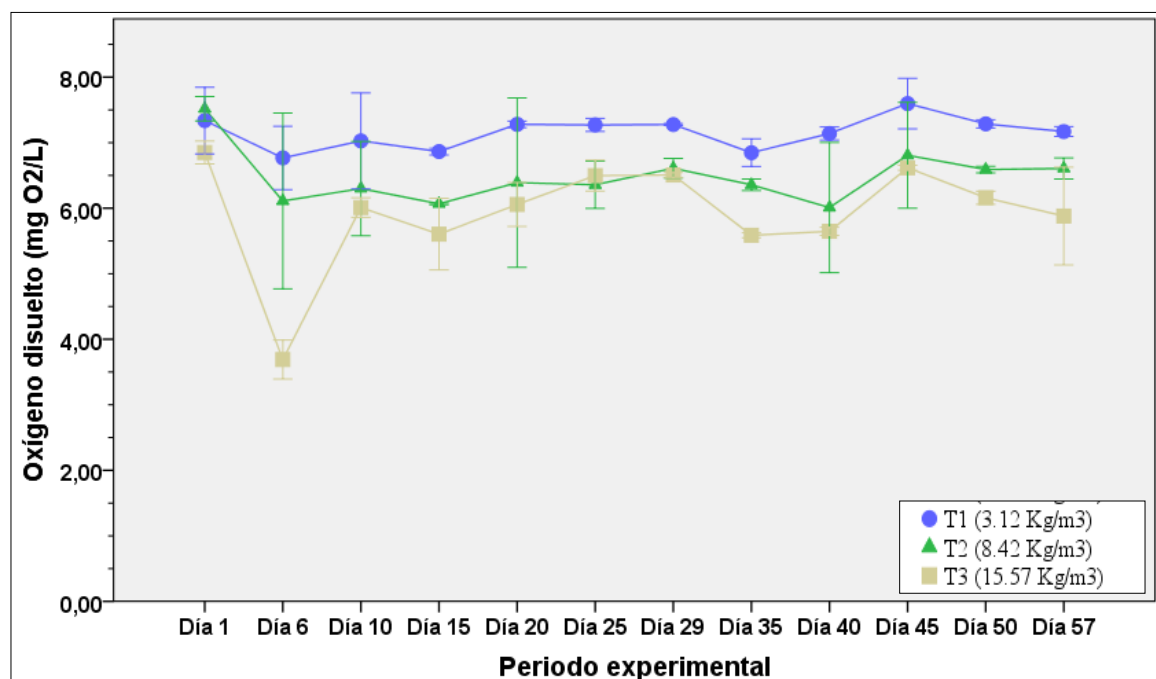


Figura 7: Variación de oxígeno disuelto (mg O₂/L) en el cultivo de tilapia en tres densidades.

La medición de conductividad presentó diferencias significativas entre los tres tratamientos. El tratamiento T1, con un promedio de conductividad de 5.49 ± 0.42 mS/cm no presentó diferencias significativas con el tratamiento T2, con 5.45 ± 0.42 mS/cm; mientras que ambos

fueron estadísticamente diferentes al tratamiento T3, con 5.77 ± 0.41 mS/cm (los datos están consignados en el Anexo 18); sin embargo, estos valores se encuentran fuera del rango reportado en la literatura (Figura 8). Venturoti *et al.* (2015) determinaron la conductividad eléctrica en un lago tropical usado para el cultivo de tilapia del Nilo en Brasil, siendo de 87.6 μ S/cm a 25.6 °C y 6.7 de pH, mientras Küçük *et al.* (2013) la determinó en 842.2 μ S/cm a 26 °C y 7.72 de pH. El elevado valor de conductividad en nuestra medición, puede estar asociado a la alta concentración de iones presentes en el agua de cultivo de biofloc, causado por el agua de subsuelo utilizado en el presente experimento. En este estudio no se midió la dureza del agua, sin embargo, se utilizó la conductividad porque la mide indirectamente, debido que detecta la presencia de iones en el agua de cultivo. Mejía (2014) ha reportado que la dureza del agua en la UNALM alcanza valores superiores a los 700 mg CaCO₃/L y que durante la implementación de los SBF, dicha dureza se incrementó hasta superar los 1400 mg CaCO₃/L, lo que se relaciona con los valores de conductividad detallados en la Tabla 12. Dentro de los pocos estudios en los que se realiza el monitoreo de la conductividad, Cavalcante *et al.* (2014) señalaron que la conductividad eléctrica máxima alcanzó 1567 μ S/cm, ocasionando un efecto sobre el rendimiento productivo de *Oreochromis niloticus*.

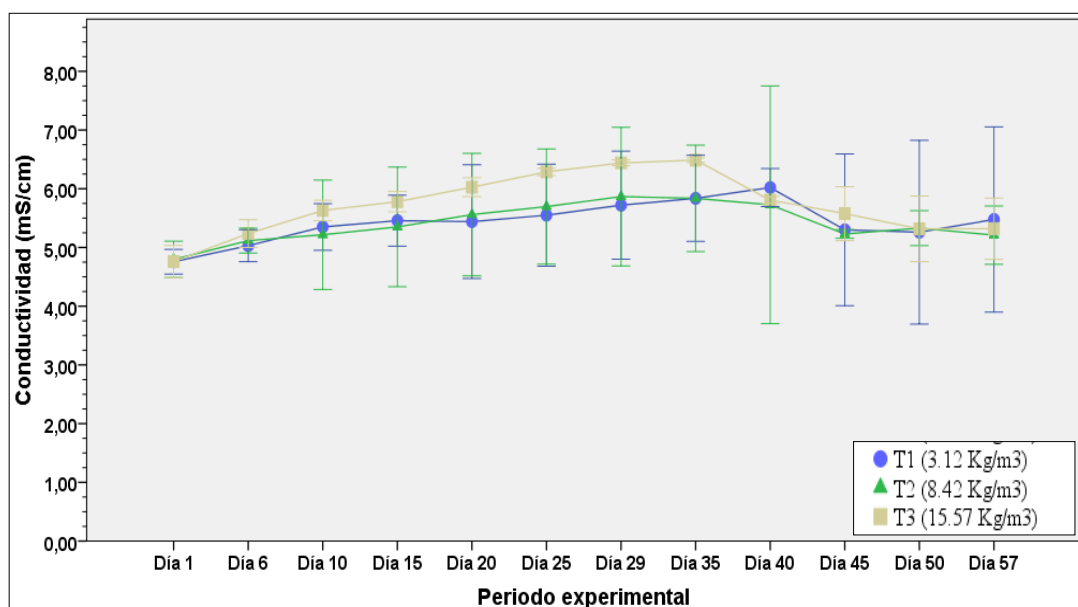


Figura 8: Variación de conductividad (mS/cm) en el cultivo de tilapia en tres densidades.

El volumen promedio para los sólidos sedimentables (SS) encontrados para los tratamientos T1, T2 y T3 fueron 36.24; 36.01 y 41.68 mL/L, respectivamente, donde T3 presentó diferencias significativas frente a T1 y T2 (las mediciones se encuentran en la Figura 9 y el registro de datos en el Anexo 19).

Para los tres tratamientos, existen variaciones a lo largo del periodo experimental, y en algunas mediciones los SS sobrepasan los límites recomendados en la literatura. Esto podría deberse a la mayor cantidad de desechos generados por día en el tratamiento con mayor densidad y a la mayor población de bacterias heterotróficas y quimioautotróficas que forman los flóculos, por lo que existe una tendencia a una mayor concentración de SS en un cultivo con alta densidad de siembra. La mayor concentración de SS no asegura el reciclaje de los compuestos nitrogenados, puesto que un desbalance en la cantidad de bacterias oxidadoras de amonio y nitrito podría incidir en la acumulación de éstos compuestos, afectando de ésta manera en el transporte de oxígeno en la sangre de los peces. Los resultados mostrados en este trabajo concuerdan con las recomendaciones de Hargreaves (2013), quien menciona que el volumen de sólidos sedimentables para el cultivo de tilapia debe ser mantenido entre 25 y 50 mL/L. De manera similar, Lima *et al.* (2015), también han reportado promedios de sólidos sedimentables que no sobrepasan de 30 mL/L en densidades de cultivo de hasta 45 peces por metro cúbico. Por el contrario, Widanarni *et al.* (2012) obtuvieron valores mayores a 100 mL/L en sus densidades de cultivo de 50 y 100 peces por metro cúbico.

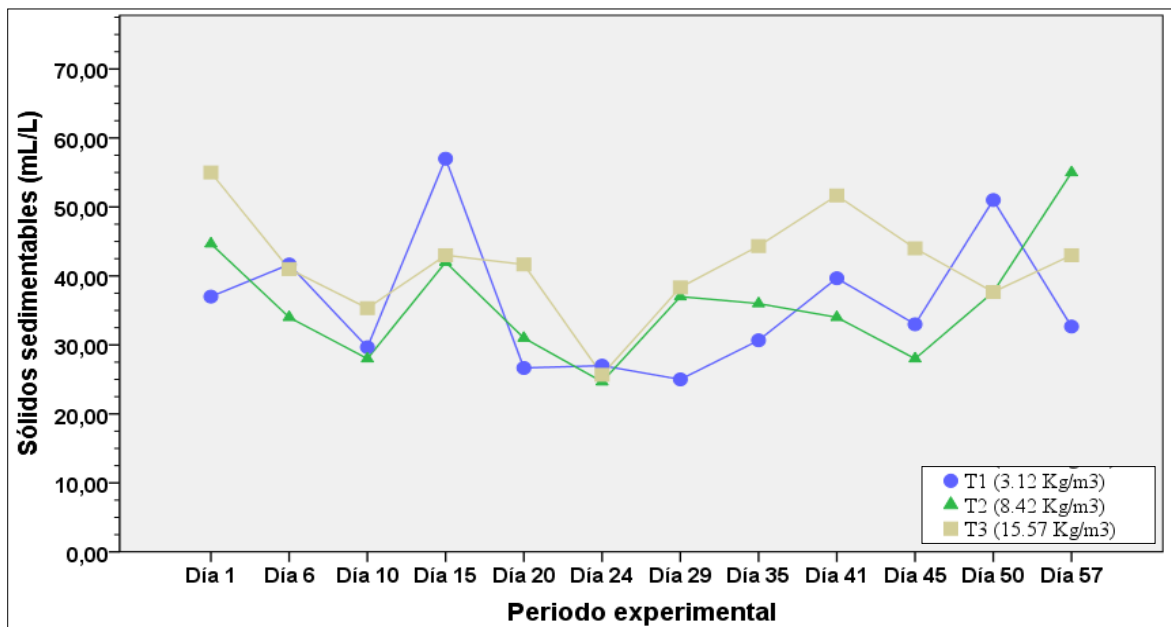


Figura 9: Variación de sólidos sedimentables (mL/L) en el cultivo de *Oreochromis niloticus* en SBF en tres densidades diferentes.

Las concentraciones de NAT y de nitratos (Anexo 20) presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos; en este estudio se ha reportado una relación directamente proporcional entre la concentración de NAT y nitratos con la densidad de cultivo.

Para el tratamiento con mayor densidad (T3) se obtuvo un promedio de 2.506 mg NAT/mL y 149.22 mg N-NO₃⁻; y el tratamiento con menor densidad (T1) obtuvo 1.368 mg NAT/mL y 120.48 mg N-NO₃⁻. La variación de la concentración de NAT durante el periodo experimental se encuentra graficada en la Figura 10, y de nitratos en la Figura 12. Según la Figura 10, la concentración de NAT permanece estable durante el periodo experimental, la estabilidad de la concentración de NAT en el SBF puede deberse a que el agua de cultivo ya está “madura”, lo que quiere decir que las poblaciones de bacterias heterotróficas y quimioautotróficas ya se encuentran adecuadamente establecidas (Ebeling *et al.*, 2006). La medición realizada el día 31, indica una elevada concentración de NAT, lo que podría deberse a una inhibición de los microorganismos oxidantes de amonio, dos días después de la extracción de sangre.

Un resultado similar al mostrado en este trabajo es el reportado por Widanarni *et al.* (2012), quienes trabajaron con densidades de cultivo de 2, 4 y 8 Kg/m³ en SBF para tilapia roja (*Oreochromis sp.*), y obtuvieron valores por debajo de 1.1 mg/L de NAT en todos sus tratamientos debido a la estabilidad de su SBF; por otra parte, Luo *et al.* (2014) reportaron niveles de NAT de 60 mg/L en los primeros días de cultivo de tilapia genéticamente mejorada (*Oreochromis niloticus* GIFT) a una densidad inicial de 8 Kg/m³, que luego disminuyó y se estabilizó en 20 mg/L por el establecimiento de las comunidades bacterianas degradadoras de compuestos nitrogenados.

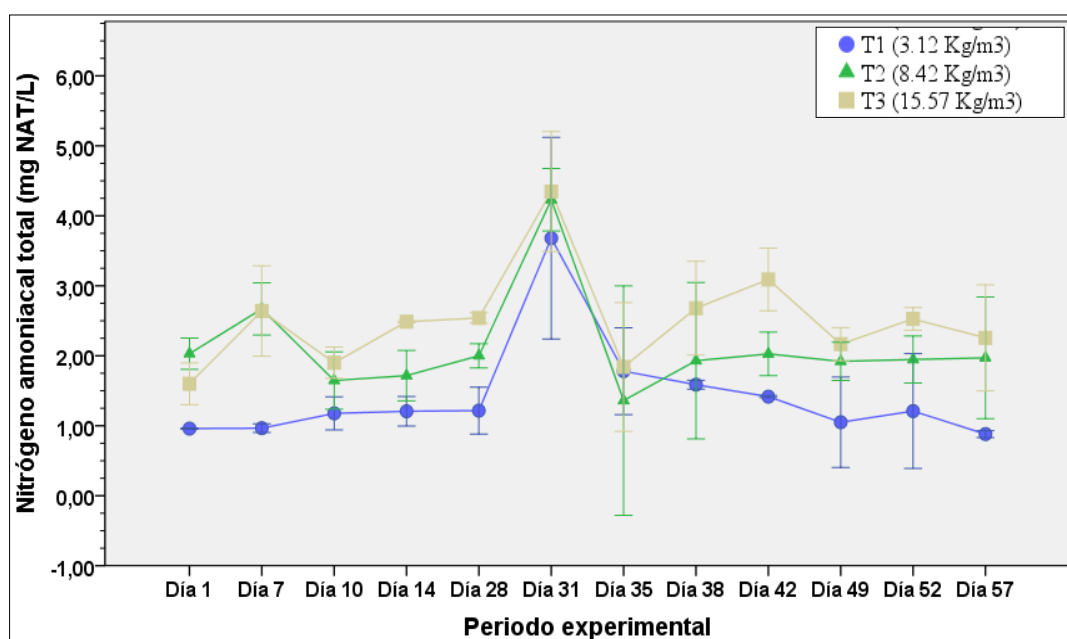


Figura 10: Fluctuación de nitrógeno amoniacal total (NAT) durante el periodo experimental para *Oreochromis niloticus* en tres densidades de cultivo.

Se registró diferencias significativas para el amoniaco (amonio no ionizado) entre todos los tratamientos. Según lo reportado por Rakocy (1989) y Venturotti *et al.* (2015), *Oreochromis niloticus* puede tolerar niveles de amoniaco que sean menores de 2 mg/L. La concentración de amoniaco presente en cada tratamiento es menor a 0.222 mg NH₃/L en todos los tratamientos (Figura 11), y a la vez, se encuentra por debajo del nivel de seguridad para tilapia (10 % del LC₅₀) que es igual a 0.24 mg/L (Sprague, 1971). La formación de amoniaco a partir del NAT está condicionada por la temperatura y el pH, debido a ello, se observó que T1 presentó la mayor concentración de amoniaco a causa de un mayor valor de pH en ese tratamiento, contrario a lo hallado en T3.

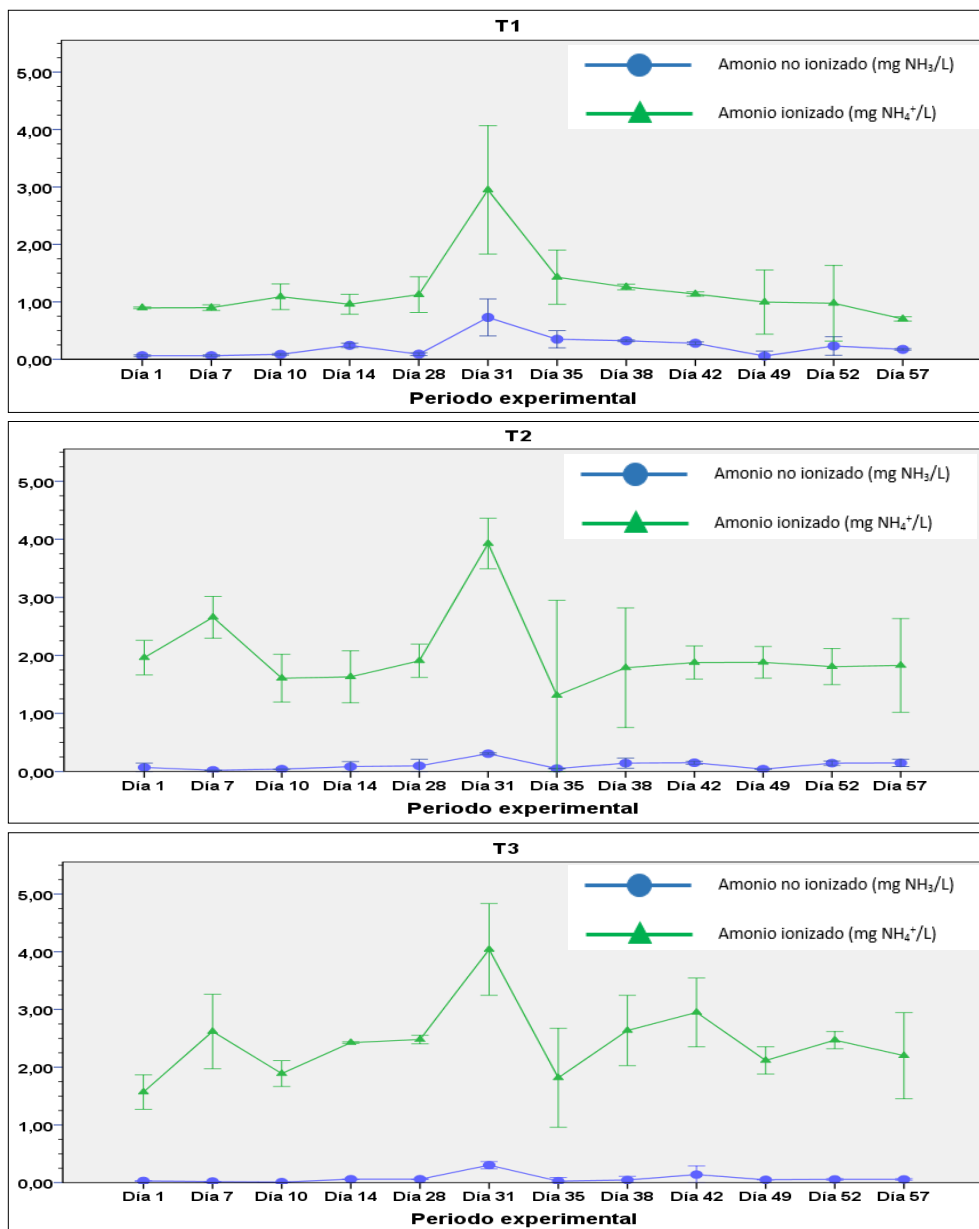


Figura 11: Fluctuación de Amonio ionizado (NH₄⁺) y amonio no ionizado (NH₃) por tratamiento, durante el periodo experimental para *Oreochromis niloticus*.

Según la Figura 12, la concentración de nitratos en el SBF, presenta variaciones durante el periodo experimental debido, posiblemente, a procesos de denitrificación que pueden convertir el nitrato en nitrógeno atmosférico (Van Rijn *et al.*, 2006) por la presencia de plancton. Durante el manejo del SBF, se evidenció que las características del agua de cultivo en T1 fue diferente al de T2 y T3.

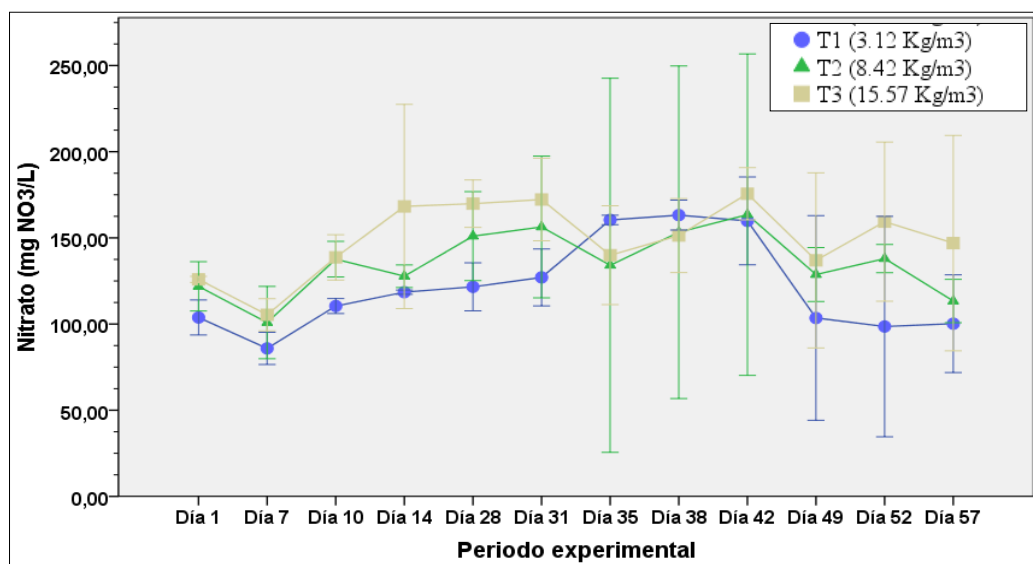


Figura 12: Fluctuación de nitrato durante el periodo experimental para *Oreochromis niloticus* en tres densidades de cultivo.

En T1, el agua presentó una tonalidad verde, lo que sugiere un sistema autotrófico y la presencia de fitoplancton fijador de nitratos, lo que en consecuencia podría disminuir la cantidad de nitratos; en cambio, en T2 y T3, el agua presentó una tonalidad marrón, lo que sugiere un sistema principalmente heterotrófico, con menor concentración de fitoplancton y mayor acumulación de nitrato.

El pH osciló entre 6.90 y 8.66 (Figura 13) (Anexo 21) y el promedio de pH presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos, siendo 8.18 ± 0.30 ; 7.69 ± 0.35 y 7.39 ± 0.44 para T1, T2 y T3, respectivamente. Los promedios registrados en este trabajo se encuentran dentro de los límites recomendados para el cultivo de tilapia (Popma y Lovshin, 1995; Delong *et al.*, 2009).

La alcalinidad total varió entre 30 y 150 mg CaCO₃/L (Figura 14) (Anexo 22), presentando diferencias significativas de T2 y T3 respecto a T1. Los promedios en la alcalinidad total

fueron de 99.62 ± 27.13 para T1, 81.67 ± 24.58 para T2 y 72.21 ± 25.26 para T3. Cabe señalar que hubo una pérdida de información entre el día 9 y 27. Para corregir y mantener la alcalinidad por encima de $100 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ fue necesario utilizar bicarbonato de sodio en los tres tratamientos.

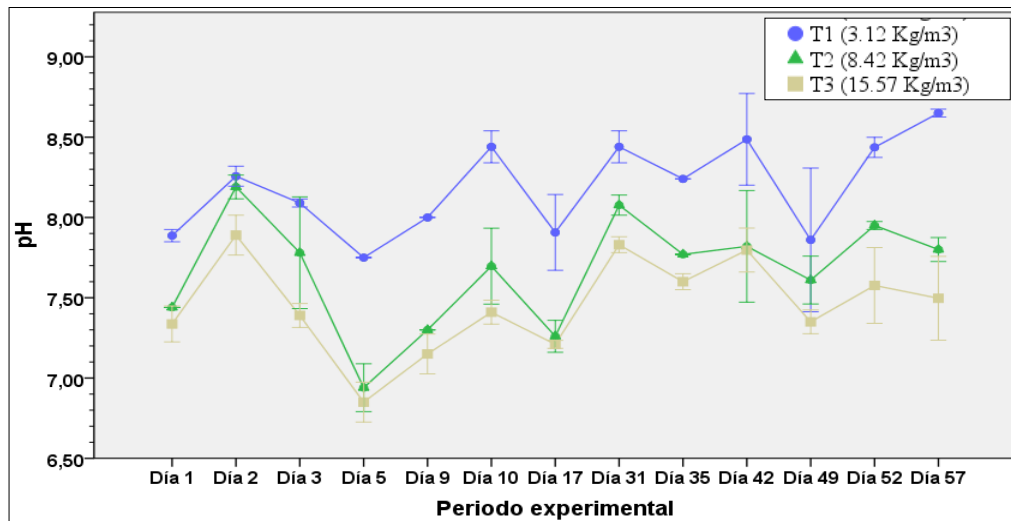


Figura 13: Fluctuación de pH durante el periodo experimental para *Oreochromis niloticus* en tres densidades de cultivo.

En T3 se evidenció una mayor reducción de la alcalinidad comparado a T2 y T1. El mayor consumo de alcalinidad en T3 puede ser debido a un mayor consumo de la fuente carbonada por parte de las bacterias heterotróficas en un sistema con limitado recambio de agua en un medio con mayor contenido de NAT, ya que según Ebeling *et al.* (2006), las bacterias heterotróficas necesitan 3.57 g de fuente de carbono por g NAT que van a transformar en proteína microbiana.

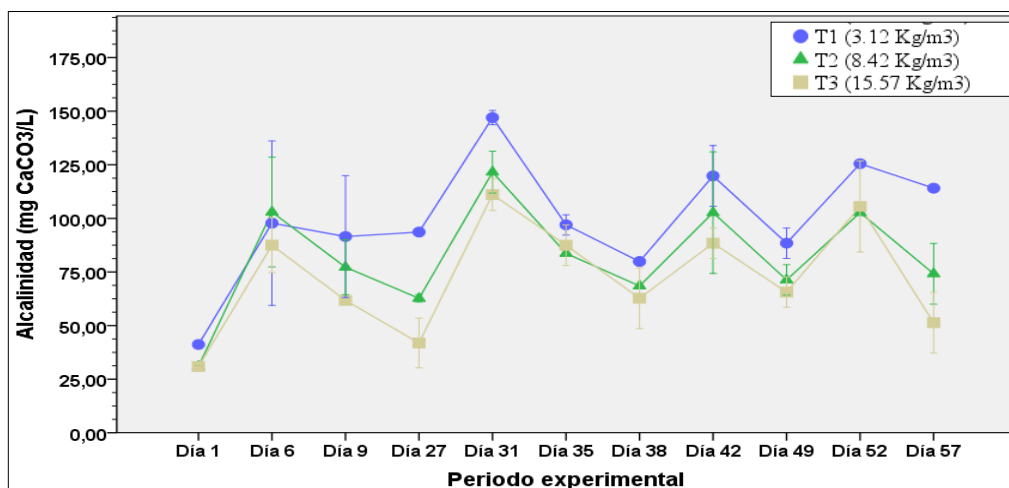


Figura 14: Fluctuación de alcalinidad durante el periodo experimental para *Oreochromis niloticus* en tres densidades de cultivo.

4.2. Determinación de parámetros bioquímicos

4.2.1. Determinación de cortisol

La concentración de cortisol fue tomada como un índice de estrés debido a que su aumento parece ser una respuesta generalizada a una variedad de estresores (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). Los datos promedio obtenidos sobre concentración de cortisol en suero sanguíneo se encuentran resumidas en la Tabla 17 (datos totales en el Anexo 24), en la cual se señala las mediciones realizadas al inicio, el día 29 y 57 del periodo experimental.

Tabla 17: Concentración de cortisol sanguíneo en *Oreochromis niloticus* en tres densidades de cultivo a través del periodo experimental.

Tratamiento	CORTISOL (ng/mL)			
	n	Día 1	Día 29	Día 57
T1 (3.12 Kg/m ³)	3	115.80 ± 43.13 ^{a,x}	33.24 ± 13.75 ^{a,y}	30.63 ± 8.39 ^{a,y}
T2 (8.42 Kg/m ³)	5	71.13 ± 41.56 ^{b,x}	67.66 ± 57.94 ^{a,x}	48.25 ± 20.66 ^{a,x}
T3 (15.57 Kg/m ³)	9	69.68 ± 26.44 ^{b,x}	49.75 ± 21.03 ^{a,y}	40.88 ± 23.99 ^{a,y}

Los datos se expresan en media ± desviación estándar. Superíndices distintos indican diferencia significativa (p<0.05). n: número de muestras por repetición en cada tratamiento. a y b indican diferencia significativa entre tratamientos. x e y indican diferencias significativas dentro del mismo tratamiento.

Al inicio del periodo experimental, se determinó una elevada concentración de cortisol en T1, valor que generó diferencias significativas respecto de T2 y T3 (Figura 15). Numéricamente, los tratamientos mostraron mayor concentración de cortisol que los valores reportados por Fontainhas-Fernandes *et al.* (2003) en condiciones de reposo para *Oreochromis niloticus*.

Los elevados niveles iniciales de cortisol en los tres tratamientos es un indicio de que los peces están estresados y que han sufrido probablemente un efecto por la manipulación y/o por la extracción (Auperin *et al.*, 1997), a pesar del cuidado en el manejo. Después de 28 días de experimentación, la concentración de cortisol disminuyó considerablemente para T1, en menor medida para T3, y T2 permaneció casi invariable, aun así, los tres tratamientos no presentan diferencias significativas. Al final del experimento se puede notar una mayor reducción en la concentración de cortisol en T2 respecto de la medición en el día 28. A su

vez, T1 y T3 también disminuyeron moderadamente, sin embargo, los resultados de concentración final de cortisol no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

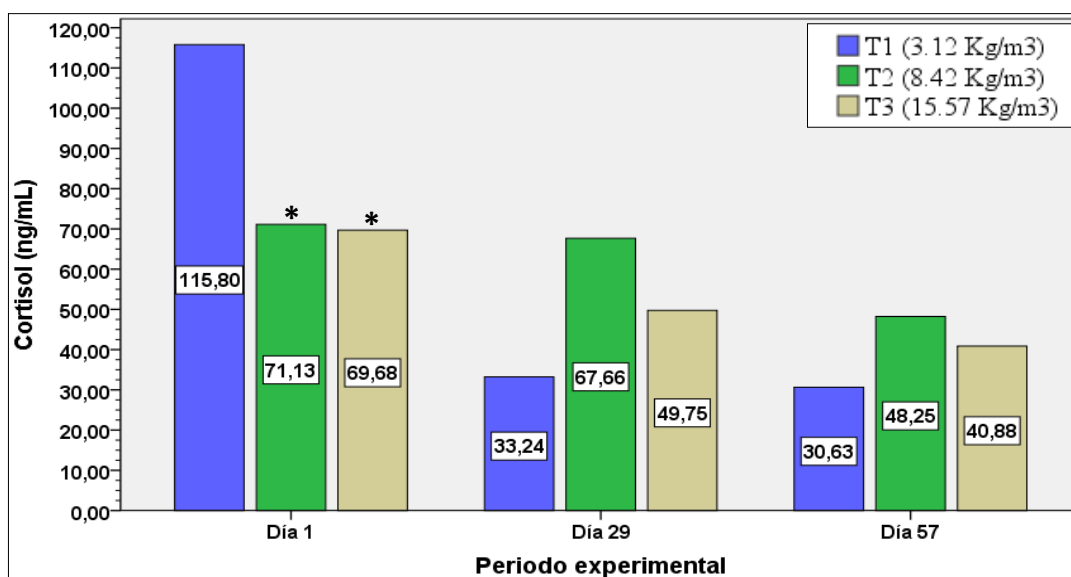


Figura 15: Variación de cortisol sérico en juveniles de *O. niloticus* en SBF al inicio (día 1), a la mitad (día 29) y final (día 57) en tres tratamientos.

Las condiciones ambientales y las densidades de cultivo iniciales en esta investigación podrían haber generado una respuesta inmediata de los peces, expresado en un incremento en la concentración de cortisol. El confinamiento al cual son expuestos los peces, es considerado un estresor crónico que permanece latente en el tiempo (Vijayan *et al.*, 1997), lo que puede generar una elevada concentración de cortisol que regula la actividad del eje HHI por retroalimentación negativa del hipotálamo con la finalidad de no exagerar la respuesta frente al estresor (Pickering y Pottinger, 1995; Wendelaar Bonga, 1997), y como consecuencia se reduce la síntesis de ACTH, por lo que el cortisol mantiene una tendencia a la baja en los tres tratamientos, expresado en las concentraciones señaladas en la Tabla 17 al final del experimento, lo que podría sugerir que los peces se adaptaron a dicho agente estresor. Probablemente éste mecanismo ocurre en situaciones de estrés crónico. Dicha retroalimentación negativa pudo haber ocurrido en todos los tratamientos, pero fue más notorio en T1 desde el inicio hasta el día 29 del periodo experimental, en el cual se observa una caída sustancial del nivel de cortisol. T2 y T3 tuvieron una moderada disminución de concentración de cortisol en el mismo lapso. Desde el día 29 hasta el día 57, la disminución fue moderada en los tres tratamientos (Figura 16).

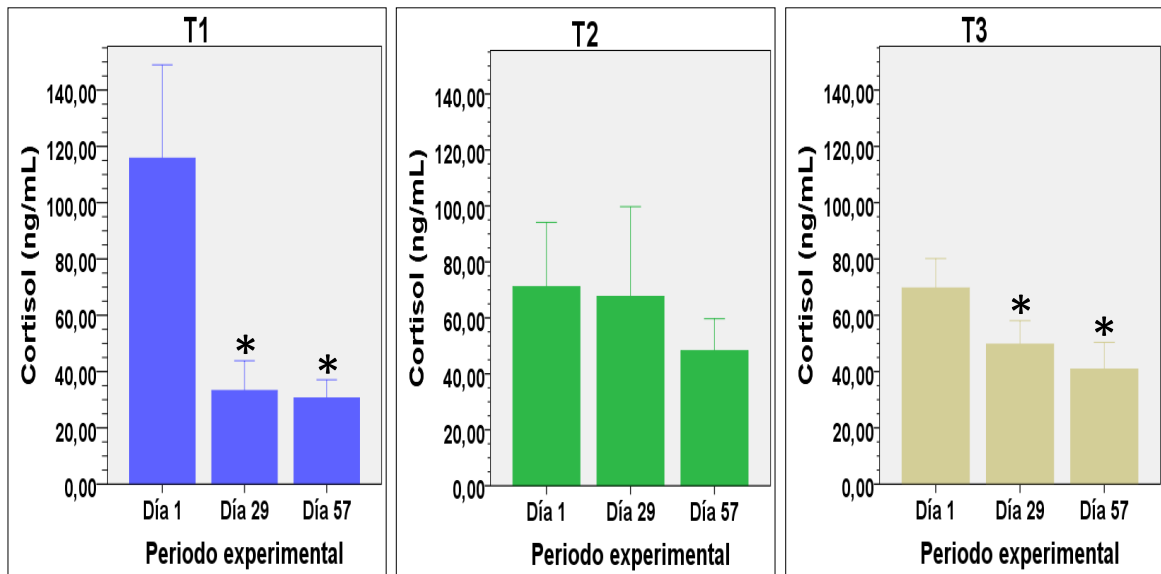


Figura 16: Variación temporal dentro de un mismo tratamiento para cortisol en juveniles de *O. niloticus* en SBF.

Los trabajos relacionados a estrés evalúan, por lo general, el efecto del agente estresor inmediatamente después de aplicar un estresor agudo. A diferencia de este trabajo que busca evaluar la dinámica del cortisol y la glucosa en un periodo de tiempo determinado en condiciones de cultivo que se asemejen a una producción intensiva en campo. Cabe indicar que se detectó una alta variabilidad individual sobre la concentración de cortisol en los tres tratamientos durante el periodo experimental, lo que probablemente se relacione con diferencias individuales de respuesta al estrés y a la posible aclimatación a condiciones de estrés crónico con una consecuente reducción del cortisol.

La reducción de cortisol en condiciones de confinamiento por un largo periodo de cultivo es un fenómeno que se ha demostrado muy poco en peces. Rotllant y Tort (1997) evaluaron la respuesta de *Pagrus pagrus* al exponerlo a un estresor agudo luego de estar expuesto a un estresor crónico por 23 días. Sus resultados muestran que el nivel de cortisol no tiene diferencia significativa después de exponerlo al estresor agudo. Los datos obtenidos en ésta investigación presentan resultados similares a los reportados por Barton *et al.*, (2005) en *Sparus aurata*, quienes sometieron a juveniles de la dorada a un confinamiento por 14 días y luego evaluaron su respuesta a un estresor agudo. Por otra parte, Vijayan y Leatherland (1988) obtuvieron resultados que alcanzan valores mayores de 150 ng/mL en *Salvelinus fontinalis*, Vijayan *et al.* (1997) obtuvieron un incremento de entre 3 a 5 veces el valor basal determinado para *Oreochromis mossambicus* cultivado en baja densidad. Vijayan y

Leatherland (1988) mencionan que los altos niveles de cortisol mantienen activo el metabolismo en bajas densidades de *Salvelinus fontinalis*, lo que favorece su crecimiento respecto de su cultivo en altas densidades, donde se determinó menores valores de cortisol, por lo que es probable que los diferentes niveles de cortisol reflejen la necesidad metabólica de los peces a diferentes ritmos de crecimiento. En este experimento, la mayor concentración de cortisol se registró en T2 y T3, y es justo en esos tratamientos donde se registró la mayor ganancia de peso y la mayor tasa de crecimiento específica, a diferencia de T1, que disminuyó su concentración de cortisol, y su crecimiento fue menor.

4.2.2. Determinación de glucosa

La concentración de glucosa fue tomada como una respuesta al estrés debido a que el cortisol presenta un efecto hiperglicemiante (Barton e Iwama, 1991; Van der Boon *et al.*, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). Los datos obtenidos sobre concentración de glucosa en suero sanguíneo se encuentran resumidos en la Tabla 18 (datos registrados en el Anexo 24), en la cual se señala las mediciones realizadas al inicio (día 1), a la mitad (día 29) y al final (día 57) del periodo experimental. Al comparar los tratamientos, no se presentó diferencias significativas entre tratamientos al inicio del periodo experimental, sin embargo, la concentración de glucosa fue mayor a los 39 mg/dL, según lo reportado por Silva *et al.* (2012) para *Oreochromis niloticus*.

Tabla 18: Concentración de glucosa sanguínea durante el experimento

Tratamiento	GLUCOSA (mg/dL)			
	n	Día 1	Día 29	Día 57
T1 (3.12 Kg/m ³)	3	63.59 ± 4.78 ^{a,x}	52.80 ± 7.61 ^{a,y}	53.01 ± 7.88 ^{a,y}
T2 (8.42 Kg/m ³)	5	57.60 ± 12.22 ^{a,x}	43.53 ± 10.17 ^{b,y}	34.43 ± 6.56 ^{b,z}
T3 (15.57 Kg/m ³)	9	62.14 ± 19.83 ^{a,x}	65.21 ± 15.48 ^{c,x}	47.58 ± 11.48 ^{a,y}

Los datos se expresan en media ± desviación estándar. n: número de muestras por repetición en cada tratamiento. Superíndices distintos indican diferencia significativa (p<0.05). a, b :indica diferencia significativa entre tratamientos. x, y, z: indica diferencia significativa dentro del mismo tratamiento.

En la figura 17 se observa que en el día 29 se reportó diferencias significativas entre los tres tratamientos. Al final del periodo experimental, T1 y T3 presentaron diferencias significativas frente a T2. Al evaluar la variación de glucosa por tratamiento, se puede notar

que T1 presentó diferencia significativa entre el valor de glucosa del día 1 y el día 29, mas no entre el día 29 y el día 57; en T2, la variación fue gradual y disminuyó en función del tiempo, con diferencias significativas entre el día 1 y el día 29 y a su vez, entre el día 29 y el día 57, T3 no presentó diferencias significativas entre el día 1 y el día 29, en cambio sí las presentó entre el día 29 y el día 57 (Figura 18).

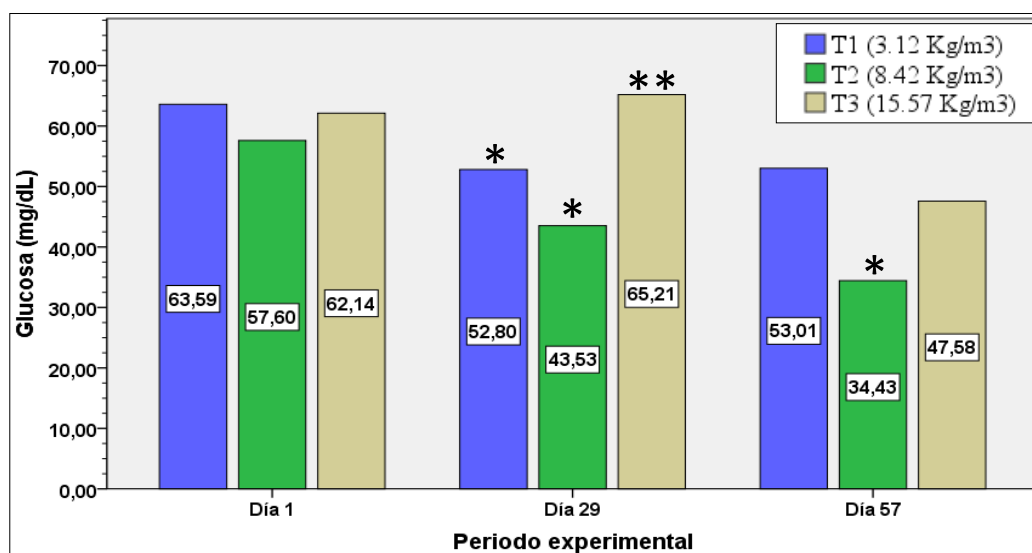


Figura 17: Variación de glucosa sérica en juveniles de *O. niloticus* en SBF al inicio (día 1), a la mitad (día 29) y final (día 57) en tres tratamientos.

Los requerimientos de energía que se necesitan para enfrentar el supuesto estado de estrés, probablemente se obtienen de fuentes corporales, lo que resulta en un bajo rendimiento y crecimiento, tal como muestran los resultados de este estudio en *Oreochromis niloticus* y los demostrados por Vijayan y Leatherland (1998) en *Salvelinus fontinalis*. Es probable que los diferentes niveles de cortisol reflejen la necesidad metabólica de los peces a diferentes ritmos de crecimiento más que a cualquier caso relacionado al estrés. Los resultados obtenidos durante el periodo de experimentación no son concluyentes. Se puede observar que los valores del nivel de cortisol en los tres tratamientos presentan tendencias a la baja; los niveles de glucosa son variables, aunque también tienen tendencias a la baja en los tratamientos con mayor densidad. Estos datos tienen relación con mayor ganancia de peso en los tratamientos con mayor densidad. Los resultados de este estudio indican que hubo un efecto en el metabolismo en los tres grupos experimentales. El crecimiento y el consumo de alimento representan una respuesta base a un estado metabólico alterado, lo que a nivel fisiológico puede ser representado por el elevado nivel de cortisol debido a la exposición crónica a la

densidad de cultivo. Dicha elevación mantiene a los peces en estado de alerta, lo que puede generar inapetencia, sugiriendo que este efecto sea una adaptación de los peces por el cual las reservas corporales sean canalizadas para propósitos de mantenimiento, reduciendo así el crecimiento (Vijayan y Leatherland, 1998).

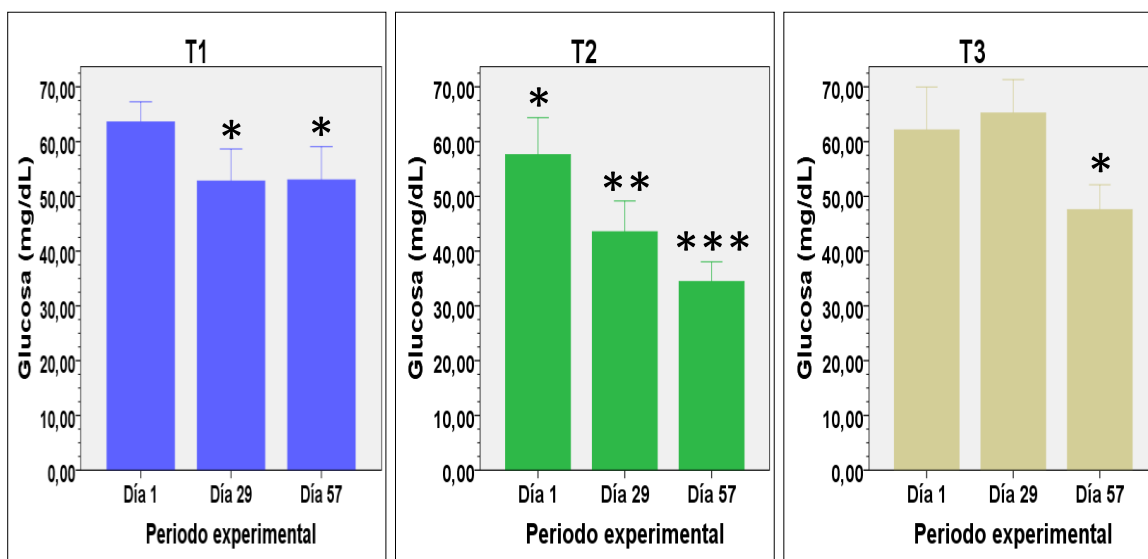


Figura 18: Variación temporal durante la fase experimental para glucosa sérica en juveniles de *O. niloticus* en SBF.

4.3. Determinación de parámetros hematológicos

La inducción por parte de un agente estresor para generar una respuesta primaria, tales como la liberación de catecolaminas y/o cortisol en sangre, genera un segundo nivel de respuesta fisiológica, el cual incluye una respuesta hematológica que puede ser utilizada como diagnóstico auxiliar para detectar variaciones producidas por agentes estresantes (Barton *et al.*, 2002; Clauss *et al.*, 2008). Los parámetros hematológicos obtenidos durante el periodo experimental, como la hemoglobina (Hb), el hematocrito (Hto), y el número de eritrocitos (RBC), se detallan en la Tabla 19 y en el Anexo 25. También se detallan los índices hematimétricos como el volumen corpuscular medio (VCM), la hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). Se comparó dichos parámetros entre tratamientos en el día 1, día 29 y día 57 del experimento. También se comparó la variación de los parámetros en el tiempo dentro de un mismo tratamiento. Al inicio del experimento, no se presentó diferencias significativas en ningún parámetro hematológico entre los tres tratamientos, sin embargo, T1 presentó una mayor concentración de Hb (Figura 19b) y mayor número de eritrocitos (Figura 19c), a diferencia de T2 y T3.

Tabla 19: Parámetros hematológicos e índices hematimétricos de juveniles de tilapia cultivadas en tres densidades diferentes en SBF

	Días de muestreo	Hb (g/dL)	Hto (%)	RBC (x 10 ⁶ /μL)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
T1 (3.12 Kg/m ³)	Día 1	9.42 ± 0.56 ^{a,x}	46.33 ± 1.32 ^{a,x}	2.48 ± 0.47 ^{a,x}	192.77 ± 36.60 ^{a,x}	39.26 ± 8.37 ^{a,x}	20.32 ± 1.04 ^{a,x}
	Día 29	7.39 ± 0.60 ^{a,y}	36.26 ± 6.89 ^{a,y}	2.19 ± 0.40 ^{a,x}	165.89 ± 21.11 ^{a,y}	34.26 ± 4.12 ^{a,x}	21.07 ± 4.79 ^{a,x}
	Día 56	5.79 ± 1.06 ^{a,z}	40.83 ± 7.38 ^{a,y}	2.02 ± 0.39 ^{a,x}	203.85 ± 22.19 ^{a,x}	29.17 ± 5.81 ^{a,y}	14.25 ± 1.85 ^{a,y}
T2 (8.42 Kg/m ³)	Día 1	8.93 ± 0.97 ^{a,x}	48.61 ± 9.06 ^{a,x}	2.44 ± 0.35 ^{a,x}	202.12 ± 45.06 ^{a,x}	37.14 ± 5.84 ^{a,x}	18.80 ± 3.62 ^{a,x}
	Día 29	5.94 ± 0.77 ^{b,y}	32.34 ± 3.65 ^{a,y}	1.60 ± 0.14 ^{b,y}	203.46 ± 35.26 ^{a,x}	36.99 ± 3.21 ^{ab,x}	18.63 ± 3.30 ^{a,x}
	Día 56	5.76 ± 0.99 ^{a,y}	35.10 ± 5.55 ^{ab,z}	1.50 ± 0.32 ^{b,y}	238.15 ± 38.78 ^{b,y}	39.49 ± 8.92 ^{b,x}	16.59 ± 2.65 ^{b,x}
T3 (15.57 Kg/m ³)	Día 1	8.72 ± 0.91 ^{a,x}	42.92 ± 7.98 ^{a,x}	2.36 ± 0.39 ^{a,x}	188.96 ± 55.49 ^{a,x}	37.79 ± 6.24 ^{a,x}	21.33 ± 5.99 ^{a,x}
	Día 29	6.26 ± 0.91 ^{b,y}	33.08 ± 6.02 ^{a,y}	1.60 ± 0.13 ^{b,y}	210.78 ± 44.29 ^{a,x}	39.80 ± 6.34 ^{b,x}	19.52 ± 4.63 ^{a,x}
	Día 56	5.51 ± 0.81 ^{a,z}	31.83 ± 6.51 ^{b,y}	1.71 ± 0.32 ^{ab,y}	192.93 ± 44.95 ^{a,x}	33.14 ± 4.80 ^{c,y}	17.87 ± 3.97 ^{b,x}

Hb: Hemoglobina; Hto: Hematocrito; RBC: Conteo de eritrocitos (Red Blood Cell, por sus siglas en inglés); VCM: Volumen corpuscular medio;

HCM: Hemoglobina corpuscular media; CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media.

Los datos se expresan en media ± desviación estándar. Superíndices distintos indican diferencia significativa (p<0.05).

a y b indican diferencia significativa entre tratamientos. x, y, z indican diferencias significativas dentro del mismo tratamiento

A su vez, T2 presentó mayor porcentaje de hematocrito (Figura 19a). La elevada concentración de hemoglobina, hematocrito y cantidad de eritrocitos podría deberse a una reacción fisiológica del pez frente a un ambiente con nuevas condiciones. En peces estresados, el Hto puede ser influenciado por la interacción de fluidos y por la liberación de eritrocitos desde el bazo (Gallaughier y Farrell, 1998), lo que ocasiona el aumento del volumen celular. El incremento del volumen celular es generado por una entrada de agua que hincha la célula, fenómeno llamado hemodilución, lo que sugiere que el aumento del volumen del eritrocito podría inducir a una mayor capacidad de transporte y afinidad por el oxígeno, con la condición de que también aumente la Hb (Walsh *et al.*, 1998), tal como sucede con *Konia dikume*, quien posee mayor número y volumen de eritrocitos, con alta concentración de Hb en sangre como forma de adaptación para el almacenamiento de oxígeno (Green *et al.*, 1973).

Los valores de Hb y RBC obtenidos al inicio de la experimentación de éste trabajo, se encuentran dentro de los rangos reportados para *O. niloticus* en condiciones de reposo (Ueda *et al.*, 1997; Hrubec *et al.*, 2000), además de ser los más altos respecto de la mitad y final del experimento, sin embargo, los valores de Hto obtenidos son mayores a los reportados en la literatura (Delbon, 2010; Mirea *et al.*, 2013). Dichos valores iniciales sugieren la respuesta del pez a las condiciones de las tres densidades de cultivo planteada.

Después de 29 días de experimentación, el porcentaje de Hto en los juveniles de tilapia de T1 fue mayor que T2, mientras que la concentración de Hb y el RBC permaneció elevada, respecto de T2 y T3, con los cuales presenta diferencias estadísticamente significativas en los tres parámetros mencionados anteriormente. Al final del experimento, T1 se mantiene con la mayor concentración de Hb, porcentaje de Hto y RBC. Se determinó diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de Hto sólo en T1 frente a T3. El RBC presentó diferencias significativas de T1 frente a T2. En el análisis realizado a los parámetros para un mismo tratamiento, los resultados muestran la disminución de la Hb, el Hto y el RBC a lo largo del periodo experimental hasta llegar a valores que se encuentran dentro de los límites reportados para la especie (Figura 20). Los niveles porcentuales de Hto presentan menor variación durante el experimento, a diferencia de la Hb y el RBC. Posiblemente, el nivel de hematocrito se mantenga en el tiempo por el aumento de la hidratación por acción de un agente estimulante permanente, que en este caso específico sería la densidad de cultivo.

Ésta hidratación genera mayor volumen eritrocitario, lo que aumenta el porcentaje de Hto, lo que podría modificar el valor del VCM. Una de las clasificaciones de las anemias se encuentra en función del tamaño de los eritrocitos, por lo que según Ranzani-Paiva *et al.* (2013), obtendríamos una anemia normocítica, la cual se caracteriza por permanecer en los límites de los rangos recomendados para una especie específica. Yarahmadi *et al.* (2014) indicaron que la elevada densidad de cultivo en *Oncorhynchus mykiss* causó un cuadro de estrés crónico, expresado en un aumento significativo de la Hb y el RBC; a su vez, Dai *et al.* (2011) reportan disminución de las variables hematológicas ocasionada por la densidad en el cultivo de *Clarias gariepinus*. Sin embargo, en otras especies como *Oncorhynchus clarki*, (Wagner *et al.*, 1997) u *O. mykiss* (Docan *et al.*, 2011) se reportó que el porcentaje de Hto no fue influenciado por la densidad de cultivo, lo que sugiere que la respuesta al agente estresor varíe según las condiciones ambientales y entre una especie a otra.

Long *et al.* (2015) reportaron elevado RBC en tilapias genéticamente mejoradas cultivadas en SBF, en una carga de cultivo de 3 Kg/m³ para un sistema intensivo, siendo de 1.99 x 10⁹ células/μL, muy distante de los valores iniciales determinados en éste trabajo (2.36 – 2.48 x 10⁶ células/μL) en los tres tratamientos. Por otra parte, Bittencourt *et al.* (2003) reportaron rangos de referencia para la Hb, el Hto y RBC en cultivos semiintensivos comerciales de *O. niloticus*, de los cuales, el RBC también son mayores que los resultados obtenidos en ésta investigación. Sin embargo, los valores de Hb y RBC determinados por Delbon (2010) en *O. niloticus* anestesiados con eugenol son similares a los presentados en la Tabla 11.

La disminución de los índices hematológicos en el tiempo puede deberse a la aclimatación de los peces a su medioambiente. La disminución de Hb podría deberse a la reducción del tiempo de vida de los eritrocitos o a la supresión de la actividad eritropoyética del bazo (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013). La disminución de la Hb dentro de los rangos no patológicos está asociada a la llamada anemia normocrómica. De acuerdo con Alkaladi *et al.* (2015), este tipo de anemia no afecta la tasa de crecimiento de *O. niloticus* en esta investigación, como se puede notar en los últimos 15 días de experimentación. El VCM, la HCM y la CHCM no presentaron diferencias significativas entre tratamientos al inicio del experimento. A los 29 días, se presentó diferencias significativas en la HCM entre T1 y T3. A los 57 días, el VCM de T1 y T3 presentó diferencias significativas a T2, mientras que en la HCM fue significativa en los tres tratamientos. La CHCM presentó diferencias de T1 frente a T2 y T3.

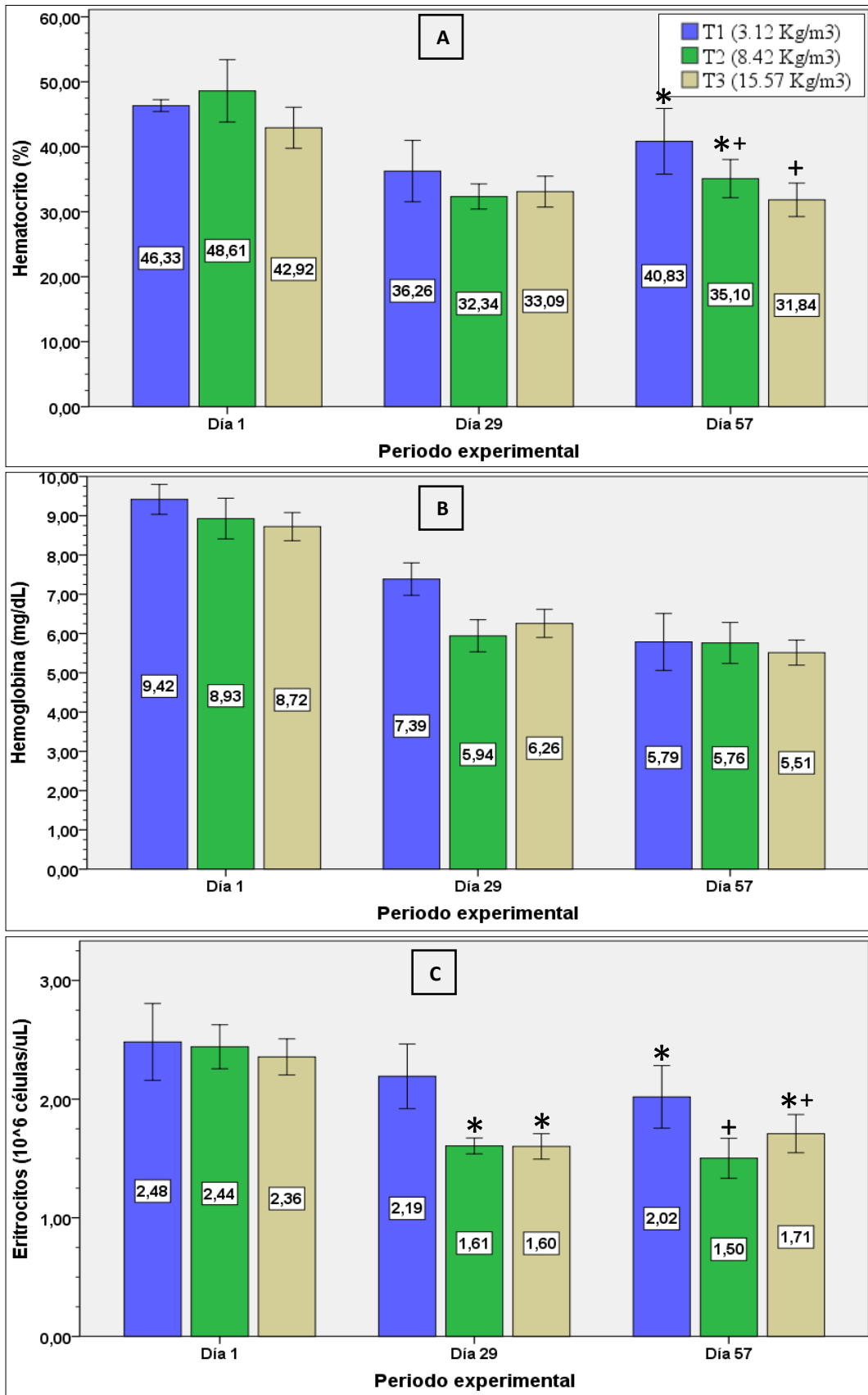


Figura 19: Cambios en las variables hematológicas durante el periodo experimental para juveniles de *O. niloticus* en SBF. (A) Hematocrito, (B) Hemoglobina, (C) número de eritrocitos.

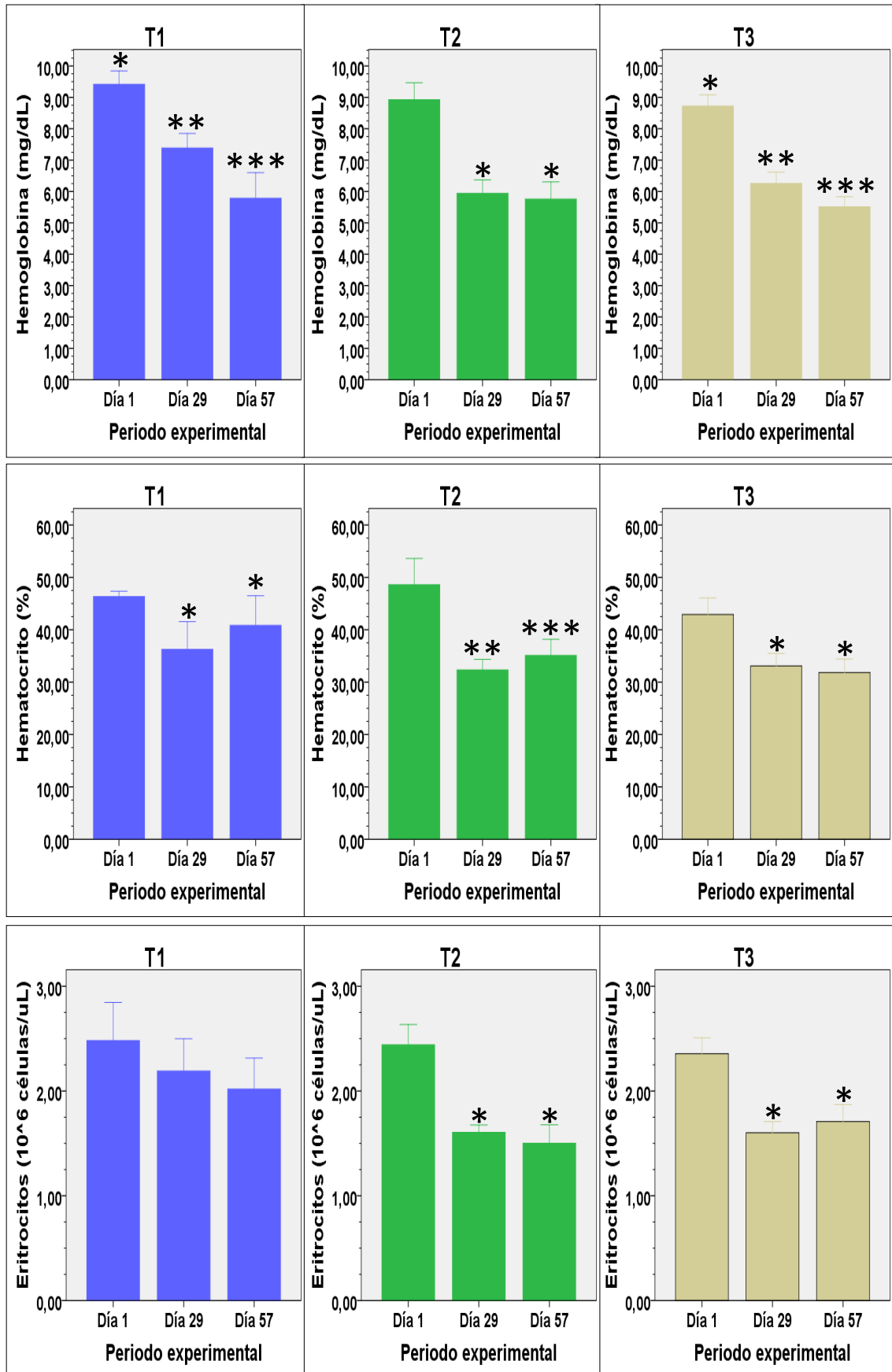


Figura 20: Variación temporal dentro de un mismo tratamiento para hemoglobina, hematocrito y número de eritrocitos para juveniles de *O. niloticus* en SBF.

4.4. Evaluación de los parámetros productivos

Los parámetros productivos se muestran en la Tabla 20 y en el Anexo 23. Se puede observar que la carga final en T1 fue de 3.43 Kg/m³; en T2 fue de 10.04 Kg/m³; mientras que la carga final en T3 fue de 17.91 Kg/m³. Con base en estos resultados, se determinó que existen diferencias significativas entre los tres tratamientos ($P < 0.05$), siendo T3 el que obtuvo mayor carga final. Los resultados obtenidos tienen concordancia con lo descrito por Chakraborty y Banerjee (2010), quienes obtuvieron la mayor carga final en un cultivo de alevines de *O. niloticus* en un sistema de cultivo con tanques excavados, con una densidad de cultivo de 20000/ha en comparación a densidades de 5000/ha y 30000/ha. Sin embargo, Osofero *et al.* (2009), en un cultivo en jaulas, obtuvieron diferencias significativas entre sus cuatro densidades de cultivo, donde la menor densidad de cultivo (50 peces/jaula) obtuvo mayor carga final que los cultivos con mayor densidad (200 peces/jaula) en *Oreochromis niloticus*.

Tabla 20: Desempeño productivo de tilapias cultivadas en SBF a diferentes densidades.

	Unidades	TRATAMIENTOS		
		T1 (3.12Kg/m ³)	T2 (8.42Kg/m ³)	T3 (15.57Kg/m ³)
Peso individual inicial	g	86.63 ± 1.02 ^a	90.26 ± 2.68 ^a	89.82 ± 2.40 ^a
Carga inicial	Kg/m ³	3.12 ± 0.04 ^a	8.42 ± 0.06 ^b	15.57 ± 0.32 ^c
Peso individual final	g	95.56 ± 3.50 ^a	109.13 ± 4.62 ^b	107.43 ± 2.33 ^b
Carga final	Kg/m ³	3.43 ± 0.15 ^a	10.04 ± 0.30 ^b	17.91 ± 0.61 ^c
Ganancia de peso	%	14.41 ± 4.41 ^a	21.63 ± 0.24 ^a	21.48 ± 3.19 ^a
Tasa de crecimiento específica	%/día	0.24 ± 0.069 ^a	0.35 ± 0.004 ^a	0.35 ± 0.047 ^a
Sobrevivencia	%	96.30 ± 6.41 ^a	98.61 ± 2.41 ^a	96.15 ± 1.31 ^a

Los datos se expresan en media ± desviación estándar. Superíndices distintos indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Diversos estudios han mencionado los beneficios del cultivo en SBF sobre diferentes especies, tales como *Oreochromis niloticus* (Azim y Little, 2008; Luo *et al.*, 2014; Long *et al.*, 2015), *Litopenaeus vannamei* (Krummenauer *et al.*, 2012) y *Carassius auratus* (Wang *et al.*, 2015), en los cuales se ha alcanzado gran rendimiento productivo expresado en mayor ganancia de peso y mayor peso individual, en comparación con otros sistemas de cultivo.

Uno de estos estudios es el que reportan Luo *et al.* (2014), quienes logran gran productividad de *Oreochromis niloticus* mejorada genéticamente en SBF, llevando la producción de 8.06 a 44.95 Kg/m³ en un cultivo de 86 días. La elevada densidad causa la acumulación de compuestos nitrogenados en el sistema los primeros veinte días de cultivo, periodo que correspondería a la estabilización de la microbiota presente en el sistema. En comparación con este experimento, el promedio de concentración de NAT en los tres tratamientos fue menor de 3 mg/L, debido a que se trabajó con un SBF maduro de un trabajo previo, con la microbiota estabilizada y una eficiencia aparente de la inmovilización del nitrógeno.

En la Tabla 21 y la Figura 21 se observa que el promedio de peso individual final en T1 fue de 95.56 ± 3.50 g; en T2 fue de 109.13 ± 4.62 g; mientras que en T3 alcanzó 107.45 ± 2.33 g. Con base en estos resultados, se determinó que existen diferencias significativas en el promedio de peso final de T2 y T3 respecto de T1. Según lo mencionado por Avnimelech (1999), los cultivos de tilapia y camarones en SBF presentan un mayor desempeño productivo. Long *et al.* (2015) evaluaron el efecto del biofloc sobre el crecimiento y bienestar de juveniles de 50 g de *Oreochromis niloticus* mejorada genéticamente donde obtuvieron peces con peso promedio de 160 g y una carga final de 6.31 Kg/m³ durante un experimento de 8 semanas, y señalaron que hubo un aporte del consumo del floc sobre el crecimiento de las tilapias al compararlas con un cultivo en sistema de recirculación. A su vez, Cedano-Castro *et al.* (2013), obtuvieron con *Oreochromis niloticus* Variedad Chitralada en SBF, una carga final de 11.2 Kg/m³ y peso final de 826.5 g, a partir de 1.72 Kg/m³ y 110.2 g de peso inicial. El aumento en el peso final individual logrado en estos estudios puede responder al consumo de la proteína microbiana generada por la microbiota del agua de cultivo y por el mantenimiento de la calidad del agua, lo que demuestra que el uso del SBF puede ser una buena alternativa para lograr una adecuada productividad. En este estudio se ha demostrado que el SBF mantiene las características óptimas de calidad de agua, pero se desconoce si hay un aporte real de los flóculos sobre el crecimiento de las tilapias.

Los resultados de Suresh y Lin (1992) en sistemas de recirculación indican que la ganancia de peso diario fue de 0.64 g/pez/día en una densidad de cultivo de 200 peces/m³, a diferencia de 0.77 g/pez/día en 50 peces/m³. También, Widanarni *et al.* (2012) en SBF obtuvieron una ganancia de peso de 114.88 g/pez en una densidad de 25 peces/m³, mientras que en el tratamiento con 100 peces, sólo obtuvo 51.35 g/pez de ganancia, lo que podría sugerir que a

mayor densidad de cultivo existe una menor ganancia de peso, concluyendo que los peces presentan mayor crecimiento en bajas densidades de cultivo. Sin embargo, los resultados alcanzados por Lima *et al.* (2015) en un estudio con *Oreochromis niloticus* en densidades de cultivo de 1.85, 3.69 y 5.54 Kg/m³ en SBF, concluyen que el mejor rendimiento lo obtuvieron en el tratamiento con mayor densidad, logrando un peso final de 404 g y una ganancia de peso de 281 g durante 128 días de cultivo, tendencia similar a T3, que alcanzó 107.43 g y una ganancia de peso de 21.48 %/día en 57 días de cultivo. Los resultados de este experimento muestran resultados de rendimiento similares a Lima *et al.* (2015) con T3, lo que sugiere que las densidades de cultivo utilizadas en este experimento presentan una influencia positiva en la ganancia de peso.

Tabla 21: Peso promedio de juveniles de tilapia tomados cada 15 días.

Tratamientos	Peso promedio (g)				
	Día 1	Día 15	Día 29	Día 43	Día 57
T1 (3.12 Kg/m ³)	86.64 ± 1.03	91.93 ± 0.57	87.96 ± 0.13	89.94 ± 1.11	95.56 ± 3.50
T2 (8.42 Kg/m ³)	89.90 ± 2.53	95.73 ± 0.83	97.25 ± 4.12	100.22 ± 5.06	109.13 ± 3.27
T3 (15.57 Kg/m ³)	88.47 ± 0.41	94.53 ± 0.13	93.78 ± 0.02	96.99 ± 1.06	107.43 ± 2.33

Para T1, la ganancia de peso fue de 14.41 %, la tasa de crecimiento específica de 0.24 %/día, en T2, la ganancia de peso fue de 21.63 %, la tasa de crecimiento específica de 0.35 %/día; mientras que en T3 la ganancia de peso fue de 21.48 %, la tasa de crecimiento específica de 0.35 %/día. No se determinó diferencias significativas en la ganancia de peso y la tasa de crecimiento específica. En este experimento, la mayor ganancia de peso y la mayor tasa de crecimiento específica se obtuvieron en T2, similar a lo reportado por Chakraborty y Banerjee (2010) y Alam *et al.* (2014).

En este experimento, se obtuvo altas sobrevivencias, mayores al 95 % en los tres tratamientos. Chakraborty y Banerjee (2010), en un sistema de cultivo convencional, han reportado que la sobrevivencia se ve afectada negativamente por una mayor densidad de cultivo, sin embargo, los resultados de este estudio son similares a lo reportado por Osofero *et al.* (2009) en un cultivo en jaulas, mientras que Azim y Little (2008), Widanarni *et al.* (2012) y Lima *et al.* (2015) reportaron sobrevivencias mayores a 93 % en cultivo en SBF

para diferentes densidades de siembra de *O. niloticus*. La alta sobrevivencia obtenida en los tres tratamientos de este experimento puede ser debida al adecuado mantenimiento de los parámetros de calidad de agua debido a la acción del biofloc y su actividad inmovilizadora del nitrógeno, aunque Luo *et al.* (2014) no reportaron mortalidad asociada al cultivo cuando sus niveles de NAT y nitritos excedieron los límites recomendados, sugiriendo que las tilapias pueden sobrevivir en condiciones adversas.

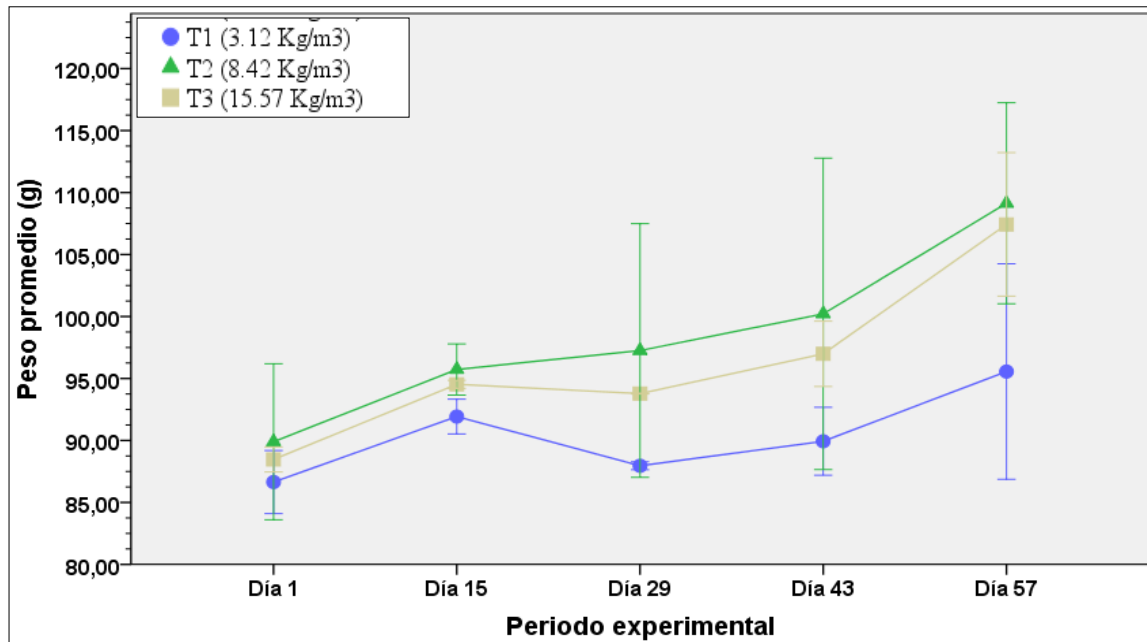


Figura 21: Crecimiento de *Oreochromis niloticus* en tres densidades de cultivo.

V. CONCLUSIONES

- Las tilapias presentan un cuadro de estrés, que se expresa en una elevada concentración de cortisol al inicio del experimento. Con el transcurrir de los días, las tilapias sometidas al tratamiento con menor densidad disminuyeron considerablemente el nivel de cortisol en sangre, mientras que los otros dos tratamientos presentaron una ligera disminución. En 57 días de cultivo, los peces pueden adaptarse a las condiciones de cultivo al disminuir los niveles de cortisol y mantener un elevado porcentaje de sobrevivencia.
- No se determinó valores anormales de glucosa, lo que indica que no hubo efecto hiperglicemiante del cortisol.
- Todas las variables hematológicas mostraron valores elevados al inicio del experimento, lo que sugirió un aumento de la capacidad de transportar oxígeno al cuerpo, expresados por el aumento del número de eritrocitos, del porcentaje de hematocrito y por el aumento de la hemoglobina. Las variables hematológicas mostraron variaciones en el transcurso del experimento, siendo significativas las diferencias en un mismo tratamiento para los niveles de hematocrito, hemoglobina y eritrocitos en los tres tratamientos.
- En el SBF, se demostró que el tratamiento 2 (8.42 Kg/m^3) tuvo mejor rendimiento productivo, ya que alcanzó mayor tasa de crecimiento específica, ganancia de peso y mayor sobrevivencia; además, a nivel de parámetros bioquímicos, no se ha evidenciado un efecto marcado de la densidad, expresado en un nivel moderado de cortisol y glucosa. A nivel hematológico, los resultados sugieren que el estado sanitario es adecuado, al mantener niveles de Hb, Hto y RBC dentro de lo reportado en la literatura.

VI. RECOMENDACIONES

Evaluar parámetros inmunológicos, tanto innatos como adquiridos, a nivel de formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), actividad de macrófagos; actividad de lisozima, capacidad hemolítica del complemento, y de detección de anticuerpos en el mucus y de interleucinas en suero sanguíneo. A su vez, se recomienda hacer un perfil total de proteínas en suero.

Se recomienda que los siguientes trabajos se enfoquen a la selección de organismos fenotípicamente resistentes a diferentes estresores para posteriormente obtener una progenie que pueda tolerar mayores densidades que las planteadas en este trabajo.

Para la evaluación de estresores crónicos de larga duración, se recomienda la extracción de sangre al inicio y al final del periodo experimental o, al inicio y en el momento que el investigador detecte que los peces presenten crecimiento retardado, conductas anormales o muerte.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abu Bakar, NS; Nasir, NM; Lananan, F; Hamid, SHA; Lam, SS, Jusoh, A. 2015. Optimization of C/N ratios for nutrient removal in aquaculture system culturing African catfish, (*Clarias gariepinus*) utilizing Bioflocs Technology. International Biodeterioration & Biodegradation. 102: 100–106.

Adams, SM; Shepard, KL; Greeley Junior, MS; Jiménez, BD; Ryon, MG; Shugart LR; McCarthy, JF. 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. Marine Experimental Research 28: 459–464

Adamu, M; Audu, S. 2008. Haematological assessment of the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to sublethal concentrations of Portland Cement Powder in solution. International Journal of Zoological Research 4(1): 48–52.

Alam MB; Islam, MA; Marine, SS; Rashid, A; Hossain, MA; Rashid, H. 2014. Growth performances of gift tilapia (*oreochromisniloticus*) in cage culture at the old Brahmaputra river using different densities. J. SylhetAgril. Univ. 1 (2): 265–271.

Alkaladi, A; El-Deen, NAMN; Afifi, M; Zinadah, OAA. 2015. Hematological and biochemical investigations on the effect of vitamin E and C on *Oreochromis niloticus* exposed to zinc oxide nanoparticles. Saudi Journal of Biological Sciences. 22: 556–563.

Allen, P. 1994. Changes in the haematological profile of the cichlid *Oreochromis aureus* (Steindachner) during acute inorganic mercury intoxication. Comp. Biochem. Physiol. 108 (1): 117–121.

APHA (American Public Health Association, USA). 1998. Estándar methods for the examination of the water and wastewater. 22ed. Washington, USA.

Auperin, B; Baroiller, JF; Ricordel, MJ; Fostier, A; Prunet, P. 1997. Effect of confinement stress on circulating levels of growth hormone and two prolactins in freshwater-adapted tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology* 108: 35–44.

Auro, A; Ocampo, L. 1999. Diagnóstico del estrés en peces. *Vet. Mex.* 30 (4): 337–344.

Avnimelech, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176: 227–235

Avnimelech, Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264: 140–147.

Avnimelech, Y; Verdegem, MCJ; Kurup, M; Keshavanath, P. 2008. Sustainable land-based Aquaculture: Rational utilization of water, land and feed resources.

Avnimelech, Y; Kochba, M. 2009. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in bio floc tank using ¹⁵N tracing. *Aquaculture* 287: 163–168.

Azim, ME; Little, DC; Bron, JE. 2008. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C:N ratio in feed and the implications for fish culture. *Bioresource Technology* 99: 3590–3599.

Badawi, HK; Said, MM. 1971. A comparative study of the blood of four *Tilapia* species (Pisces). *Marine Biology* 8: 202–204.

Baltazar, PM. 2007. La tilapia en el Perú: acuicultura, mercado y perspectivas. *Rev. peru. biol.* 13 (3): 267–273.

Barcellos, LJG; Nicolaiewsky, S; Souza, SMG; Lulhier, F. 1999. The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquaculture Research* 30: 887–892.

Barton, BA; Iwama, GK. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Rev. of Fish Disease.* 3–26.

- Barton, BA. 2002. Stress in fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integ. And Comp. Biol.* 42: 517–525.
- Barton, BA, Ribas, L; Acerete, L; Tort, L. 2005. Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. *Aquaculture Research*. 36: 172–179.
- Bernier NJ; Peter, RE. 2001. The hypothalamic_pituitary_interrenal axis and the control of food intake in teleost fish *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 129: 639–644.
- Bittencourt, NdeLR; Molinari, LM; Scoaris, DdeO; Pedroso, RB; Nakamura CV; Ueda-Nakamura, T; Filho, BAdeA; Filho, BPD. 2003. Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 25: 385–389.
- Blaxhall, PC; Daisley, KW. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Bid.* 5: 771–781.
- Botaro, D; Furuya, WM, Silva, LCR; Santos, LD dos, Silva, TS; Santos, VG dos. 2007. Redução da proteína da dieta com base no conceito de proteína ideal para tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. *R. Bras. Zootec.* 36 (3): 517–525.
- Breves, JP; Hirano, T; Grau, EG. 2014. Ionoregulatory and endocrine responses to disturbed salt and water balance in Mozambique tilapia exposed to confinement and handling stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 155: 294–300.
- Cavalcante, D; Caldini, NN; Silva, JLS; Santos Lima, FR; Sá, MV. 2014. Imbalances in the hardness/alkalinity ratio of water and Nile tilapia's growth performance. *Acta Scientiarum Technology*. 36 (1): 49–54.
- Cavalcante, DH; Sá, MVC. 2010. Efeito da fotossíntese na alcalinidade da água de cultivo da tilápia do Nilo. *Revista Ciência Agronômica*, 41 (1): 67–72.

Chakraborty, SB; Banerjee, S. 2010. Effect of Stocking Density on Monosex Nile Tilapia Growth during Pond Culture in India. World Academy of Science, Engineering and Technology. 44: 1521–1525.

Clauss, TM; Dove, ADM; Arnold, JE. 2008. Hematologic Disorders of Fish. Vet Clin Exot Anim 11: 445–462.

Crab, R; Kochva, M; Verstraete, W; Avnimelech, Y. 2009. Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. Aquacultural engineering. 40: 105–112.

Crab, R; Defoirdt, T; Bossier, P; Verstraete, W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. Aquaculture 356-357: 351–356.

Cedano-Castro, MD; Lujan-Bulnes, A; Suárez, H. 2013. Crianza de *Oreochromis niloticus* Var chitralada en sistema bio-floc en la empresa Produmar S.A., Guayaquil (Ecuador). Rebiolest 1 (2): 79–91.

Dai, W; Wang, X; Guo1, Y; Wang, Q; Ma, J. 2011. Growth performance, hematological and biochemical responses of African catfish (*Clarias gariepinus*) reared at different stocking densities. African Journal of Agricultural Research 6 (28): 6177–6182.

De Schryver, P; Crab, R; Defoirdt, T; Boon, N; Verstraete, W. 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. Aquaculture 277: 125–137.

Delbon, MC. 2010. Análises cromatográficas e parâmetros hematológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus*, anestesiadas com eugenol em condicoes laboratoriais e de transporte. Doutor em Aquicultura tesis. Jaboticabal, Sao Paulo, Brasil, Universidad Estadual Paulista. 115 p.

Delong, DP; Losordo, TM; Rakocy, JE. 2009. Tank Culture of Tilapia. Southern regional aquaculture center (SRAC). N° 282.

Deriggi, GF; Inoue, LAK; Moraes, G. 2006. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 28 (3): 269–274.

Díaz, M; Alva, R; Veneros, B; Dávila, F; Luján, A; Plasencia, W; Mendoza, F. 2012. Cultivo semi intensivo de tilapia, *Oreochromis niloticus*, en estanque de concreto en el caserío Palo Blanco (Cascas, La Libertad-Perú). *REBIOL* 2012; 32(2): 99–107.

Docan, A; Cristea, V; Dediu, L; Mocanu, M; Grecu, I. 2011. The impact of level of the stocking density on the haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared in recirculating aquaculture systems. *AAFL Bioflux*, 4 (4): 536–541.

Dominguez, M; Takemura, A; Tsuchiya, M; Nakamura, S. 2004. Impact of different environmental factor son circulating immunoglobulin levels in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 241: 491–500.

Donaldson, MR; Cooke, SJ; Patterson, DA; Macdonald, JS. 2008. Cold shock and fish. *Journal of Fish Biology* 73: 1491–1530.

Ebeling, JM; Timmons, MB, Bisogni, JJ. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia – nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257: 346–358.

Egna, H; Boyd, C. 1997. Dinámica de los estanques en acuicultura (en línea). Consultado en 28 Nov 2014. Disponible en: http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/3044/05-acuicultura_sagpya.pdf.

Ekasari, J; Angela, D; Waluyo, SH; Bachtiar, T; Surawidjaja, EH; Bossier, P; De Schryver, P. 2014. The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. *Aquaculture* 426–427: 105–111.

Ellis, T; James, JD; Stewart, C; Scott, AP. 2004. A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 65: 1233–1252.

El-Sayed, AM. 2002. Effects of stocking density and feeding level on growth and feed efficiency of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fry. *Aquaculture research*. 33: 621–626.

El-Sayed, AM. 2006. *Tilapia culture*. CAB International. United Kingdom, 293 pp.

Engdaw, F; Dadebo, E; Nagappan, R. 2013. Morphometric relationships and feeding habits of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) (Pisces: Cichlidae) from lake Koka, Ethiopia. *International Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2 (4): 56–71.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2016. Sistema de Información sobre Alimentos y Recursos Fertilizantes para la Acuicultura (en línea). Consultado en 15 julio 2016. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/affris/docs/NileTilapiaSpanishTables/NileTilapiaTabSp1.pdf.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Fernandes, MdeO; Volpato, GL. 1993. Heterogeneous growth in the Nile tilapia: Social stress and carbohydrate metabolism. *Physiology & Behavior*. 54: 319–323.

FONDEPES (Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero, PE). 2004. Manual de cultivo de tilapia. Palomino, AR. ed. Lima, Perú.

Fontainhas-Fernandes, A; Gomes, EF; Reis-Henriques, MA; Coimbra, J. 2003. Effect of cortisol on some osmoregulatory parameters of the teleost, *Oreochromis niloticus* L., after transference from freshwater to seawater. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 55(5), 562-567. Disponible en <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352003000500008>

Gallaugh, P; Farrell, P. 1998. Hematocrit and blood Oxygen-carrying capacity. *Fish Physiology*. 17: 185–227.

Green, J; Corbet, SA; Betney, E. 1973. Ecological studies on crater lakes in West Cameroon. The blood of endemic cichlids in Barombi Mbo in relation to stratification and their feeding habits. *J. Zool* 170: 299–308.

Gomes, LC; Araujo-Lima, CARM; Roubach, R; Chippari-Gomes, AR; Lopes, NP; Urbinati, EC. 2003. Effect of Fish Density During Transportation on Stress and Mortality of Juvenile Tambaqui *Collossoma macropomum*. *Journal of the world aquaculture society* 34 (1): 76–84.

Gonçalves, GS; Pezzato, LE; Barros, MM; Hisano, H; Santa Rosa, MJ. 2009. Níveis de proteína digestível e energia digestível em dietas para tilápias-do-nilo formuladas com base no conceito de proteína ideal. *R. Bras. Zootec.*, 38 (12): 2289–2298.

Guimaraes, IG .2011. Perfil hematológico de tilápias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em Pernambuco. Tesis Mestre en Ciencia Veterinária. Recife, Brasil, Universidad Federal Rural de Pernambuco. 47 p.

Hargreaves, JA. 2013. Biofloc Production Systems for aquaculture. Souther Regional Aquaculture Center (SRAC). Publication no 4503.

Hesser, EF. 1960. Methods for routine fish hematology. *The progressive fish-culturist*. 22 (4): 164–171.

Hrubec, TC; Cardinale, JL; Smith, SA. 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet Clin Pathol* 29: 7–12.

Iguchi, K; Ogawab, K; Nagaec, M; Ito, F. 2003. The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture* 220:515-523.

Iwama, G. 2006. Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Science* 851:304–310.

Kajimura, S; Hirano, T; Visitacion, N; Moriyama, S; Aida, K; Grau, EG. 2003. Dual mode of cortisol action on GH/IGF-I/IGF binding proteins in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Endocrinology* 178: 91–99.

Küçük, S; Karul, A; Yildirim, S; Gamsiz, K. 2013. Effects of salinity on growth and metabolism in blue tilapia (*Oreochromis aureus*). African Journal of Biotechnology. 12 (19): 2715–2721.

Kumar, N; Jesu-Prabhu, PA; Pal, AK; Remya, S; Aklakur, M; Rana, RS; Gupta, S; Raman, RP; Jadhao, SB. 2011. Anti-oxidative and immuno-hematological status of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) during acute toxicity test of endosulfan. Pesticide Biochemistry and Physiology 99: 45–52.

Leatherland, JF. 2010. Endocrine and reproductive systems, including their interaction with the immune system. Fish Disease and Disorders Vol. 2: Non-infectious Disorders, 2nd edition (Ed. Leatherland, JF; Woo, PTK).

Li, M; Leatherland, J. 2008. Temperature and ration effects on components of the IGF system and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during the transition from late stages embryos to early stage juvenile. General and Comparative Endocrinology. 155: 668–679.

Lim, C; Yildirim-Aksoy, M; Klesius, P. 2011. Lipid and Fatty Acid Requirements of Tilapias. North American Journal of Aquaculture, 73 (2): 188–193.

Lima, ECR de; Souza, RF de; Wambach, HF; Silva, UL; Correia, E. 2015. Cultivo da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* em sistemas de bioflocos com diferentes densidades de estocagem. Rev. Bras. Saúde Prod. Anim., 16 (4): 948–957.

Long, L; Yang, J; Li, Y; Guan, C; Wu, F. 2015. Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. En prensa.

Loyless, JC; Malone, RF. 1997. A sodium bicarbonate dosing methodology for pH management in Freshwater-Recirculating Aquaculture System. The progressive fish-culturist 59:3; 198–205.

Luo, G; Gao, QJ; Wang, C; Liu, W; Sun, D; Li, L; Tan, H. 2014. Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture* 422–423: 1–7.

Mazeaud, MM; Mazeaud, F; Donaldson, EM. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the american fisheries society* 106 (3): 201–212.

Mejía, CM. 2014. Dinámica del nitrógeno en bioreactores de in sistema de producción de alevinos machos de tilapia (*Oreochromis niloticus*) con tecnología Biofloc. Tesis Licenciatura Ingeniero Pesquero. La Molina, Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 90 p.

Meyer, DE. 2004. Introducción a la Acuicultura. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras. 159 pp.

Mirea, C; Cristea, V; Grecu, RI; Dediu, L; Ion, V. 2013. Hematological and biochemical characterization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) reared intensively in a recirculating aquaculture system in relation to water temperature. *Animal Science and Biotechnologies* 46 (2): 234–237.

Mommsen, TP; Vijayan, MM; Moon, TW. 1999. Cortisol in teleost: dynamics, mechanism of action, and metabolic regulation. *Reviews in fish Biology and Fisheries*. 9. 211–268.

Monroy-Dosta, MC; Lara-Andrade, R de; Castro-Mejía, J; Castro-Mejía, G; Coehlo-Emerenciano, G. 2013. Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 48 (3): 511–520.

Nagl, S; Tichy, H; Mayer, WE; Samonte, IE; McAndrew, BJ; Klein, J. 2001. Classification and Phylogenetic Relationships of African Tilapiine Fishes Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20 (3): 361–374.

Oliveira-Junior, AA; Tavares-Dias, M; Marcon, JL. 2008. Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. *Research in Veterinary Science*, 86: 146–151.

Osofero, SA; Otubusin, SO; Daramola JA. 2009. Effect of stocking density on tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1757) growth and survival in bamboo – net cages trial. *African Journal of Biotechnology*. 8 (7): 1322–1325.

Pickering, AD. 1993. Growth and stress in fish production. *Aquaculture* 111: 51–63.

Pickering, AD; Pottinger, TG. 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry* 7(1-4): 253–258.

Pickering, AD; Pottinger, TG. 1995. Biochemical effects of stress. *Biochemistry and molecular biology of fishes*. 5: 349–379.

Piedrahita, RH. 2003. Reducing the potencial environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture* 226: 35–44.

Poli, MA; Schweitzer, R; Nuñez, AP. 2015. The use of biofloc technology in a South American catfish (*Rhamdia quelen*) hatchery: Effect of suspended solids in the performance of larvae. *Aquacultural Engineering* 66: 17–21.

Popma, TJ; Lovshin, LL. 1995. *Worldwide Prospects for Commercial Production of Tilapia*. Department of Fisheries and Allied Aquacultures. Auburn University, Alabama, United States.

Popma, TJ; Masser, M. 1999. *Tilapia Life History and Biology*. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC). Publication N° 283.

PRODUCE (Ministerio de la Producción). 2013. *Anuario Estadístico Pesquero y Acuicola 2012*. Lima, Perú.

PRODUCE (Ministerio de la Producción). 2017. Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2016. Lima, Perú.

Rakocy, JE. 1989. Tank culture of tilapia. Souther Regional Aquaculture Center (SRAC). Publication n° 282.

Ran, C; Huang, L; Hu, J; Tacon, P; He, S; Li, S; Wang, Y; Liu, Z; Xu, L; Yang, Y; Zhou, Z. 2016. Effects of dietary live and heat-inactive baker's yeast on growth, gut health, and disease resistance of Nile tilapia under high rearing density. *Fish & Shellfish Immunology* 56: 263–271.

Ranzani-Paiva, MJT; Padua, SB; Tavares-Dias, M; Egami, M. 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá, Brasil: Eduem Universidad Estadual de Maringá. 140 p.

Rebouças, VT; Lima, FR; Cavalcante, D; Carmo, MV. 2015. Tolerance of Nile tilapia juveniles to highly acidic rearing water. *Acta Scientiarum. Animal Science*. 37 (3): 227–233.

Rotllant, J; Tort, L. 1997. Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *Journal of Fish Biology*. 51: 21–28.

Rottman, RW; Francis-Floyd, R; Durborow, R. 1992. The role of stress in fish disease. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC). Publication no. 474.

Saavedra, MA. 2006. Manejo de cultivo de tilapia. Managua, Nicaragua. 22 pp.

Sadhu, N; Sharma SRK; Joseph, S; Dube, P; Philipose, KK. 2014. Chronic stress due to high stocking density in open sea cage farming induces variation in biochemical and immunological functions in Asian seabass (*Lates calcifer*, Bloch). *Fish Physiol Biochem* 40 (4): 1105–1113.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación). S.f. Manual de Producción de Tilapia con Especificaciones de Calidad e Inocuidad. Estado de Veracruz, Estados Unidos Mexicanos. 143 pp.

Salazar, R; Blanco, Y; Centeno, L; Lemus, R. 2011. Variaciones en los parámetros hematológicos y en la respuesta inmune inespecífica de la cachama negra *Colossoma macropomum* expuesta a Cadmio. *Saber*. 23 (1): 28–35.

Santiago, CB; Lovell, RT. 1988. Amino Acid Requirements for Growth of Nile Tilapia. *The Journal of Nutrition*. 1540–1546.

Santos, GA; Schrama, JW; Mamauag, REP; Rombout, JHWM; Verreth, JAJ. 2010. Chronic stress impairs performance, energy metabolism and welfare indicators in European seabass (*Dicentrarchus labrax*): The combined effects of fish crowding and water quality deterioration. *Aquaculture* 299: 73–80.

Sayed, AE; Moneeb, R. 2015. Hematological and biochemical characters of monosex tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) cultivated using methyltestosterone. *The Journal of Basic & Applied Zoology* 72: 36–42.

Siddiqui, AQ; Howlader, MS; Adam, AA. 1988. Effects of Dietary Protein Levels on Growth, Feed Conversion and Protein Utilization in Fry and Young Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 70: 63–73.

Silva, RD Da; Rocha, LO; Fortes, BDA; Vieira, D; Fioravanti, MCS. 2012. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de tilapia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) sob estresse por exposição ao ar. *Pesq. Vet. Bras.* 32: 99–107.

Silveira-Coffigny, R; Prieto-Trujillo, A; Asencio-Valle, F. 2004. Effects of different stressors in haematological variables in cultured *Oreochromis aureus* S. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* 139: 245–250.

Skov, PV; Larsen, BK; Frisk, M; Jokumsen, A. 2011. Effects of rearing density and water current on the respiratory physiology and haematology in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* at high temperature. *Aquaculture* 319: 446–452.

Soivio, A; Nynolm, K; Westman, K. 1975. A technique for repeated sampling of the blood of individual resting fish. *J. exp. Biol.* 6a: 207–217.

Sprague, J. 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish – III. Water research 5: 245–266.

Stolte, EH; Van Kemenade, BMLV; Savelkoul, HFJ; Flik, G. 2006. Evolution of glucocorticoid receptors with different glucocorticoid sensitivity. Journal of Endocrinology 190: 17–28.

Summerfelt, RC. S. f. Water quality considerations for aquaculture. Department of Animal Ecology, Iowa State University. Ames, IA 50011-3221. United States.

Suresh, AV; Lin, CK. 1992. Effect of stocking density on water quality and production of red tilapia in a recirculated water system. Aquacultural engineering 11: 1–22.

Takeuchi, T; Satoh, S; Watanabe, T. 1983. Requirement of *Tilapia nilotica* for Essential Fatty Acids. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 49 (7): 1127–1134.

Telli, GS; Ranzani-Paiva, MJT; Dias, DC; Sussel, FB; Ishikawa, CM; Tachibana, L. 2014. Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities (en línea). Fish and Shellfish Immunology. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.025>.

Ueda, IK; Egami, MI; Sasso, WdS; Matushima, ER. 1997. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichidae, Teleostei) – Parte I. Braz. J. vet. Res. Anim. Sci 34 (5): 270–275.

Van der Boon, J; Van den Thillart, GEEJM; Addink, ADF. 1991. The effect of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. Comp Biochem Physiol 100A (1): 47–53.

Van Weerd, JH; Komen, J. 1998. The effects of chronic disease on growth in fish: a critical appraisal. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 120: 107–112.

Van Rijn, J; Tal, Y; Schreier, HJ. 2006. Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. Aquacultural Engineering 34: 364–376.

Venturoti, GP; Veronez, AC; Salla, RV; Gomes, LC. 2015. Variation of limnological parameters in a tropical lake used for tilapia cage farming. *Aquaculture Reports* 2: 152–157.

Vijayan, MM; Ballantyne, JS; Leatherland, JF. 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture* 88: 371–381.

Vijayan, MM; Leatherland, JF. 1988. Effect of stocking density on the growth and stress-response in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture*, 75: 159–170.

Vijayan, MM; Reddy, PK; Leatherland, JF; Moon, TW. 1994. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: A study using the steroid analogue RU486. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96: 257–263.

Vijayan, MM; Pereira, C; Grau, EG; Iwama, GK. 1997. Metabolic response associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp. Biochem. Physiol.* 116C (1):89–95.

Vijayan, MM; Aluru, N; Leatherland, JF. 2010. Stress response and the role of cortisol. *Fish Disease and Disorders*. Vol 2: Non-infectious disorders, 2nd Ed. Eds Leatherland JF y Woo, PTK.

Volkoff, H; Canosa, LF; Unniappan, S; Cerdá-Reverter, JM; Bernier, RJ; Kelly, SP; Peter, RE. 2005. Neuropeptides and the control of food intake in fish. *General and Comparative Endocrinology* 142: 3–19.

Wagner, EJ; Jeppsen, T; Arndt, R; Routledge, MD; Bradwisch, Q. 1997. Effects of rearing density upon cutthroat trout hematology, hatchery performance, fin erosion, and general health and condition. *The progressive fish-culturist* 59: 173–187.

Walsh, PI; Wood, CM; Moon, TW. 1998. Red blood cell metabolism. *Fish Physiology* 17: 41-73.

Wambach, XF. 2013. Influência de diferentes densidades de estocagem no desempenho produtivo de tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) cultivada com

tecnología de bioflocos. Tesis Magíster Recursos Pesqueros y Acuicultura. Recife, Brasil. Universidad Federal Rural de Pernambuco. 78 pp.

Weber, RA. 2009. Efecto del estrés y de la anestesia sobre indicadores primarios y secundarios de estrés y sobre los neurotransmisores monoaminérgicos cerebrales en el lenguado *Solea senegalensis* (KAUP 1858). Tesis Doctorado Biología mención Fisiología. Santiago de Compostela, España. Universidad de Santiago de Compostela. 241 pp.

Wendelaar Bonga, SE. 1997. The stress response in fish. *Physiological reviews*. 77 (3): 591–625.

Widanarni; Ekasari, J; Maryam, S. 2012. Evaluation of biofloc technology application on water quality and production performance of Red tilapia *Oreochromis sp.* cultured at different stocking densities. *Hayati Journal of Biosciences* 19 (2): 73–80.

Yarahmadi, P; Miandare, HK; Hoseinifar, SH; Gheysvandi, N; Akbarzadeh, A. 2014. The effects of stocking density on hemato-immunological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult Int.* Suiza. 9 pp.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Ejemplar de *Oreochromis niloticus*, de 90 g de peso.






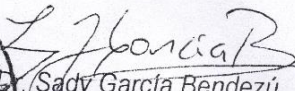
Anexo 2: Equipo multiparámetro marca Hach, modelo *HQ40d* (centro), con sondas para medir conductividad (izquierda) y oxígeno (derecha).



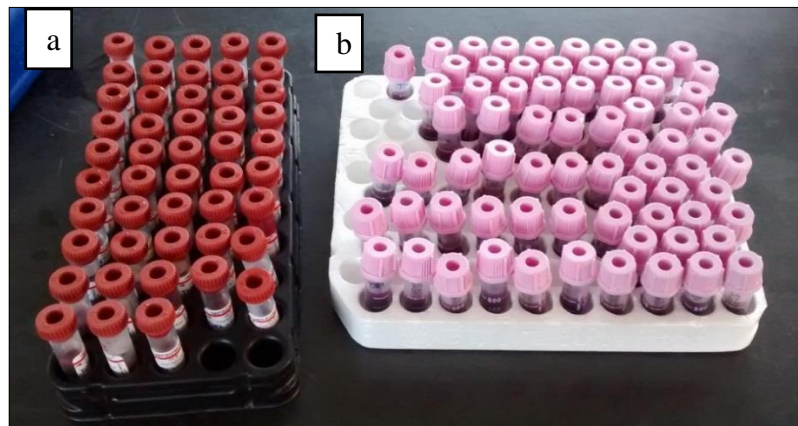
Anexo 3: Medición de los sólidos sedimentables en cono Imhoff



Anexo 4: Porcentaje de carbono en materia orgánica.

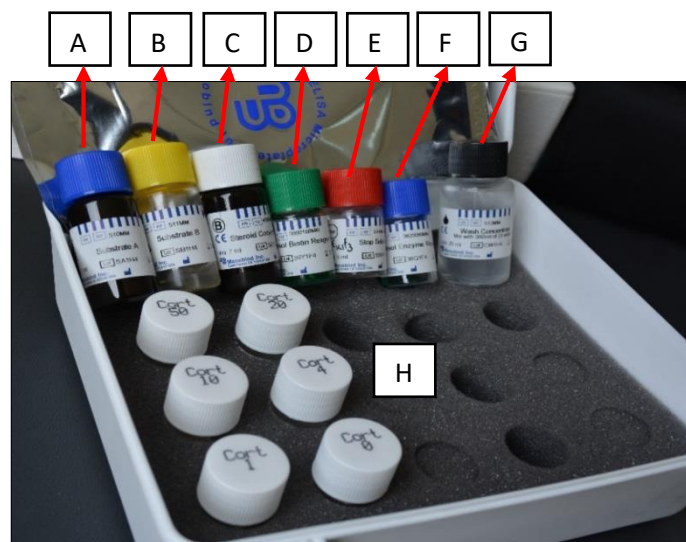
	UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA FACULTAD DE AGRONOMIA LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES							
INFORME DE ANALISIS ESPECIAL DE MATERIA ORGANICA								
SOLICITANTE	:	MARCO DE LA CRUZ RIVAS						
PROCEDENCIA	:	LIMA/ LIMA/ LA MOLINA						
MUESTRA DE	:	MELAZA						
REFERENCIA	:	H.R. 51119						
BOLETA	:	12375						
FECHA	:	07/09/15						
<table border="1"><thead><tr><th>Nº LAB</th><th>CLAVES</th><th>C g/L</th></tr></thead><tbody><tr><td>560</td><td>100 g melaza</td><td>400.90</td></tr></tbody></table>			Nº LAB	CLAVES	C g/L	560	100 g melaza	400.90
Nº LAB	CLAVES	C g/L						
560	100 g melaza	400.90						
  Sady García Bendezi Jefe de Laboratorio								
<hr/> <p>Av. La Molina s/n Campus UNALM Telf.: 614-7800 Anexo 222 Telefax: 349-5622 e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe</p>								

Anexo 5: Tubos de colecta de sangre. (a) Tubos *microcollet*, (b) Tubos con EDTA.



Anexo 6: Elementos del kit de determinación de cortisol

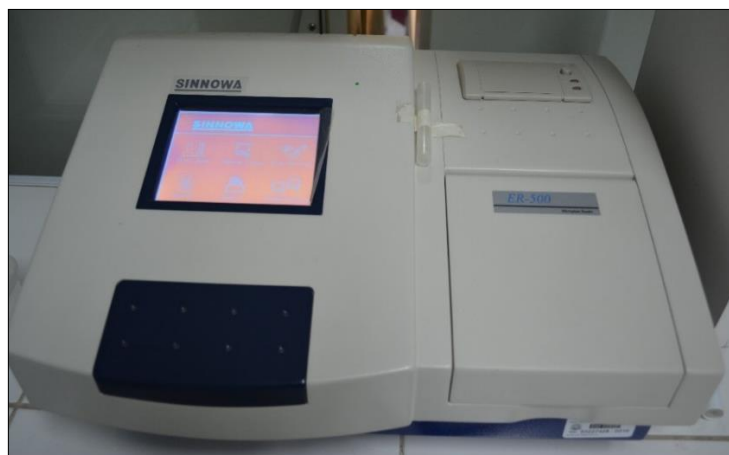
- A. Sustrato A
- B. Sustrato B
- C. Conjugado esteroide
- D. Reactivo cortisol biotilado
- E. Solución de parada
- F. Reactivo enzimático de cortisol
- G. Buffer de lavado.
- H. Estándares de cortisol (6 viales).



Anexo 7: Lavador de placas de ELISA, marca *Kayto*.



Anexo 8: Lector de microplacas de ELISA, marca *Sinnowa*.



Anexo 9: Espectrofotómetro marca *UNICO* modelo *1100*, usado para determinar la concentración de glucosa.



Anexo 10: Espectrofotómetro marca *HACH* modelo *DR3900*, usado para medir compuestos nitrogenados.



Anexo 11: Informe inferencial – Parámetros productivos

Prueba de normalidad

- Ho: La distribución de los datos sigue una tendencia a la normalidad
- Ha: La distribución de los datos no sigue una tendencia a la normalidad

Tabla 1: Pruebas de normalidad para parámetros productivos

	Tratamiento	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Peso Inicial	Tratamiento 1	,999	3	,950
	Tratamiento 2	,879	3	,322
	Tratamiento 3	,880	3	,325
Peso final	Tratamiento 1	1,000	3	,980
	Tratamiento 2	1,000	3	1,000
	Tratamiento 3	1,000	3	1,000
Sobrevivencia	Tratamiento 1	,750	3	,000
	Tratamiento 2	,750	3	,000
	Tratamiento 3	,785	3	,080
Ganancia de peso	Tratamiento 1	,922	3	,461
	Tratamiento 2	1,000	3	,977
	Tratamiento 3	1,000	3	,997
Tasa específica de crecimiento	Tratamiento 1	,927	3	,479
	Tratamiento 2	,993	3	,843
	Tratamiento 3	1,000	3	1,000
Productividad inicial	Tratamiento 1	,999	3	,951
	Tratamiento 2	,933	3	,498
	Tratamiento 3	,965	3	,641
Productividad final	Tratamiento 1	,978	3	,714
	Tratamiento 2	1,000	3	1,000
	Tratamiento 3	,961	3	,620

a. Corrección de significación de Lilliefors

Se aplicó una relación entre los tratamientos y cada uno de los parámetros. La prueba de normalidad se aplicó mediante el estadístico de Shapiro-Wilk por tener un tamaño muestral menor a 30. La significancia resaltada de amarillo nos indicó que la hipótesis nula se aceptó y que los datos siguen una distribución normal, mientras que lo resaltado en verde, nos indicó que se rechazó la hipótesis nula y los datos no presentan distribución normal. Peso inicial, peso final, ganancia de peso, tasa específica de crecimiento y productividad inicial y final: se acepta H_0 , porque $p > 0.05$. Los datos presentan distribución normal. Supervivencia: $p < 0.05$, se rechaza la H_0 . Los datos no siguen distribución normal. Para comprobar que las medias son iguales, se aplicó la prueba estadística de ANOVA de un factor y Tukey en aquellas variables donde se cumple el supuesto de normalidad; y de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney en el caso contrario.

Prueba de ANOVA de un factor

- H_0 : Los promedios entre los tratamientos son iguales.
- H_a : Al menos un promedio no es igual.

Tabla 2: Prueba de ANOVA para datos productivos con distribución normal

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Peso final	Entre grupos	173,389	2	86,694	10,150	,012
	Dentro de grupos	51,245	6	8,541		
	Total	224,634	8			
Ganancia de peso	Entre grupos	102,041	2	51,020	5,150	,050
	Dentro de grupos	59,443	6	9,907		
	Total	161,483	8			
Tasa específica de crecimiento	Entre grupos	,024	2	,012	5,154	,050
	Dentro de grupos	,014	6	,002		
	Total	,038	8			
Productividad final	Entre grupos	315,305	2	157,653	967,375	,000
	Dentro de grupos	,978	6	,163		
	Total	316,283	8			

En las variables donde el p-valor es menor a 0.05 (resaltado en verde), se rechazó la H₀. Para averiguar que medias son diferentes, se aplicó la prueba de Tukey, por ser la cantidad de datos la misma en cada tratamiento.

Prueba de Tukey

- H₀: Tratamiento 1 = Tratamiento 2; Tratamiento 1 = Tratamiento 3; Tratamiento 2 = Tratamiento 3.
- H_a: Al menos un tratamiento es diferente.

Tabla 3: Prueba de Tukey para identificar la diferencia de medias

Variable dependiente	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Peso final	Tratamiento 1	tratamiento 2	2,38620	,013	-17,3588	-2,7158
		Tratamiento 3	2,38620	,030	-15,6768	-1,0338
	Tratamiento 2	Tratamiento 1	2,38620	,013	2,7158	17,3588
		Tratamiento 3	2,38620	,770	-5,6395	9,0035
Productividad final	Tratamiento 1	Tratamiento 2	,32962	,000	-7,6203	-5,5975
		Tratamiento 3	,32962	,000	-15,4914	-13,4687
	Tratamiento 2	Tratamiento 1	,32962	,000	5,5975	7,6203
		Tratamiento 3	,32962	,000	-8,8825	-6,8598

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Para el peso final, se observó que existen diferencias significativas entre T1 y T2, y T1 y T3, pero no las hay entre T2 y T3.

Para la productividad se encontró diferencias entre los tres tratamientos.

Prueba de Kruskal Wallis

- H₀: Los promedios entre los tratamientos son iguales.
- H_a: Al menos un promedio no es igual.

Tabla 4: Prueba de Kruskal-Wallis para sobrevivencia

	Sobrevivencia
Chi-cuadrado	2,036
gl	2
Sig. asintótica	,361

Se acepta la H_0 , no hay diferencia entre promedios de sobrevivencia al final del experimento.

Anexo 12: Informe inferencial – Calidad de agua

Prueba de normalidad

- H_0 : La distribución de los datos sigue una tendencia a la normalidad.
- H_a : La distribución de los datos no sigue una tendencia a la normalidad.

Tabla 5: Pruebas de normalidad para variables de calidad de agua

	Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a		
		Estadístico	gl	Sig.
Temperatura	Tratamiento 1	,152	132	,000
	Tratamiento 2	,167	132	,000
	Tratamiento 3	,075	132	,066
Oxígeno disuelto	Tratamiento 1	,133	132	,000
	Tratamiento 2	,132	132	,000
	Tratamiento 3	,126	132	,000
Porcentaje de saturación	Tratamiento 1	,125	126	,000
	Tratamiento 2	,157	126	,000
	Tratamiento 3	,131	126	,000
Conductividad eléctrica	Tratamiento 1	,089	120	,020
	Tratamiento 2	,100	120	,005
	Tratamiento 3	,042	120	,200*
Volumen de floc	Tratamiento 1	,094	129	,007
	Tratamiento 2	,077	129	,057
	Tratamiento 3	,116	129	,000
Nitrato	Tratamiento 1	,422	36	,000
	Tratamiento 2	,152	36	,036
	Tratamiento 3	,096	36	,200*
Nitrógeno Amoniacal Total	Tratamiento 1	,248	36	,000
	Tratamiento 2	,262	36	,000
	Tratamiento 3	,182	36	,004
Amonio no ionizado	Tratamiento 1	,201	36	,001
	Tratamiento 2	,190	36	,002
	Tratamiento 3	,346	36	,000

<i>Continuación</i>				
Amonio ionizado	Tratamiento 1	,253	36	,000
	Tratamiento 2	,245	36	,000
	Tratamiento 3	,163	36	,017
pH	Tratamiento 1	,081	33	,200*
	Tratamiento 2	,136	32	,139
	Tratamiento 3	,191	36	,002
Alcalinidad	Tratamiento 1	,142	33	,087
	Tratamiento 2	,121	33	,200*
	Tratamiento 3	,111	33	,200*

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

En la mayoría de los datos no se presentó una distribución normal, por lo que se aplicó A TODOS estadística no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis), a excepción de la alcalinidad, para comparar las medianas y, en el supuesto de que tengan medianas diferentes, se aplicó la prueba de Mann-Whitney para saber qué grupos son diferentes.

Prueba de Kruskal-Wallis

- H_0 : La mediana de cada variable de calidad de agua son iguales.
- H_a : Al menos una mediana de cada variable de calidad de agua no es igual.

Tabla 6: Prueba de Kruskal-Wallis para variables de calidad de agua

	Temperatura	Oxígeno disuelto	% de saturación	Conductividad eléctrica	Vol. de floc	Nitrato	Nitrógeno Amoniacal Total	Amonio no ionizado	Amonio ionizado	pH
Chi-cuadrado	16,178	187,255	246,372	46,775	9,178	19,399	48,331	19,450	55,404	48,572
gl	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Sig. asintótica	,000	,000	,000	,000	,010	,000	,000	,000	,000	,000

Como $p < 0.05$ en todas las variables, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que hay por lo menos un tratamiento que es diferente a los demás. Para saber qué tratamiento presenta una mediana diferente, se procede con la prueba de Mann-Whitney.

Prueba de Mann-Whitney

Tratamiento 1 vs Tratamiento 2

- H_0 : El tratamiento 1 tiene una mediana igual al tratamiento 2
- H_a : El tratamiento 1 no tiene una mediana igual al tratamiento 2

Tabla 7: Prueba de Mann-Whitney entre Tratamiento 1 y Tratamiento 2

	Temperatura	Oxígeno disuelto	Porcentaje de saturación	Conductividad eléctrica	Volumen de floc	Nitrato	Nitrógeno Amoniacal Total	Amonio no ionizado	Amonio ionizado	pH
U de Mann-Whitney	8156,500	2927,000	1249,000	6623,000	8274,000	432,500	169,500	460,000	132,000	179,000
W de Wilcoxon	16934,500	11705,000	9250,000	13883,000	16659,000	1098,500	835,500	1126,000	798,000	707,000
Z	-,896	-9,327	-11,562	-1,073	-,078	-2,427	-5,390	-2,121	-5,812	-4,580
Sig. asintótica (bilateral)	,370	,000	,000	,283	,938	,015	,000	,034	,000	,000

Se acepta la H_0 en las siguientes variables: temperatura, conductividad eléctrica y volumen de floc. Lo que se interpreta así: Las variables antes nombradas, presentan medianas iguales. Se rechaza la H_0 en las siguientes variables fisicoquímicas: oxígeno disuelto, porcentaje de saturación, nitrato, NAT, amonio no ionizado, amonio ionizado, y pH; por lo que se concluye que las medianas de las variables fisicoquímicas mencionadas del tratamiento 1 presentan diferencias estadísticamente significativas con las variables fisicoquímicas del tratamiento 2

Tratamiento 1 vs Tratamiento 3

- H_0 : El tratamiento 1 tiene una mediana igual al tratamiento 3
- H_a : El tratamiento 1 no tiene una mediana igual al tratamiento 3

Tabla 8: Prueba de Mann-Whitney entre Tratamiento 1 y Tratamiento 3

	Temperatura	Oxígeno disuelto	% de saturación	Conductividad eléctrica	Volumen de floc	Nitrato	Nitrógeno Amoniacal Total	Amonio no ionizado	Amonio ionizado	pH
U de Mann-Whitney	6792,000	1019,500	215,500	4017,500	6740,500	281,000	117,000	257,000	87,000	55,500
W de Wilcoxon	15570,000	9797,500	8216,500	11277,500	15125,500	947,000	783,000	923,000	753,000	721,500
Z	-3,097	-12,402	-13,348	-5,918	-2,638	-4,133	-5,981	-4,421	-6,319	-6,470
Sig. asintótica (bilateral)	,002	,000	,000	,000	,008	,000	,000	,000	,000	,000

Se rechaza la H_0 en todas las variables fisicoquímicas, por lo que se concluye que las medianas de las variables fisicoquímicas del tratamiento 1 presentan diferencias estadísticamente significativas con las variables fisicoquímicas del tratamiento 3.

Tratamiento 2 vs Tratamiento 3

- H_0 : El tratamiento 2 tiene una mediana igual al tratamiento 3
- H_p : El tratamiento 2 no tiene una mediana igual al tratamiento 3

Tabla 9: Prueba de Mann-Whitney entre Tratamiento 2 y Tratamiento 3

	Temperatura	Oxígeno disuelto	Porcentaje de saturación	Conductividad eléctrica	Volumen de floc	Nitrato	Nitrógeno Amoniacal Total	Amonio no ionizado	Amonio ionizado	pH
U de Mann-Whitney	6403,500	4599,000	3021,000	4054,000	6760,500	427,000	376,000	449,000	341,500	319,500
W de Wilcoxon	15181,500	13377,000	11022,000	11314,000	15145,500	1093,000	1042,000	1115,000	1007,500	985,500
Z	-3,724	-6,631	-8,499	-5,850	-2,604	-2,489	-3,064	-2,252	-3,452	-3,152
Sig. asintótica (bilateral)	,000	,000	,000	,000	,009	,013	,002	,024	,001	,002

Se rechaza la H_0 en todas las variables fisicoquímicas, por lo que se concluye que las medianas de las variables fisicoquímicas del tratamiento 2 presentan diferencias estadísticamente significativas con las variables fisicoquímicas del tratamiento 3.

Prueba de ANOVA para alcalinidad

Ho: La media de eritrocitos son iguales.

Ha: Al menos una media de eritrocitos no es igual.

Tabla 10: Prueba de ANOVA para datos de alcalinidad

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	12792,588	2	6396,294	9,700	,000
Dentro de grupos	63305,996	96	659,437		
Total	76098,585	98			

Se rechaza la Ho para los datos de alcalinidad, por ser el p-valor < 0.05. Para averiguar que promedios son diferentes, se aplicó la prueba de Tukey, por ser la cantidad de datos la misma en cada tratamiento.

Prueba de Tukey

- Ho: Tratamiento 1 = Tratamiento 2 = Tratamiento 3.
- Ha: Al menos un tratamiento es diferente.

Tabla 11: Prueba de Tukey para hallar diferencias entre tratamientos

(I) Tratamiento (J) Tratamiento	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
Tratamiento 1	Tratamiento 2	,015	2,9044	33,0041
	Tratamiento 3	,000	12,3586	42,4583
Tratamiento 2	Tratamiento 1	,015	-33,0041	-2,9044
	Tratamiento 3	,298	-5,5956	24,5041

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Para la alcalinidad, se observó que existen diferencias significativas entre T1 y T2, y T1 y T3, pero no las hay entre T2 y T3.

Anexo 13: Informe inferencial - Parámetros bioquímicos

Prueba de normalidad (Shapiro-Wilk)

H₀: La distribución de los datos sigue una tendencia a la normalidad

H_a: La distribución de los datos no sigue una tendencia a la normalidad

Tabla 12: Pruebas de normalidad para las variables metabólicas

	Tratamiento	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Cortisol inicial	Tratamiento 1	,898	9	,238
	Tratamiento 2	,925	15	,230
	Tratamiento 3	,935	27	,093
Cortisol medio	Tratamiento 1	,851	9	,076
	Tratamiento 2	,766	15	,001
	Tratamiento 3	,928	27	,061
Cortisol final	Tratamiento 1	,791	9	,016
	Tratamiento 2	,950	15	,529
	Tratamiento 3	,781	27	,000
Glucosa inicial	Tratamiento 1	,895	9	,223
	Tratamiento 2	,912	15	,147
	Tratamiento 3	,955	27	,289
Glucosa media	Tratamiento 1	,842	9	,060
	Tratamiento 2	,982	15	,980
	Tratamiento 3	,917	27	,033
Glucosa final	Tratamiento 1	,972	9	,907
	Tratamiento 2	,947	15	,472
	Tratamiento 3	,959	27	,346

Algunos datos no presentan distribución normal. Ya que se realizarán comparaciones entre tratamientos y dentro del tratamiento, se aplicará estadística no paramétrica a todos los datos.

Prueba de Kruskal-Wallis

H₀: La mediana de los parámetros bioquímicos (Glucosa o cortisol) son iguales.

H_a: Al menos una mediana de los parámetros bioquímicos (Glucosa o cortisol) no es igual.

Tabla 13: Prueba de Kruskal-Wallis para variables metabólicas no paramétricas

	Cortisol inicial	Cortisol medio	Cortisol final	Glucosa inicial	Glucosa media	Glucosa final
Chi-cuadrado	,239	1,462	3,343	1,164	22,752	17,124
gl	2	2	2	2	2	2
Sig. asintótica	,888	,481	,188	,559	,000	,000

Cortisol: Se acepta la Ho, por lo tanto, las medianas de cada tratamiento son iguales.

Glucosa: Se acepta Ho para el inicio, señalando que no hubo medianas diferentes. Sin embargo, en el intermedio y al final del experimento sí hubo medianas diferentes. Para conocer que medianas son diferentes, aplicaremos prueba de Mann-Whitney.

Prueba de Mann-Whitney para glucosa media

Tratamiento 1 vs Tratamiento 2

- Ho: La medianas son iguales.
- Ha: Las medianas no son iguales.

Tabla 14: Prueba de Mann-Whitney entre Tratamiento 1 y el Tratamiento 2

	Glucosa media
U de Mann-Whitney	42,000
W de Wilcoxon	162,000
Z	-1,521
Sig. asintótica (bilateral)	,128

p-value >0.05, se acepta la Ho. Las medianas son iguales.

Tratamiento 1 vs Tratamiento 3

- Ho: La medianas son iguales.
- Ha: Las medianas no son iguales.

Tabla 15: Prueba de Mann-Whitney entre Tratamiento 1 y el Tratamiento 3

	Glucosa media
U de Mann-Whitney	39,000
W de Wilcoxon	84,000
Z	-3,015
Sig. asintótica (bilateral)	,003

p-value < 0.05, por lo tanto se rechaza la Ho. Las medianas son diferentes.

Tratamiento 2 vs Tratamiento 3

- Ho: La medianas son iguales.
- Ha: Las medianas no son iguales

Tabla 16: Prueba de Mann-Whitney entre Tratamiento 2 y el Tratamiento 3

	Glucosa media
U de Mann-Whitney	38,000
W de Wilcoxon	158,000
Z	-4,319
Sig. asintótica (bilateral)	,000

p-value < 0.05, por lo tanto se rechaza la Ho. Las medianas son diferentes.

Prueba de Mann-Whitney para glucosa final

Tratamiento 1 vs Tratamiento 2

- Ho: La medianas son iguales.
- Ha: Las medianas no son iguales

Tabla 17: Prueba de Mann-Whitney entre Tratamiento 1 y el Tratamiento 2

	Glucosa final
U de Mann-Whitney	17,000
W de Wilcoxon	137,000
Z	-3,011
Sig. asintótica (bilateral)	,003

Se rechaza Ho, las medianas son diferentes.

Tratamiento 1 vs Tratamiento 3

- Ho: La medianas son iguales.
- Ha: Las medianas no son iguales.

Tabla 18: Prueba de Mann-Whitney entre Tratamiento 1 y el Tratamiento 3

	Glucosa final
U de Mann-Whitney	105,000
<i>Continuación</i>	

W de Wilcoxon	483,000
Z	-,603
Sig. asintótica (bilateral)	,547

Se acepta Ho, las medianas son iguales.

Tratamiento 2 vs Tratamiento 3

Ho: La medianas son iguales.

Ha: Las medianas no son iguales.

Tabla 19: Prueba de Mann-Whitney entre Tratamiento 1 y el Tratamiento 3

	Glucosa final
U de Mann-Whitney	54,000
W de Wilcoxon	174,000
Z	-3,898
Sig. asintótica (bilateral)	,000

Se rechaza Ho, las medianas son distintas.

Para comparar la variación de cortisol y glucosa en un mismo tratamiento en el tiempo, aplicaremos la prueba estadística de Wilcoxon (prueba no paramétrica para variables relacionadas).

Prueba de Wilcoxon

Tratamiento 1

- Ho: Los promedios de cortisol y glucosa en T1, son iguales en el tiempo.
- Hp: Los promedios de cortisol y glucosa en T1, son diferentes en el tiempo.

Tabla 20: Prueba de Wilcoxon para el Tratamiento 1

	Cortisol inicial - Cortisol final	Glucosa inicial - Glucosa final
Z	-1,836 ^c	-,949 ^c
Sig. asintótica (bilateral)	,066	,343

Se acepta la Ho de igualdad de promedios. La comparación de promedios diferenciales de cortisol y glucosa no difieren significativamente.

Tratamiento 2

- Ho: Los promedios de cortisol y glucosa en T2, son iguales en el tiempo.
- Hp: Los promedios de cortisol y glucosa en T2, son diferentes en el tiempo.

Tabla 21: Prueba de Wilcoxon para el Tratamiento 2

	Cortisol inicial - Cortisol final	Glucosa inicial - Glucosa final
Z	-1,533 ^c	-3,408 ^c
Sig. asintótica (bilateral)	,125	,001

Se acepta la Ho de igualdad de promedios para cortisol. Se rechaza la Ho de igualdad de promedios para glucosa. La comparación de promedios diferenciales de cortisol no difiere significativamente, mientras que la glucosa si tienen una diferencia significativa.

Tratamiento 3

- Ho: Los promedios de cortisol y glucosa en T3, son iguales en el tiempo.
- Hp: Los promedios de cortisol y glucosa en T3, son diferentes en el tiempo.

Tabla 22: Prueba de Wilcoxon para el Tratamiento 3

	Cortisol inicial - Cortisol final	Glucosa inicial - Glucosa final
Z	-3,412 ^c	-3,460 ^c
Sig. asintótica (bilateral)	,001	,001

Se rechaza la Ho de igualdad de promedios. La comparación de promedios diferenciales de cortisol y glucosa difieren significativamente.

Anexo 14: Informe inferencial – Parámetros hematológicos

Prueba de normalidad

- H_0 : La distribución de los datos sigue una tendencia a la normalidad
- H_a : La distribución de los datos no sigue una tendencia a la normalidad

Tabla 23: Pruebas de normalidad para variables hematológicas

	Tratamiento	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Hemoglobina inicial	Tratamiento 1	,946	9	,652
	Tratamiento 2	,902	15	,103
	Tratamiento 3	,965	27	,470
Hemoglobina media	Tratamiento 1	,831	9	,045
	Tratamiento 2	,866	15	,029
	Tratamiento 3	,852	27	,001
Hemoglobina final	Tratamiento 1	,940	9	,582
	Tratamiento 2	,979	15	,966
	Tratamiento 3	,968	27	,553
Hematocrito inicial	Tratamiento 1	,838	9	,055
	Tratamiento 2	,954	15	,592
	Tratamiento 3	,919	27	,037
Hematocrito medio	Tratamiento 1	,946	9	,646
	Tratamiento 2	,938	15	,360
	Tratamiento 3	,952	27	,237
Hematocrito final	Tratamiento 1	,965	9	,846
	Tratamiento 2	,818	15	,006
	Tratamiento 3	,959	27	,354
Eritrocitos inicial	Tratamiento 1	,939	9	,572
	Tratamiento 2	,986	15	,994
	Tratamiento 3	,985	27	,959
Eritrocitos medio	Tratamiento 1	,904	9	,279
	Tratamiento 2	,926	15	,238
	Tratamiento 3	,973	27	,696
Eritrocitos final	Tratamiento 1	,911	9	,323
	Tratamiento 2	,955	15	,602
	Tratamiento 3	,960	27	,375

<i>Continuación</i>				
Volumen Corpuscular Medio inicial	Tratamiento 1	,884	9	,171
	Tratamiento 2	,905	15	,112
	Tratamiento 3	,951	27	,230
Volumen Corpuscular Medio intermedio	Tratamiento 1	,976	9	,938
	Tratamiento 2	,864	15	,028
	Tratamiento 3	,948	27	,194
Volumen Corpuscular Medio final	Tratamiento 1	,952	9	,714
	Tratamiento 2	,965	15	,782
	Tratamiento 3	,958	27	,333
Hemoglobina Corpuscular Media inicial	Tratamiento 1	,757	9	,007
	Tratamiento 2	,928	15	,258
	Tratamiento 3	,923	27	,047
Hemoglobina Corpuscular Media intermedio	Tratamiento 1	,933	9	,508
	Tratamiento 2	,974	15	,914
	Tratamiento 3	,956	27	,296
Hemoglobina Corpuscular Media final	Tratamiento 1	,916	9	,361
	Tratamiento 2	,923	15	,211
	Tratamiento 3	,971	27	,627
Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media inicial	Tratamiento 1	,942	9	,600
	Tratamiento 2	,960	15	,688
	Tratamiento 3	,906	27	,018
Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media intermedia	Tratamiento 1	,704	9	,002
	Tratamiento 2	,955	15	,600
	Tratamiento 3	,860	27	,002
Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media final	Tratamiento 1	,910	9	,313
	Tratamiento 2	,922	15	,204
	Tratamiento 3	,927	27	,059

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Para los eritrocitos, se cumple el supuesto de normalidad, mientras que para el hematocrito y la hemoglobina (estrictamente) no se cumple tal condición.

Prueba de Kruskal-Wallis

- Ho: La mediana de los parámetros hematológicos (hemoglobina o hematocrito) son iguales.
- Ha: Al menos una mediana de los parámetros hematológicos (hemoglobina o hematocrito) no es igual.

Tabla 24: Prueba de Kruskal-Wallis para variables hematológicas no paramétricas

	Hemoglobina inicial	Hemoglobina media	Hemoglobina final	Hematocrito inicial	Hematocrito medio	Hematocrito final
Chi-cuadrado	1,289	9,382	4,813	3,040	,567	5,722
gl	2	2	2	2	2	2
Sig. asintótica	,525	,009	,090	,219	,753	,057

Se acepta la Ho para hemoglobina inicial y final, y para el hematocrito inicial, medio y final. NO existen diferencias significativas entre medianas entre los tratamientos. Sin embargo, existe diferencia de medianas en hemoglobina media. Para determinar qué tratamientos difieren, se aplicó prueba no paramétrica.

Prueba de Mann-Whitney para hemoglobina media

Tratamiento 1 vs Tratamiento 2

- Ho: La medianas son iguales.
- Ha: Las medianas no son iguales

Tabla 25: Prueba de Mann-Whitney entre Tratamiento 1 y 2

	Hemoglobina media
U de Mann-Whitney	23,000
W de Wilcoxon	143,000
Z	-2,653
Sig. asintótica (bilateral)	,008

- Las medianas son diferentes. $p < 0.05$.

Tratamiento 1 vs Tratamiento 3

- Ho: La medianas son iguales.
- Ha: Las medianas no son iguales

Tabla 26: Prueba de Mann-Whitney entre Tratamiento 1 y 3

	Hemoglobina media
U de Mann-Whitney	55,000
W de Wilcoxon	433,000
Z	-2,430
Sig. asintótica (bilateral)	,015

Las

medianas son diferentes, $p < 0.05$.

Tratamiento 2 vs Tratamiento 3

- Ho: La medianas son iguales.
- Ha: Las medianas no son iguales

Tabla 27 : Prueba de Mann-Whitney entre Tratamiento 2 y 3

	Hemoglobina media
U de Mann-Whitney	144,500
W de Wilcoxon	264,500
Z	-1,523
Sig. asintótica (bilateral)	,128

- Las medias son iguales, $p > 0.05$.

Prueba de ANOVA para eritrocitos

- Ho: La media de eritrocitos son iguales.
- Ha: Al menos una media de eritrocitos no es igual.

Tabla 28: Prueba de ANOVA de un factor para determinar diferencias entre promedios de eritrocitos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	
Eritrocitos inicial	Entre grupos	,191	2	,096	,623	,541
	Dentro de grupos	7,380	48	,154		
	Total	7,571	50			
Eritrocitos medio	Entre grupos	1,388	2	,694	6,962	,002
	Dentro de grupos	4,783	48	,100		
	Total	6,171	50			
Eritrocitos final	Entre grupos	1,218	2	,609	4,036	,024
	Dentro de grupos	7,241	48	,151		
	Total	8,459	50			

Según la tabla de ANOVA, hay diferencias significativas en los eritrocitos a la mitad y al final del experimento. Para los eritrocitos iniciales no hay diferencia significativa, las

medias son iguales. Para evaluar que tratamientos son diferentes se aplicó la prueba paramétrica de Scheffe, que permite una mejor discriminación cuando los grupos tienen diferente tamaño de muestra.

Prueba de Scheffe para eritrocitos intermedios

- Ho: Tratamiento 1 = Tratamiento 2 = Tratamiento 3
- Ha: Al menos uno de los promedios iniciales de eritrocitos no son iguales

Tabla 29: Prueba de Scheffe para determinar diferentes medias en los eritrocitos intermedios

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Tratamiento 3	27	1,6026	
Tratamiento 2	15	1,6033	
Tratamiento 1	9		2,0356
Sig.		1,000	1,000

- La media del tratamiento 2 es igual que el tratamiento 3, mientras que ambas difieren significativamente con la media del tratamiento 1.

Prueba de Scheffe para eritrocitos finales

- Ho: Tratamiento 1 = Tratamiento 2 = Tratamiento 3
- Ha: Al menos uno de los promedios iniciales de eritrocitos no son iguales

Tabla 30: Prueba de Scheffe para determinar diferentes medias en los eritrocitos finales

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Tratamiento 2	15	1,5020	
Tratamiento 3	27	1,7096	1,7096
Tratamiento 1	9		1,9644
Sig.		,376	,233

El tratamiento 3 no presenta diferencias significativas con T1 ni con el T2, no obstante, el T2 tiene diferencia significativa con T1.

Para hallar diferencias significativas dentro de un mismo tratamiento, acerca de la evolución de una variable afectada por la densidad de cultivo, se aplicó prueba T para muestras

relacionadas en las variables donde se encontró distribución normal, y prueba de Wilcoxon para datos que no cumplen con el supuesto de normalidad.

Prueba T para muestras relacionadas.

Tratamiento 1

Ho: Los promedios de eritrocitos o hemoglobina en T1 son iguales

Hp: Los promedios de eritrocitos y hemoglobina en T1 no son iguales

Tabla 31: Prueba T para muestras relacionadas de hemoglobina y eritrocitos en el tratamiento 1

	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Eritrocitos final - inicial	-,55333	,59178	,19726	-1,00821	-,09845	-2,805	8	,023
Hemoglobina final - inicial	-2,80667	1,53043	,51014	-3,98306	-1,63027	-5,502	8	,001

- Se rechaza la Ho de igualdad de promedios para eritrocitos y hemoglobina en T1. Los promedios de eritrocitos y de hemoglobina han sufrido variaciones significativas al final del experimento.

Tratamiento 2

Ho: Los promedios de eritrocitos y hemoglobina en T2 son iguales

Hp: Los promedios de eritrocitos y hemoglobina en T2 no son iguales

Tabla 32: Prueba T para muestras relacionadas de hemoglobina y eritrocitos en el tratamiento 2

	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
<i>Continuación</i>								

Eritrocitos final – inicial	-,93533	,42701	,11025	-1,17181	-,69886	-8,483	14	,000
Hemoglobina final - inicial	-3,16800	1,39725	,36077	-3,94177	-2,39423	-8,781	14	,000

- Se rechaza la Ho de igualdad de promedios para eritrocitos y hemoglobina en T2. Los promedios de eritrocitos y de hemoglobina han sufrido variaciones significativas al final del experimento.

Tratamiento 3

Ho: Los promedios de eritrocitos o hemoglobina en T3 son iguales

Hp: Los promedios de eritrocitos y hemoglobina en T3 no son iguales

Tabla 33: Prueba T para muestras relacionadas de hemoglobina y eritrocitos en el tratamiento 3

	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Eritrocitos final - inicial	-,64741	,59411	,11434	-,88243	-,41239	5,662	26	,000
Hemoglobina final - inicial	-3,20889	1,20122	,23117	-3,68408	-2,73370	-13,881	26	,000

a. Tratamiento = Tratamiento 3

- Se rechaza la Ho de igualdad de promedios para eritrocitos y hemoglobina en T3. Los promedios de eritrocitos y de hemoglobina han sufrido variaciones significativas al final del experimento.

Se aplicó la prueba de Wilcoxon para hallar diferencias significativas dentro de un mismo tratamiento en el hematocrito durante el experimento, ya que no presentó distribución normal.

Tratamiento 1

Ho: Los promedios de hematocrito en T1 son iguales

Hp: Los promedios de hematocrito en T1 no son iguales

Tabla 34: Prueba de Wilcoxon para datos no paramétricas relacionadas de hematocrito

	Hematocrito inicial - final
Z	-1,836 ^c
Sig. asintótica (bilateral)	,066

- Se acepta la Ho de igualdad de promedios para hematocrito en T1. Los promedios de hematocrito no han sufrido variaciones significativas al final del experimento.

Tratamiento 2

Ho: Los promedios de hematocrito en T2 son iguales

Hp: Los promedios de hematocrito en T2 no son iguales

Tabla 35: Prueba de Wilcoxon para datos no paramétricas relacionadas de hematocrito

	Hematocrito inicial - final
Z	-3,353 ^c
Sig. asintótica (bilateral)	,001

- Se rechaza la Ho de igualdad de promedios para hematocrito en T2. Los promedios de hematocrito han sufrido variaciones significativas al final del experimento.

Tratamiento 3

Ho: Los promedios de hematocrito en T3 son iguales

Hp: Los promedios de hematocrito en T3 no son iguales

Tabla 36: Prueba de Wilcoxon para muestras no paramétricas relacionadas de hematocrito

	Hematocrito inicial - final
Z	-3,797 ^c
Sig. asintótica (bilateral)	,000

- Se rechaza la Ho de igualdad de promedios para hematocrito en T3. Los promedios de hematocrito han sufrido variaciones significativas al final del experimento.

Prueba de Kruskal-Wallis

- Ho: La mediana de los parámetros hematológicos (VCM, HCM, CHCM) son iguales.

- Ha: Al menos una mediana de los parámetros hematológicos (VCM, HCM, CHCM) no es igual.

Tabla 37: Prueba de Kruskal-Wallis para índices hematométricos

	VCM inicial	VCM medio	VCM final	HCM inicial	HCM medio	HCM final	CHCM inicio	CHCM medio	CHCM final
Chi-cuadrado	2,175	5,002	9,490	,686	5,995	7,741	2,652	1,297	1,292
gl	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Sig. asintótica	,337	,082	,009	,709	,050	,021	,266	,523	,524

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Tratamiento

Se acepta la H_0 para VCM inicial, VCM medio, HCM inicial, HCM medio, CHCM inicial, CHCM, medio y CHCM final, señalando que no presentan diferencias estadísticamente significativas, por lo que se interpreta que las medianas son iguales; y para el VCM final y el HCM final existen diferencias significativas de las medianas entre los tratamientos. Para determinar qué tratamientos difieren, se aplicó prueba de Mann-Whitney.

Prueba de Mann-Whitney para VCM final

Tratamiento 1 vs Tratamiento 2

- H_0 : Las medianas son iguales.
- H_a : Las medianas no son iguales

Tabla 38: Prueba de Mann-Whitney para tratamiento 1 vs 2

	VCM final
U de Mann-Whitney	29,000
W de Wilcoxon	74,000
Z	-2,296
Sig. Asintótica (bilateral)	,022

a. Variable de agrupación: Tratamiento

b. No corregido para empates.

- Las medias son diferentes, $p > 0.05$.

Tratamiento 1 vs Tratamiento 3

- H_0 : Las medianas son iguales.
- H_a : Las medianas no son iguales

Tabla 39: Prueba de Mann-Whitney para tratamiento 1 vs 3

	VCM final
U de Mann-Whitney	121,000
W de Wilcoxon	166,000
Z	-,018
Sig. asintótica (bilateral)	,985

- Las medias no son diferentes, $p > 0.05$.

Tratamiento 2 vs Tratamiento 3

- Ho: Las medianas son iguales.
- Ha: Las medianas no son iguales

Tabla 40: Prueba de Mann-Whitney para tratamiento 1 vs 3

	VCM final
U de Mann-Whitney	92,000
W de Wilcoxon	470,000
Z	-2,901
Sig. asintótica (bilateral)	,004

- Las medias son diferentes, $p < 0.05$.

Prueba de Mann-Whitney para HCM final

Tratamiento 1 vs Tratamiento 2

- Ho: Las medianas son iguales.
- Ha: Las medianas no son iguales

Tabla 41: Prueba de Mann-Whitney para tratamiento 1 vs 2

	HCM final
U de Mann-Whitney	39,000
W de Wilcoxon	84,000
Z	-1,699
Sig. asintótica (bilateral)	,089

- Las medias no son diferentes, $p > 0.05$.

Tratamiento 1 vs Tratamiento 3

- Ho: Las medianas son iguales.
- Ha: Las medianas no son iguales

Tabla 42: Prueba de Mann-Whitney para tratamiento 1 vs 3

	HCM final
U de Mann-Whitney	106,500
W de Wilcoxon	151,500
Z	-,548
Sig. asintótica (bilateral)	,584

- Las medias no son diferentes, $p > 0.05$.

Tratamiento 2 vs Tratamiento 3

- Ho: La medianas son iguales.
- Ha: Las medianas no son iguales

Tabla 43: Prueba de Mann-Whitney para tratamiento 2 vs 3

	Hemog Corpuscular final
U de Mann-Whitney	97,000
W de Wilcoxon	475,000
Z	-2,769
Sig. asintótica (bilateral)	,006

a. Variable de agrupación: Tratamiento

- Las medias son diferentes, $p < 0.05$.

Anexo 15: Datos registrados de temperatura (°C) por cada tratamiento.

TEMPERATURA								
T1			T2			T3		
R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
29.1	27.9	26.7	24.5	25.1	25.7	26.7	26.9	26.8
29.2	28.3	27.3	23.4	25.2	26.9	27.8	27.8	27.8
29.5	28.3	27.1	29.3	27.9	26.4	27.4	27.6	27.5
29.2	28.1	27.0	29.7	27.7	25.7	27.2	27.8	27.5
29.4	28.4	27.4	30.1	28.0	25.9	27.4	27.8	27.6
29.6	28.6	27.6	29.7	29.0	28.2	26.6	28.8	27.7
30.0	29.6	29.1	31.0	30.8	30.5	29.0	29.9	29.5
30.0	29.5	28.9	29.9	29.4	28.9	28.3	29.1	28.7
30.4	30.0	29.7	31.2	31.0	30.8	29.3	30.0	29.6
30.4	30.1	29.9	31.0	30.8	30.6	29.9	30.3	30.1
29.5	28.4	27.2	30.3	29.8	29.3	28.7	30.0	29.4
29.9	29.6	29.2	30.9	30.3	29.8	29.1	30.3	29.7
29.4	29.1	28.8	30.0	29.5	29.0	28.3	29.0	28.7
29.2	28.9	28.6	29.9	29.2	28.4	28.0	29.3	28.7
30.2	30.1	29.9	31.8	30.9	29.9	29.3	30.7	30.0
29.3	29.1	28.8	30.2	29.6	28.9	28.3	29.6	29.0
29.5	29.3	29.0	30.0	29.6	29.1	28.6	29.3	29.0
30.4	30.1	29.8	30.8	30.6	30.4	29.5	29.7	29.6
30.0	29.9	29.7	30.7	30.5	30.2	29.5	29.9	29.7
29.5	29.2	28.8	30.0	29.5	29.0	28.5	29.0	28.8
29.3	29.2	29.0	29.7	29.4	29.1	28.7	29.1	28.9
29.4	29.2	29.0	29.9	29.5	29.0	28.7	29.1	28.9
29.5	29.3	29.0	30.0	29.5	29.0	28.7	29.5	29.1
30.0	29.7	29.4	30.8	30.3	29.7	30.5	29.3	29.9
29.7	29.4	29.1	30.3	29.7	29.1	30.5	28.7	29.6
30.6	30.6	30.6	31.5	31.0	30.5	32.3	31.0	31.7
29.6	29.6	29.6	30.6	29.8	29.0	29.3	30.2	29.8
28.3	28.4	28.4	28.4	28.4	28.3	28.4	28.8	28.6
26.5	26.5	26.4	26.2	26.5	26.7	26.7	26.8	26.8
29.7	29.5	29.2	30.9	30.2	29.5	28.7	29.5	29.1
30.4	30.2	30.0	31.6	30.9	30.2	29.5	30.1	29.8
27.2	27.1	27.0	30.7	29.9	29.1	27.7	29.7	28.7
29.6	29.2	28.8	30.5	29.7	28.9	30.2	29.7	30.0
29.9	30.0	30.0	30.9	30.3	29.6	30.1	30.3	30.2
30.1	30.0	29.9	30.2	29.6	29.0	30.2	29.8	30.0
29.5	29.3	29.0	30.1	29.3	28.4	29.3	29.5	29.4
30.5	30.4	30.2	31.2	30.9	30.5	30.7	30.4	30.6
29.0	28.8	28.5	30.0	29.4	28.8	29.5	28.1	28.8
29.6	29.3	29.0	30.1	29.4	28.7	29.5	27.2	28.4
29.7	29.3	28.9	30.5	29.9	29.3	29.7	29.4	29.6
29.9	29.7	29.4	30.6	30.0	29.4	30.1	30.1	30.1

Anexo 16: Datos registrados de oxígeno disuelto (mg/L) por cada tratamiento.

OXÍGENO DISUELTO								
T1			T2			T3		
R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
7.13	7.34	7.54	7.59	7.52	7.44	6.78	6.92	6.85
7.33	7.48	7.62	8.01	7.68	7.34	6.68	7.00	6.84
6.57	6.77	6.96	6.65	6.11	5.57	3.57	3.81	3.69
7.24	7.37	7.49	6.64	6.94	7.24	6.46	6.63	6.55
7.41	7.51	7.61	6.85	7.12	7.39	6.82	6.88	6.85
7.10	7.34	7.58	6.21	6.69	7.17	6.97	6.71	6.84
6.73	7.03	7.32	6.01	6.30	6.59	6.07	5.95	6.01
6.80	6.81	6.81	6.77	6.44	6.10	4.97	5.17	5.07
6.91	6.88	6.86	6.22	6.23	6.25	5.65	5.55	5.60
6.84	6.86	6.88	6.07	6.06	6.06	5.38	5.82	5.61
7.22	7.39	7.55	6.77	6.71	6.64	6.25	6.35	6.30
7.07	7.13	7.19	6.26	6.33	6.39	6.27	5.93	6.10
7.21	7.23	7.24	6.22	6.53	6.83	6.67	5.99	6.33
7.30	7.28	7.26	5.87	6.39	6.91	6.19	5.92	6.06
6.99	6.98	6.97	6.66	6.40	6.13	5.53	4.77	5.15
7.23	7.23	7.23	6.78	6.80	6.82	6.69	6.23	6.46
7.27	7.28	7.29	6.70	6.80	6.90	6.25	6.42	6.34
7.23	7.27	7.31	6.21	6.36	6.50	6.59	6.40	6.50
7.02	7.01	7.00	6.74	6.36	5.98	5.77	5.39	5.58
7.28	7.31	7.34	5.82	6.23	6.63	6.59	6.35	6.47
7.08	7.06	7.04	6.80	6.26	5.72	5.54	5.29	5.42
7.28	7.28	7.27	6.67	6.61	6.55	6.49	6.52	6.51
7.24	7.22	7.20	6.06	6.38	6.69	5.98	6.26	6.12
6.93	6.85	6.76	6.39	6.36	6.32	5.57	5.60	5.59
6.99	6.93	6.87	5.78	6.23	6.67	5.87	6.61	6.24
6.75	6.78	6.81	6.16	6.14	6.12	3.73	5.04	4.39
7.10	7.08	7.05	6.20	6.39	6.57	5.87	5.54	5.71
7.10	7.14	7.18	5.61	6.01	6.41	5.67	5.62	5.65
7.52	7.57	7.62	6.78	6.90	7.01	6.22	6.16	6.19
7.03	7.11	7.19	5.35	5.75	6.14	5.55	5.28	5.42
5.22	5.24	5.25	3.00	3.35	3.70	3.40	3.20	3.30
7.44	7.60	7.75	6.48	6.81	7.13	6.60	6.63	6.62
7.04	7.16	7.27	6.40	6.75	7.09	5.72	6.20	5.96
6.90	6.86	6.82	5.93	6.09	6.24	5.24	5.07	5.16
7.05	7.09	7.12	6.78	6.79	6.80	6.29	6.29	6.29
7.24	7.19	7.13	6.71	6.80	6.88	6.24	5.78	6.01
7.26	7.29	7.31	6.57	6.59	6.61	6.12	6.20	6.16
7.12	7.06	6.99	6.47	6.27	6.06	5.23	5.69	5.46
7.24	7.16	7.07	6.68	6.71	6.74	5.94	6.34	6.14
7.31	7.36	7.40	6.67	6.75	6.83	5.83	6.22	6.03
7.14	7.17	7.20	6.54	6.61	6.67	5.58	6.18	5.88

Anexo 17: Datos registrados del porcentaje de saturación (%) por cada tratamiento.

PORCENTAJE DE SATURACIÓN								
T1			T2			T3		
R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
95.2	95.9	96.5	93.4	93.5	93.6	86.7	89.0	87.9
97.9	98.2	98.4	96.3	95.3	94.2	87.0	91.3	89.2
88.4	89.2	89.9	75.3	73.1	70.9	46.5	49.8	48.2
96.7	96.6	96.4	89.9	90.4	90.9	83.6	86.5	85.1
99.5	99.2	98.8	90.3	91.8	93.3	88.4	89.9	89.2
95.3	96.9	98.5	92.7	93.5	94.2	89.0	89.2	89.1
92.8	95.4	98.0	86.3	88.5	90.6	82.3	81.1	81.7
92.5	91.6	90.7	81.6	81.5	81.4	65.6	69.1	67.4
94.2	93.5	92.9	87.1	86.1	85.0	75.6	74.3	75.0
93.7	93.7	93.7	85.3	84.3	83.2	72.8	79.0	76.3
97.3	97.6	97.8	89.3	89.3	89.2	83.2	86.4	84.8
96.4	96.6	96.8	87.4	87.2	87.0	87.3	82.0	84.7
97.1	96.9	96.6	91.1	91.3	91.5	88.2	80.1	84.2
97.7	97.1	96.5	84.6	88.0	91.4	81.4	79.7	80.6
95.9	95.6	95.3	82.9	83.3	83.7	74.7	66.0	70.4
97.2	97.0	96.7	91.2	91.4	91.6	88.7	84.4	86.6
97.7	97.6	97.4	92.4	92.3	92.2	82.8	86.3	84.6
99.5	99.6	99.7	92.9	91.2	89.5	89.3	87.1	88.2
95.9	95.6	95.2	86.0	84.0	82.0	78.2	73.6	75.9
98.4	98.3	98.1	92.1	91.0	89.9	87.7	85.3	86.5
95.5	95.0	94.4	79.1	78.0	76.9	73.9	71.2	72.6
98.2	97.8	97.3	92.7	90.5	88.2	86.6	87.4	87.0
97.6	97.1	96.6	91.1	90.5	89.9	79.6	84.6	82.1
95.0	93.6	92.2	84.0	84.9	85.8	76.7	75.7	76.2
95.1	94.0	92.9	87.4	88.4	89.4	80.6	87.6	84.1
92.7	93.2	93.6	80.7	82.3	83.9	52.7	69.8	61.3
95.8	95.5	95.2	84.7	86.5	88.3	79.1	75.7	77.4
94.4	94.9	95.4	82.4	83.7	85.0	75.4	75.1	75.3
95.4	96.6	97.7	74.1	78.5	82.9	73.9	71.3	72.6
96.6	96.6	96.6	89.5	92.7	95.8	87.4	90.0	88.7
95.1	97.7	100.2	87.9	91.3	94.7	78.1	83.9	81.0
94.1	95.5	96.8	82.3	83.5	84.6	71.7	69.7	70.7
96.1	94.7	93.2	92.6	91.8	90.9	85.8	85.3	85.6
97.5	97.1	96.7	91.4	91.2	90.9	83.7	78.1	80.9
100.1	97.9	95.7	91.6	91.8	92.0	84.5	85.3	84.9
95.4	97.9	100.4	88.2	84.6	81.0	70.7	75.1	72.9
97.9	95.4	92.9	91.0	90.4	89.8	80.1	82.8	81.5
99.1	97.2	95.2	91.6	91.7	91.7	79.0	83.9	81.5
97.4	98.3	99.1	90.3	90.2	90.0	76.4	84.5	80.5

Anexo 18: Datos registrados de conductividad (mS/cm) por cada tratamiento.

CONDUCTIVIDAD								
T1			T2			T3		
R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
4.67	4.76	4.84	4.67	4.80	4.92	4.87	4.65	4.76
5.11	5.02	4.92	4.95	5.17	5.38	5.37	5.15	5.26
5.14	5.03	4.92	5.03	5.12	5.20	5.33	5.14	5.24
5.20	5.08	4.96	5.11	5.16	5.20	5.42	5.25	5.34
5.27	5.14	5.01	5.25	5.31	5.36	5.42	5.34	5.38
5.23	5.11	4.99	5.29	5.28	5.26	5.53	5.36	5.45
5.51	5.35	5.19	4.84	5.22	5.59	5.70	5.56	5.63
5.53	5.36	5.19	4.86	5.22	5.58	5.69	5.58	5.64
5.52	5.37	5.21	4.90	5.22	5.54	5.72	5.62	5.67
5.63	5.46	5.28	4.94	5.35	5.76	5.85	5.71	5.78
5.57	5.31	5.04	4.98	5.29	5.60	5.78	5.73	5.76
5.71	5.40	5.08	5.04	5.43	5.81	5.95	5.82	5.89
5.81	5.42	5.02	5.10	5.53	5.96	6.05	5.91	5.98
5.83	5.44	5.05	5.14	5.56	5.98	6.09	5.96	6.03
5.91	5.51	5.10	5.19	5.63	6.06	6.17	6.05	6.11
5.73	5.41	5.08	5.07	5.45	5.83	6.01	6.00	6.01
5.90	5.55	5.20	5.30	5.70	6.09	6.26	6.31	6.29
5.76	5.43	5.09	5.09	5.49	5.89	6.00	6.00	6.00
5.89	5.55	5.20	5.23	5.62	6.01	6.14	6.20	6.17
6.01	5.66	5.30	5.33	5.75	6.17	6.29	6.37	6.33
6.09	5.72	5.35	5.39	5.87	6.34	6.42	6.46	6.44
5.98	5.70	5.42	5.29	5.64	5.98	6.28	6.25	6.27
6.13	5.84	5.54	5.47	5.84	6.20	6.50	6.47	6.49
6.28	5.99	5.69	5.63	6.00	6.36	6.67	6.66	6.67
5.93	5.84	5.75	4.63	5.47	6.31	5.41	5.38	5.40
6.00	5.90	5.80	4.68	5.56	6.44	5.51	5.70	5.61
6.15	6.02	5.89	4.91	5.73	6.54	5.83	5.78	5.81
5.98	5.88	5.78	4.95	5.71	6.47	5.81	5.84	5.83
6.03	5.94	5.84	5.03	5.72	6.40	5.87	5.94	5.91
6.17	6.05	5.93	5.13	5.86	6.59	6.04	5.85	5.95
5.82	5.30	4.78	5.20	5.23	5.26	5.76	5.39	5.58
5.94	5.40	4.86	5.27	5.33	5.39	5.96	5.49	5.73
5.95	5.42	4.89	5.34	5.39	5.43	5.95	5.52	5.74
5.98	5.45	4.91	5.35	5.43	5.50	6.02	5.56	5.79
6.09	5.54	4.98	5.43	5.53	5.62	6.15	5.69	5.92
5.89	5.26	4.63	5.21	5.33	5.45	5.54	5.09	5.32
6.15	5.49	4.82	5.25	5.43	5.60	5.70	5.27	5.49
6.18	5.51	4.84	5.29	5.47	5.64	5.75	5.27	5.51
6.03	5.40	4.77	4.93	5.12	5.30	5.41	5.02	5.22
6.11	5.48	4.84	5.01	5.21	5.41	5.53	5.11	5.32

Anexo 19: Datos registrados de los sólidos sedimentables (mL/L) por cada tratamiento.

SÓLIDOS SEDIMENTABLES								
T1			T2			T3		
R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
31	37	43	49	45	40	60	50	55
26	26	25	12	20	28	22	16	19
35	34	33	12	24	35	28	30	29
42	40	37	15	23	40	36	36	36
40	42	43	24	34	44	50	32	41
48	39	30	32	38	54	72	44	58
14	33	52	37	31	24	30	21	25
26	30	33	26	28	30	37	34	35
42	36	30	40	42	44	42	50	46
30	27	23	20	25	30	40	30	35
60	57	54	32	42	52	54	32	43
19	21	23	30	33	35	22	33	27
36	25	14	21	28	35	20	30	25
45	33	21	28	39	50	29	35	32
28	27	25	42	31	20	35	48	42
30	30	29	30	33	35	46	24	35
36	32	28	52	46	40	30	42	36
30	39	48	36	26	15	40	26	33
28	27	26	34	25	15	17	34	26
54	42	30	68	46	24	33	62	48
30	25	20	44	37	30	40	37	38
20	30	40	14	22	30	50	34	42
25	35	44	12	12	31	50	38	44
11	19	26	29	40	50	34	21	28
25	31	36	38	36	34	25	64	44
33	32	30	60	48	37	40	37	38
56	51	46	10	30	50	60	44	52
35	48	60	36	29	20	20	35	28
46	40	33	34	34	34	37	66	52
42	46	50	25	32	39	58	70	66
44	29	13	33	36	40	35	27	31
37	32	27	44	43	42	38	68	53
36	33	30	48	28	8	30	58	44
46	27	7	70	46	22	60	100	80
68	42	15	42	38	34	26	62	44
86	53	20	48	48	48	32	66	49
36	38	40	44	40	36	44	80	62
42	51	60	38	38	37	42	33	38
86	61	35	70	70	70	80	64	72
40	42	44	35	33	30	40	66	53
35	53	70	30	28	26	20	18	19
54	37	19	54	57	60	66	30	48
40	33	25	50	55	60	50	36	43

Anexo 20: Datos registrados de los compuestos nitrogenados (mg/L) por cada tratamiento.

NITRATO								
T1			T2			T3		
R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
99.7	103.8	103.8	116.1	121.9	127.6	126.6	125.2	125.9
89.6	85.9	85.9	92.4	100.9	109.3	109.1	101.6	105.4
112.2	110.5	110.5	141.8	137.7	133.5	144.0	133.4	138.7
118.0	118.5	118.5	125.1	127.8	130.4	192.1	144.4	168.3
127.2	121.6	121.6	140.6	151.0	161.4	175.4	164.3	169.9
133.7	127.1	127.1	139.8	156.4	172.9	162.6	181.9	172.3
161.5	160.4	160.4	90.4	134.1	177.8	128.4	151.5	140.0
166.7	163.2	163.2	114.4	153.3	192.1	142.7	160.0	151.4
170.1	159.9	159.9	125.9	163.5	201.0	181.7	169.5	175.6
127.4	103.5	103.5	122.4	128.7	135.0	157.4	116.5	137.0
124.3	98.6	98.6	134.7	138.0	141.3	178.0	140.8	159.4
111.6	100.2	100.2	118.4	113.4	108.3	172.1	121.8	147.0
NAT								
T1			T2			T3		
R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0.96	0.96	0.96	1.94	2.03	2.12	1.72	1.48	1.60
0.99	0.97	0.94	2.82	2.67	2.52	2.90	2.38	2.64
1.27	1.18	1.08	1.81	1.65	1.48	1.99	1.81	1.90
1.29	1.21	1.12	1.57	1.72	1.86	2.49	2.48	2.49
1.35	1.22	1.08	1.93	2.00	2.07	2.57	2.51	2.54
4.26	3.68	3.10	4.05	4.23	4.41	4.69	4.00	4.35
2.03	1.78	1.53	0.70	1.36	2.02	2.21	1.47	1.84
1.61	1.59	1.56	1.48	1.93	2.38	2.95	2.41	2.68
1.41	1.42	1.42	1.90	2.03	2.15	3.27	2.91	3.09
1.31	1.05	0.79	1.81	1.92	2.03	2.26	2.07	2.17
1.54	1.21	0.88	2.08	1.95	1.81	2.59	2.46	2.53
0.90	0.88	0.86	1.62	1.97	2.32	2.56	1.95	2.26
NH3								
T1			T2			T3		
R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0.07	0.06	0.06	0.10	0.07	0.04	0.03	0.03	0.03
0.07	0.06	0.06	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
0.09	0.09	0.08	0.04	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01
0.26	0.24	0.23	0.12	0.08	0.05	0.06	0.06	0.06
0.10	0.09	0.08	0.14	0.10	0.05	0.06	0.06	0.06
0.86	0.73	0.60	0.30	0.31	0.31	0.33	0.28	0.30
0.41	0.35	0.29	0.05	0.05	0.05	0.05	0.00	0.03
0.33	0.32	0.32	0.11	0.14	0.18	0.07	0.02	0.05
0.29	0.28	0.27	0.14	0.15	0.16	0.08	0.20	0.14
0.09	0.06	0.02	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05
0.30	0.23	0.17	0.16	0.14	0.13	0.06	0.05	0.06
0.18	0.17	0.17	0.12	0.15	0.17	0.06	0.05	0.06

Anexo 21: Datos registrados de pH por cada tratamiento.

pH									
Fechas	T1			T2			T3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
27-oct	7.87	7.89	7.90	7.44	7.44	7.44	7.29	7.38	7.34
30-oct	8.23	8.26	8.28	8.22	8.19	8.16	7.84	7.94	7.89
31-oct	8.08	8.09	8.09	7.92	7.78	7.64	7.36	7.42	7.39
02-nov	7.75	7.75	7.75	7.00	6.94	6.88	6.80	6.90	6.85
06-nov	8.00	8.00	8.00	7.30	7.30	7.30	7.10	7.20	7.15
10-nov	8.48	8.44	8.40	7.79	7.70	7.60	7.38	7.44	7.41
17-nov	7.81	7.91	8.00	7.30	7.26	7.22	7.20	7.22	7.21
27-nov	8.48	8.44	8.40	8.10	8.08	8.05	7.81	7.85	7.83
01-dic	8.24	8.24	8.24	7.77	7.77	7.77	7.58	7.62	7.60
08-dic	8.60	8.49	8.37	7.68	7.82	7.96	7.74	7.85	7.80
15-dic	8.04	7.86	7.68	7.67	7.61	7.55	7.32	7.38	7.35
18-dic	8.46	8.44	8.41	7.94	7.95	7.95	7.67	7.48	7.58
22-dic	8.66	8.65	8.64	7.77	7.80	7.83	7.39	7.60	7.50

Anexo 22: Datos registrados de la alcalinidad (mg CaCO₃/L) por cada tratamiento.

ALCALINIDAD									
	T1			T2			T3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
27-Oct	41.18	41.18	41.18	30.89	30.89	30.89	30.89	30.89	30.89
3-Nov	113.25	97.80	82.36	113.25	102.95	92.66	92.66	82.36	87.51
6-Nov	80.07	91.51	102.95	82.36	77.21	72.07	61.77	61.77	61.77
24-Nov	93.14	93.62	94.10	62.01	62.70	63.39	46.57	37.21	41.89
27-Nov	145.66	147.00	148.33	125.51	121.57	117.63	114.10	108.09	111.10
1-Dic	98.89	96.99	95.08	83.67	83.67	83.67	83.67	91.28	87.48
4-Dic	79.87	79.87	79.87	68.46	68.46	68.46	57.05	68.46	62.76
8-Dic	114.10	119.81	125.51	91.28	102.69	114.10	85.58	91.28	88.43
15-Dic	91.28	88.43	85.58	68.46	71.31	74.17	62.76	68.46	65.61
18-Dic	125.51	125.51	125.51	102.69	102.69	102.69	114.10	96.99	105.54
22-Dic	114.10	114.10	114.10	68.46	74.17	79.87	45.64	57.05	51.35

Anexo 23: Datos resumen de las medidas de peso individual (g), biomasa (g) y carga (Kg/m³), por tratamiento

		T1			T2			T3		
	Fechas	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
PESO	28-10	87.68	85.63	86.62	87.21	90.24	92.240	88.85	88.05	93.78
	12-11	91.37	91.93	92.50	94.81	95.94	96.43	94.68	94.48	4032.60
	26-11	88.09	87.96	87.83	95.15	94.61	102.00	93.77	93.80	88.50
	10-12	91.04	89.94	88.83	95.16	100.22	105.27	98.15	96.07	94.43
	23-12	99.06	95.56	92.06	105.87	109.13	112.40	105.12	109.78	96.75
BIOMASA	28-10	789.15	770.70	779.58	2093.14	2075.44	2121.52	3820.75	3874.30	108.68
	12-11	822.30	827.40	832.50	2275.52	2206.70	2217.86	4071.20	4062.75	3805.59
	26-11	792.80	791.65	790.50	2188.45	2176.05	2346.00	3938.23	4033.20	4060.28
	10-12	819.40	809.45	799.5	2188.70	2305.00	2421.30	4024.05	4131.20	4160.40
	23-12	891.50	860.00	828.5	2434.90	2510.00	2585.10	4309.90	4610.60	4564.39
CARGA	28-10	3.16	3.08	3.12	8.37	8.30	8.49	15.28	15.50	15.22
	12-11	3.29	3.31	3.33	9.10	8.83	8.87	16.28	16.25	16.24
	26-11	3.17	3.17	3.16	8.75	8.70	9.38	15.75	16.13	16.13
	10-12	3.28	3.24	3.20	8.75	9.22	9.69	16.10	16.52	16.64
	23-12	3.57	3.44	3.31	9.74	10.04	10.34	17.24	18.44	18.26

Anexo 24: Datos obtenidos para determinación de cortisol (ng/mL) y glucosa (mg/dL).

	CORTISOL			GLUCOSA		
	28-10	26-11	23-12	28-10	26-11	23-12
T1R1-1	42.57	27.44	25.69	64.80	53.58	56.85
T1R1-2	169.15	21.86	39.83	71.34	59.97	46.57
T1R1-3	105.86	30.63	25.65	68.07	35.98	49.69
T1R2-1	162.74	47.38	41.70	66.82	58.88	62.62
T1R2-2	115.80	28.80	25.69	63.59	54.28	49.77
T1R2-3	68.86	23.53	24.50	60.36	45.25	46.65
T1R3-1	125.74	64.13	25.69	59.11	54.98	68.38
T1R3-2	156.33	30.16	43.58	55.92	57.79	49.84
T1R3-3	95.15	25.20	23.36	62.31	54.52	46.73
T2R1-1	18.08	36.90	46.96	56.23	54.05	32.71
T2R1-2	42.84	97.44	40.95	46.11	33.18	24.61
T2R1-3	82.02	229.34	59.77	77.73	42.06	41.59
T2R1-4	134.20	26.02	52.11	42.83	41.90	39.72
T2R1-5	17.94	46.31	20.95	50.62	60.44	35.83
T2R2-1	133.84	156.71	72.55	76.19	56.23	43.52
T2R2-2	92.05	83.90	65.95	64.29	50.91	37.94
T2R2-3	64.14	39.21	44.70	53.65	43.56	33.97
T2R2-4	36.39	33.16	34.86	48.49	36.71	31.83
T2R2-5	29.24	25.34	23.20	45.40	30.23	24.88
T2R3-1	54.69	32.11	85.33	56.67	45.07	30.95
T2R3-2	133.48	70.35	28.77	50.87	47.78	25.15
T2R3-3	85.43	29.42	25.44	72.34	52.03	45.45
T2R3-4	102.09	24.67	79.80	74.66	27.27	32.11
T2R3-5	40.53	84.07	42.44	47.97	31.53	36.17

T3R1-1	110.75	36.92	27.79	43.91	72.15	50.30
T3R1-2	98.60	48.30	22.74	74.08	114.70	57.20
T3R1-3	76.11	79.08	91.74	63.64	81.04	43.39
T3R1-4	56.65	86.36	27.79	67.31	67.89	31.95
T3R1-5	58.58	55.19	29.14	58.61	58.03	37.28
T3R1-6	69.23	80.69	17.79	46.62	72.15	45.17
T3R1-7	67.91	86.56	20.85	53.38	38.88	45.76
T3R1-8	39.11	72.90	26.90	48.74	72.15	32.94
T3R1-9	104.96	24.73	22.82	58.80	59.96	63.12
T3R2-1	42.92	70.13	41.19	32.35	46.75	45.36
T3R2-2	35.94	39.87	68.87	39.45	58.19	59.17
T3R2-3	87.10	24.56	103.31	78.11	72.58	45.76
T3R2-4	134.68	23.59	27.33	42.21	68.24	34.52
T3R2-5	63.23	31.30	54.53	82.05	51.48	62.92
T3R2-6	44.00	34.68	39.50	48.92	66.07	42.80
T3R2-7	57.76	36.92	22.36	87.97	49.70	52.47
T3R2-8	50.94	36.92	58.91	115.58	66.67	72.39
T3R2-9	42.49	26.74	32.29	76.73	57.20	33.93
T3R3-1	122.72	78.35	97.52	94.83	93.64	67.75
T3R3-2	96.03	63.12	49.00	77.64	74.64	60.06
T3R3-3	80.91	58.81	43.35	72.84	69.41	54.73
T3R3-4	66.94	58.00	41.16	68.45	69.11	49.11
T3R3-5	59.43	53.79	34.05	67.67	65.17	45.46
T3R3-6	51.29	43.25	31.16	51.15	62.55	44.38
T3R3-7	56.08	37.52	27.52	45.48	55.72	40.04
T3R3-8	49.57	30.74	24.09	43.03	53.87	33.73
T3R3-9	37.52	24.16	20.08	38.13	42.81	32.94

Anexo 25: Datos obtenidos para el análisis de los parámetros hematológicos.

	28-10-15			26-11-15			23-12-15		
	HB	HTO	RBC	HB	HTO	RBC	HB	HTO	RBC
T1R1-1	9.32	44.0	1.62	7.61	23.5	1.88	5.67	38.0	1.95
T1R1-2	9.31	45.0	1.97	7.07	39.0	2.05	3.73	28.0	1.47
T1R1-3	10.39	48.0	2.81	7.09	38.0	1.98	7.07	41.0	2.19
T1R2-1	9.66	46.0	2.42	7.70	30.8	2.02	5.98	38.5	1.75
T1R2-2	9.02	46.0	2.38	6.74	35.5	2.01	4.63	36.5	1.95
T1R2-3	9.56	47.00	2.65	7.72	42.5	2.55	6.75	47.5	2.36
T1R3-1	10.00	48.0	3.22	7.78	38.0	2.16	6.29	39.0	1.54
T1R3-2	8.74	47.0	2.78	6.41	32.0	1.96	5.53	45.0	2.43
T1R3-3	8.74	46.0	2.49	8.35	47.0	3.12	6.43	54.0	2.53
T2R1-1	11.36	43.5	3.08	5.48	31.8	1.55	6.09	40.0	1.22
T2R1-2	8.88	44.0	2.72	6.01	29.0	1.74	3.91	20.0	1.07
T2R1-3	8.45	34.5	2.00	5.05	36.0	1.29	5.69	37.0	1.50
T2R1-4	8.89	42.5	2.35	4.96	29.0	1.62	4.79	31.0	1.11
T2R1-5	8.97	45.5	2.10	5.90	33.0	1.56	5.46	34.0	1.73
T2R2-1	10.46	56.5	2.89	6.54	31.4	1.65	5.84	40.0	1.70
T2R2-2	9.12	51.0	2.25	5.62	31.00	1.65	5.79	27.5	1.16
T2R2-3	8.09	45.8	2.28	5.39	38.3	1.45	6.47	38.5	1.64

T2R2-4	8.38	48.0	2.54	6.19	31.3	1.70	5.68	35.0	1.49
T2R2-5	8.58	41.8	2.24	5.98	29.8	1.58	5.02	34.5	1.53
T2R3-1	9.55	69.5	2.70	7.60	31.0	1.76	5.59	40.0	2.18
T2R3-2	9.37	58.0	1.79	5.22	33.0	1.55	7.66	35.0	1.24
T2R3-3	7.74	57.0	2.56	5.72	40.5	1.60	7.26	40.0	1.78
T2R3-4	7.88	53.5	2.73	7.41	33.5	1.79	6.57	39.0	1.86
T2R3-5	8.18	38.0	2.39	6.06	26.5	1.60	4.58	35.0	1.32
T3R1-1	9.69	38.5	3.18	6.43	27.0	1.71	5.16	30.0	1.58
T3R1-2	9.54	30.0	3.09	7.14	42.0	1.80	5.12	29.0	1.55
T3R1-3	9.17	23.5	2.52	5.93	31.0	1.95	6.30	45.0	2.64
T3R1-4	9.79	37.0	1.92	6.13	40.5	1.55	4.30	27.0	0.97
T3R1-5	7.69	54.5	2.62	6.49	43.0	2.14	4.30	26.0	0.99
T3R1-6	10.29	44.5	2.28	7.00	39.5	1.74	4.76	29.0	1.22
T3R1-7	6.49	49.5	1.57	5.63	36.0	1.24	3.78	30.0	1.30
T3R1-8	8.43	49.5	2.20	5.72	31.0	1.09	5.27	38.0	1.83
T3R1-9	9.40	54.5	1.68	5.87	34.0	1.44	6.64	30.5	2.54
T3R2-1	9.08	43.5	2.44	5.36	34.0	1.29	6.09	43.0	1.72
T3R2-2	8.26	49.0	2.20	9.29	29.5	1.75	6.66	43.5	1.91
T3R2-3	7.69	30.0	1.93	5.86	18.0	1.16	5.29	18.0	1.53
T3R2-4	7.64	47.0	2.28	6.18	43.0	1.65	6.84	35.0	2.31
T3R2-5	7.89	45.0	2.63	7.00	31.0	1.82	5.52	29.0	1.84
T3R2-6	8.52	47.5	2.37	6.21	25.5	1.99	6.09	32.0	1.58
T3R2-7	9.86	46.0	2.58	5.32	29.5	1.57	5.38	21.0	1.64
T3R2-8	9.88	37.5	2.74	6.07	31.0	1.37	5.09	39.0	1.64
T3R2-9	7.67	45.5	2.18	5.02	30.0	1.56	6.64	28.0	1.97
T3R3-1	9.39	41.0	2.81	5.89	30.5	1.50	5.63	36.5	1.65
T3R3-2	8.90	39.5	2.64	8.21	35.8	1.78	5.89	36.3	1.73
T3R3-3	8.43	26.8	2.22	5.89	24.5	1.56	5.79	31.5	2.08
T3R3-4	8.71	42.0	2.10	6.16	41.8	1.60	5.57	31.0	1.64
T3R3-5	7.79	49.8	2.63	6.74	37.0	1.98	4.91	27.5	1.42
T3R3-6	9.41	46.0	2.33	6.60	32.5	1.86	5.42	30.5	1.40
T3R3-7	8.18	47.8	2.07	5.47	32.8	1.41	4.58	25.5	1.47
T3R3-8	9.15	43.5	2.47	5.89	31.0	1.23	5.18	38.5	1.73
T3R3-9	8.54	50.0	1.93	5.45	32.0	1.50	6.64	29.3	2.26

	28-10-15			26-11-15			23-12-15		
	VCM	HCM	CHCM	VCM	HCM	CHCM	VCM	HCM	CHCM
T1R1-1	271.60	57.55	21.19	125.33	40.60	32.40	194.62	29.05	14.92
T1R1-2	228.14	47.19	20.68	190.24	34.51	18.14	191.13	25.46	13.32
T1R1-3	170.67	36.93	21.64	191.92	35.80	18.66	187.43	32.34	17.25
T1R2-1	190.18	39.95	21.01	152.32	38.13	25.03	220.47	34.24	15.53
T1R2-2	193.58	37.97	19.62	177.06	33.63	18.99	187.54	23.79	12.69
T1R2-3	177.44	36.10	20.35	166.59	30.26	18.17	201.38	28.62	14.21
T1R3-1	149.18	31.09	20.84	175.72	35.99	20.48	253.25	40.83	16.12
T1R3-2	169.06	31.43	18.59	163.27	32.71	20.03	185.38	22.79	12.29
T1R3-3	185.11	35.16	19.00	150.52	26.75	17.77	213.44	25.40	11.90
T2R1-1	141.46	36.94	26.11	204.51	35.31	17.27	327.20	49.79	15.22
T2R1-2	161.62	32.61	20.17	166.43	34.49	20.73	186.48	36.50	19.57
T2R1-3	172.93	42.33	24.48	279.07	39.18	14.04	247.08	37.97	15.37
T2R1-4	180.66	37.80	20.92	179.01	30.63	17.11	279.91	43.28	15.46

T2R1-5	217.18	42.81	19.71	211.88	37.90	17.89	196.25	31.49	16.05
T2R2-1	195.84	36.24	18.51	189.72	39.55	20.84	235.29	34.36	14.60
T2R2-2	226.29	40.48	17.89	188.45	34.15	18.12	238.10	50.10	21.04
T2R2-3	200.77	35.51	17.68	264.48	37.24	14.08	234.76	39.47	16.81
T2R2-4	188.79	32.97	17.47	183.42	36.32	19.80	235.69	38.24	16.23
T2R2-5	186.18	38.24	20.54	188.74	37.93	20.10	226.04	32.87	14.54
T2R3-1	257.88	35.45	13.75	176.64	43.29	24.51	183.70	25.69	13.99
T2R3-2	324.93	52.49	16.15	213.25	33.76	15.83	282.83	61.89	21.88
T2R3-3	222.44	30.19	13.57	252.73	35.68	14.12	224.40	40.72	18.15
T2R3-4	195.79	28.82	14.72	187.41	41.47	22.13	209.40	35.25	16.83
T2R3-5	159.00	34.24	21.53	166.14	37.97	22.85	265.15	34.67	13.08
T3R1-1	120.97	30.46	25.18	157.66	37.53	23.80	190.17	32.73	17.21
T3R1-2	97.24	30.92	31.80	233.01	39.59	16.99	186.80	32.96	17.64
T3R1-3	93.35	36.42	39.02	159.18	30.47	19.14	170.62	23.90	14.01
T3R1-4	192.46	50.90	26.45	262.14	39.70	15.14	279.79	44.56	15.92
T3R1-5	207.82	29.32	14.11	200.93	30.32	15.09	261.96	43.32	16.54
T3R1-6	195.18	45.15	23.13	226.69	40.15	17.71	237.70	39.03	16.42
T3R1-7	316.29	41.46	13.11	289.74	45.27	15.63	230.33	28.99	12.59
T3R1-8	225.00	38.32	17.03	285.06	52.57	18.44	208.22	28.88	13.87
T3R1-9	324.89	56.04	17.25	236.93	40.92	17.27	119.96	26.12	21.78
T3R2-1	178.64	37.28	20.87	264.08	41.65	15.77	249.64	35.34	14.16
T3R2-2	222.98	37.59	16.86	168.81	53.18	31.50	227.75	34.86	15.30
T3R2-3	155.44	39.84	25.63	154.84	50.38	32.53	118.03	34.66	29.37
T3R2-4	205.91	33.49	16.26	261.40	37.57	14.37	151.35	29.59	19.55
T3R2-5	171.27	30.03	17.53	170.10	38.39	22.57	157.39	29.94	19.02
T3R2-6	200.42	35.96	17.94	128.46	31.29	24.36	202.53	38.53	19.02
T3R2-7	178.64	38.30	21.44	187.71	33.83	18.02	128.05	32.80	25.61
T3R2-8	137.11	36.12	26.34	227.11	44.48	19.59	238.53	31.10	13.04
T3R2-9	208.96	35.25	16.87	192.62	32.26	16.75	141.95	33.67	23.72
T3R3-1	145.97	33.41	22.89	203.33	39.30	19.33	221.21	34.09	15.41
T3R3-2	149.55	33.70	22.53	201.41	46.28	22.98	209.39	34.00	16.24
T3R3-3	120.29	37.91	31.51	157.56	37.91	24.06	151.35	27.84	18.40
T3R3-4	199.76	41.45	20.75	261.76	38.60	14.75	189.17	34.00	17.97
T3R3-5	189.52	29.68	15.66	186.75	34.03	18.22	194.00	34.63	17.85
T3R3-6	197.85	40.47	20.45	174.38	35.43	20.32	217.86	38.75	17.79
T3R3-7	230.68	39.50	17.12	232.76	38.88	16.71	173.32	31.11	17.95
T3R3-8	176.29	37.10	21.04	252.80	48.07	19.02	222.54	29.93	13.45
T3R3-9	259.40	44.29	17.08	213.87	36.41	17.02	129.57	29.42	22.71