

# **JACUMAR**

## **JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS**

### **PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS**

#### **INFORME FINAL**

**Título: Análisis y evaluación de diferentes métodos de sacrificio de peces marinos de cultivo. Consecuencias sobre la calidad de la carne, estrés y bienestar**

## **RESUMEN EJECUTIVO (MÁXIMO 10 PÁGINAS)**

### **1.- DATOS ADMINISTRATIVOS**

**TITULO:** Análisis y evaluación de diferentes métodos de sacrificio de peces marinos de cultivo. Consecuencias sobre la calidad de la carne, estrés y bienestar

**FECHAS DE REALIZACIÓN** enero 2011 a diciembre 2012

#### **DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO**

Nombre y Apellidos: Ana Roque  
Organismo/ Centro: IRTA-SCR  
Correo electrónico: Ana.Roque@irta.es

#### **Comunidades Autónomas participantes**

Comunidad Autónoma de Cataluña  
Comunidad Autónoma de Andalucía  
Comunidad Autónoma de Canarias  
Comunidad Autónoma de Murcia  
Comunidad Autónoma de Galicia

### **2.- RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL**

#### **2.1. OBJETIVOS**

##### **OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar métodos de sacrificio compatibles con un estatus adecuado y aceptable de bienestar animal y de calidad de la carne en las especies de peces marinos de mayor producción e importancia económica en España.

Los objetivos parciales se distinguirán para peces planos y fusiformes, dadas las diferencias morfológicas y fisiológicas y por extensión las diferencias en su cultivo.

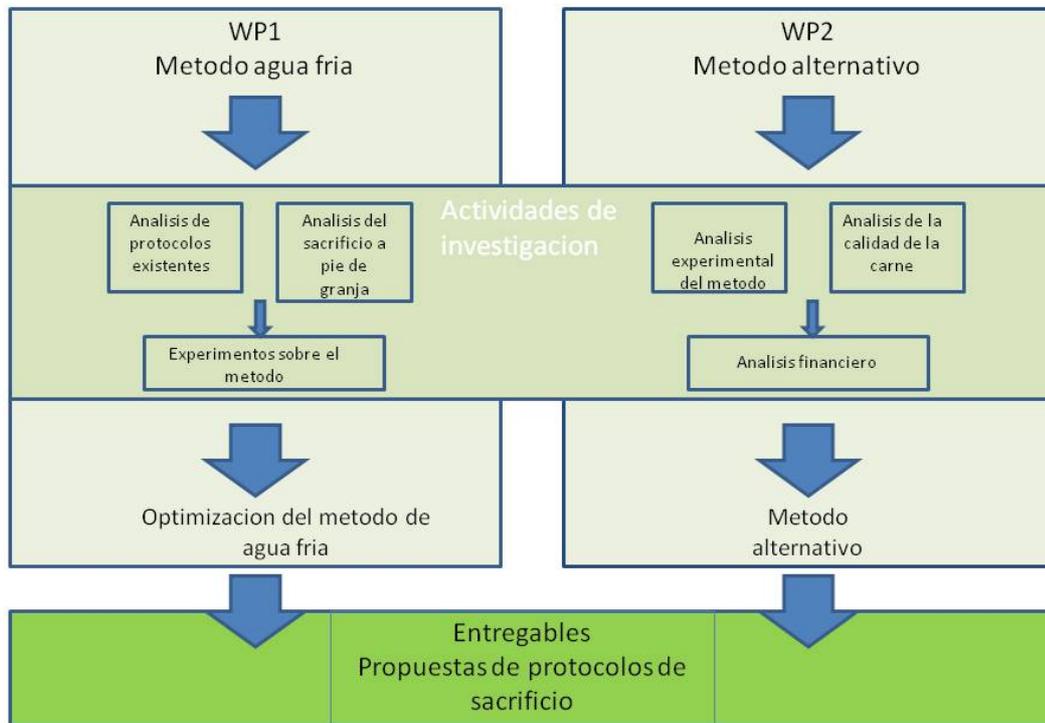
##### **OBJETIVOS PARCIALES EN DORADA Y LUBINA**

- 1) Evaluación y mejora de las prácticas para el sacrificio de peces marinos en agua muy fría y su efecto sobre el estrés y calidad de la carne:
  - a) Evaluación del efecto de manejo previo al sacrificio
  - b) Evaluación de la proporción agua:hielo
  - c) Evaluación del efecto densidad poblacional en el recipiente de sacrificio
- 2) Evaluación de métodos de sacrificio alternativos al agua fría y su aplicabilidad como métodos de aturdimiento previo aplicados al sacrificio de dorada y lubina. Efectos sobre el bienestar, estrés, calidad de la carne e impacto económico.
  - a) Evaluación de la mezcla de gases
  - b) Evaluación la anestesia
- 3) Aplicación en condiciones reales de producción

**OBJETIVOS PARCIALES EN RODABALLO**

- 4) Evaluación y mejora de las prácticas para el sacrificio de peces marinos en agua muy fría y su efecto sobre el estrés y calidad de la carne:
  - a) Evaluación del efecto de manejo previo al sacrificio
  - b) Evaluación de la proporción agua:hielo
- 5) Evaluación de aturdimiento eléctrico como método alternativo al sacrificio en hielo.
- 6) Aplicación en condiciones reales de producción

**2.3. METODOLOGÍA (muy resumida)**



**2.4. RESULTADOS**

**DORADA Y LUBINA**

**Objetivo 1:** Evaluación y mejora de las prácticas para el sacrificio de peces marinos en agua muy fría y su efecto sobre el estrés y calidad de la carne

### **Actividad: Analizar los protocolos de sacrificio utilizados por las empresas españolas**

Se pudo tener acceso a 11 protocolos (6 de lubina y 5 de dorada) usados por empresas con jaulas en España. Debido a que alguna información no estaba estandarizada se solicitó a la Apromar que distribuyera un cuestionario cerrado (opción múltiple) a sus socios que producen dorada o lubina.

Tanto para lubina como para dorada el 100% de las respuestas decían usar salabre para la pesca. La gran mayoría declara tardar de 15 a 30 minutos en agrupar los peces. El ritmo de pesca varía de 2 min/ton (dorada) y de 5 min/ton (lubina) a más de 10 min por ton en ambas especies. La proporción de agua-hielo en invierno es variable y va de 1-1/3 a 1-1.25 en las dos especies. En verano la cantidad de hielo y la mayoría utilizan una proporción de 1-1.5. La temperatura de la mezcla para casi todos se sitúa entre 0 y 3°C. La proporción pescado-mezcla varía mucho con las respuestas situadas entre 300 kg en 200Lt y 300 kg en 600 Lt. La mayoría sitúa el tiempo estimado a la muerte entre 1 y 5 min.

Se acompañó a demás una cosecha de dorada en Cataluña y una de lubina en Murcia. Para estas dos se llevó un datalogger que registró la temperatura cada minuto en una de las cubas de sacrificio y se filmó lo más que se pudo la actividad.

Del análisis de análisis de la información recogida en estas visitas se cuenta con la siguiente información:

#### LUBINA

Se cosecharon 40 toneladas de lobina con peso de 400 a 500 g. El barco salió de puerto a la 1:00 am y pescó hasta las 7:00 am approx. A la llegada a la jaula la temperatura del agua a la superficie era de 13.5 °C y el oxígeno era 8.3 mgO<sub>2</sub>/L. La agrupación y despesque duró cerca de 30 min con unos preparativos previos de 15 min realizados por los buzos. El despesque fue hecho con un salabre mecanizado con una grúa. Las lubinas estaban en el salabre por un periodo de 40±5 segundos, Los contenedores de cosecha tienen una capacidad de unos 1000 L. Los tanques contenían entre un 15-20% de su capacidad de hielo y agua antes de poner las lobinas. La temperatura de la mezcla era de 2.2±0.2°C medido con el oxímetro y el oxígeno estaba a 45% de saturación (10 mg/L). El datalogger en el fondo del tanque registró 3.4°C cuando las lobinas fueron depositadas en el tanque, la temperatura siguió bajando hasta llegar a un mínimo de 2.8°C, 1 h después de la entrada de los peces. Durante los primeros 5 minutos aparentemente todas las lobinas estaban muy activas intentando escapar del tanque. A los 15 minutos ya no había movimiento en las cubas.

#### DORADA

Se cosecharon 6 toneladas de dorada con peso medio de approx 460g. El barco salió de puerto a las 7:00 am y regresó a las 9.30 am. A la llegada a la jaula la temperatura del agua a la superficie era de 11.8°C y el oxígeno era 7.7 mgO<sub>2</sub>/L. El agrupamiento o confinamiento de las doradas en un pequeño volumen con el encierro de la malla de jaula fue realizado en 6 minutos y una vez realizado el despesque empezó un minuto después. El despesque duró 30 minutos. El despesque se realizó con un salabre mecanizado con una grúa. Las doradas estaban en el salabre por un periodo de 30±5 segundos, Los contenedores de cosecha tienen una capacidad de unos 500 L. Los tanques contenían entre un 20-25% de su capacidad de hielo y agua antes de poner las doradas. La temperatura de la mezcla era de -0.6±0.2°C medido con la sonda del oxímetro. El datalogger en el fondo del tanque registro 0.5°C cuando las doradas fueron depositadas en el tanque, la temperatura bajó a 0°C durante los primero 4 minutos y después en los siguientes 28 minutos la temperatura fue subiendo gradualmente hasta estabilizarse en 3.7°C. Durante los primeros 5 minutos aparentemente todas las doradas estaban muy activas intentando escapar del tanque. En los tres tanques observados, el último movimiento que se observó en los peces fue a los, 15±1.7 minutos después de que el ultimo pez vivo fue depositado en el tanque.

## Actividad: Evaluación del sacrificio en agua fría

### Experimento 1: Evaluación de los protocolos de sacrificio actuales basados en agua fría (definición de la situación basal) en dorada y lubina

Se usaron peces de talla comercial (400-500 gr) distribuidos en varios tratamientos cada uno con 10 individuos:

- 1) SAA: Sedación con 100 ppm de fenoxietanol previo captura, aturdimiento en 300 ppm de fenoxietanol y sacrificio en sobredosis de fenoxietanol (550 ppm)
- 2) SAH: Sedación con 100 ppm de fenoxietanol previo captura, aturdimiento en 300 ppm de fenoxietanol y sacrificio en agua con hielo en una proporción 1:1
- 3) SHA: Sedación con 100 ppm de fenoxietanol previo captura, aturdimiento en en agua con hielo en una proporción 1:1 y sacrificio en sobredosis de fenoxietanol (550 ppm)
- 4) SHH: Sedación con 100 ppm de fenoxietanol previo captura, aturdimiento en en agua con hielo en una proporción 1:1y sacrificio en en agua con hielo en una proporción 1:1
- 5) CAA: Captura directa con red simulando las condiciones de la empresa dejando constante el tiempo, aturdimiento en 300 ppm de fenoxietanol y sacrificio en sobredosis de fenoxietanol (550 ppm)
- 6) CAH: Captura directa con red simulando las condiciones de la empresa dejando constante el tiempo, aturdimiento en 300 ppm de fenoxietanol y sacrificio en agua con hielo en una proporción 1:1
- 7) CHA: Captura directa con red simulando las condiciones de la empresa dejando constante el tiempo, aturdimiento en en agua con hielo en una proporción 1:1 y sacrificio en sobredosis de fenoxietanol (550 ppm)
- 8) CHH: Captura directa con red simulando las condiciones de la empresa dejando constante el tiempo, aturdimiento en en agua con hielo en una proporción 1:1y sacrificio en en agua con hielo en una proporción 1:1

El experimento se llevó a cabo por duplicado. Para cada tratamiento se registró el tiempo que tardó cada fase, se observó el comportamiento y se tomaron muestras de 5 individuos para parámetros sanguíneos y moleculares y 5 individuos para análisis de calidad de carne.

### RESULTADOS:

Los tiempos medidos en lubina fueron en general mas cortos pero en ningún tratamiento fueron los suficientemente cortos para ser aceptables de un punto de vista de bienestar animal, excepto en lubina expuesta a un aturdimiento por anestésico y sacrificada en agua con hielo. En este tratamiento el periodo medio hasta el aturdimiento fue de 1min y 5 seg.

### Expresión génica

Para determinar el efecto de los tratamientos aplicados sobre el estrés en el pez se cuantificó los niveles de ARN mensajero de las proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90AB así como para el receptor de glucocorticoides (GR) y ciclooxigenasa1 (COX) en hígado. Sólo se observaron diferencias significativas para la HSP90AB en los tratamientos que utilizaron sedación para la captura y frío como aturdimiento (aproximadamente un incremento de expresión de 10 veces). Estos animales presentaron cierta agitación al pasar de la anestesia al frío mostrando un patrón de inducción relacionado con el estrés térmico. Sin embargo, esta activación no se detectó en los animales capturados sin anestesia para los mismos tratamientos de aturdimiento y sacrificio incluso con un tiempo de exposición a frío similar o con un plano mayor de anestesia.

Respecto a Fosfoenolpiruvatocarboxiquinasas citosólica (PEPCKCIT) y mitocondrial (PEPCKMIT) sólo la primera mostró diferencias significativas de expresión. Los animales anestesiados durante la captura y aturdimiento presentaron niveles superiores de transcrito de *pepckcit*.

Estos datos nos indican la importancia de la fase de captura y aturdimiento en la respuesta celular frente al estrés.

A demás de este experimento se decidió verificar que efectivamente los peces estaban muertos y no se recuperaban.

Para eso se colocaron peces directamente en hielo y en sobredosis de fenoxietanol (550 ppm) y se regresaron a tanques con agua de mar limpia y aireación a diferentes tiempos (10 min a 80 min) después de haber establecido que estaban muertos debido a ausencia de respiración y falta de reflejos tanto a estímulos luminosos como físicos. En este experimento se verificó que los animales recuperaban del aturdimiento, que no estaban muertos y que las lubinas tardaban mas de 60 minutos en morir y las doradas más de 20 minutos.

Los parámetros bioquímicos medidos indicaron diferencias en lactato, cortisol, proteína total, sodio, cloro y fosforo.

El método de captura y el tipo de aturdimiento influenciaron el pH que fue mas alto al tiempo 0 en peces sedados (previo a captura) y aturdidos con anestésico.

En los peces sedados previo captura la instauración del rigor mortis se retrasa, esto pasa igualmente cuando el aturdimiento es hecho con anestésico. Un retraso en *rigor mortis* = más prontitud fenómenos de autólisis y ablandamiento muscular.

### Experimentos 2 y 3:

El segundo lote de experimentos se llevó a cabo para intentar optimizar las condiciones del sacrificio en agua con hielo por lo que se hizo un experimento multifactorial para evaluar diferentes proporciones de agua /hielo (diferentes temperaturas de sacrificio); diferentes densidades de peces en la cuba de sacrificio y finalmente diferentes periodos de confinamiento previos al sacrificio.

#### *Experimento 2. Evaluación de distintas proporciones de agua /hielo y densidad (dorada y lubina)*

Para este experimento se capturaron animales que habían sufrido un confinamiento de 15 y 60 min (nivel 1) y se sacrificaron a dos distintas proporciones de hielo y agua de tal forma que de tal forma que la temperatura final del agua fue de 1.5°C y 4.5°C. Además, para evaluar el efecto densidad los animales se sacrificaron a densidades de 12.5 (LD) y 50% (HD) peso/volumen para cada proporción de agua/hielo. En este experimento se usaron 5-6 peces en la densidad baja y por tratamiento y 25 peces en la densidad alta. En el caso de la lubina no se ensayaron la temperatura de 4-5°C porque no ha había mortalidad. En todos los tratamientos probados se pudieron percibir movimientos en el hielo hasta 25-30 minutos después de haber colocado los peces en las cubas de sacrificio por lo que se considera que en todos ellos los peces estaban conscientes durante todo este periodo, lo que es inaceptable de acuerdo a la legislación europea. No se vio en ninguno de los tratamientos ninguna mejoría aparente debida al tratamiento. Los análisis bioquímicos indicaron que hubo diferencias en los niveles de glucosa, lactato, cortisol, sodio y fosforo.

Aparentemente el periodo de confinamiento tiene un papel significativo en los niveles de estrés inducidos en los peces y por eso se evaluaron diferentes periodos de confinamiento antes de proceder al sacrificio inmediato de los peces con un golpe en la cabeza.

#### *Experimento 3. Evaluación del confinamiento en los tiempos previos al sacrificio (dorada y lubina)*

*Para determinar el efecto del confinamiento.* Se establecieron 4 tiempos: 0min, 15 min (tiempo mínimo estimado en las granjas-ver tarea 1), 60 minutos (tiempo máximo estimado en las granjas- ver tarea 1) y 120 minutos. En este experimento los peces se sacrificaron mediante contusión con un golpe en la cabeza. Los análisis bioquímicos indicaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos para glucosa, lactato, sodio, cloro y fosforo.

El confinamiento, como era de esperar, supone un gasto de reservas corporales que hace que el pH de la carne inmediatamente tras el sacrificio ya haya descendido algo sobre el valor ligeramente superior a 7 en el animal vivo, y que no pueda alcanzar idéntico grado de descenso a las 72 horas postmortem. Si nos centramos en el efecto del tiempo de confinamiento, prácticamente en todos los puntos de muestreo este factor ejerce un efecto significativo, llegando a niveles más bajos de pH aquellos peces sometidos a un menor tiempo de confinamiento. Parece lógico pensar que estos individuos no han llegado a los mismos niveles de agotamiento de reservas y por ello la evolución del pH de su carne puede progresar con descensos más importantes. Las lubinas que fueron confinadas durante 60 minutos previos a su aturdimiento, mostraron una importante presencia de petequias principalmente a nivel de la aleta caudal, aunque también se pueden apreciar en aletas pectorales y ventrales así como flanco lateral. Aquellos peces con menor tiempo de confinamiento, 15 minutos, tienen también cierto grado de exanguinación en las localizaciones mencionadas, pero son de menor intensidad, menor extensión y en menor número de individuos.

## **Objetivo2 (resultados preliminares) Evaluación de métodos de sacrificio alternativos al agua fría y su aplicabilidad como métodos de aturdimiento previo aplicados al sacrificio de dorada, lubina y rodaballo. Efectos sobre el estrés, calidad de la carne e impacto económico.**

### Experimentos 4 y 5

Finalmente el último lote de experimentos que se llevó a cabo corresponde a la búsqueda de un método de aturdimiento alternativo al uso de agua con hielo. Para ello se probó un anestésico autorizado para su uso en la cosecha de peces (Aqui-S) y se probó también el uso de dióxido de carbono y nitrógeno, solos o combinados entre ellos como gases anestésicos.

El análisis estadístico no encontró diferencias entre los distintos métodos de sacrificio analizados. Sólo para el gen GR se encontraron diferencias significativas entre el sacrificio con gases y el directo con agua fría (Los niveles de transcrito fueron 7.27 veces superiores en los animales sacrificados con la mezcla de gases).

Una prueba de T indicó diferencias significativas solamente en el contenido en proteína total en entre los tratamientos control (sacrificio en agua muy fría) y aturdimiento con gases seguido de sacrificio.

En el uso de Aqui S para aturdimiento se encontraron las siguientes diferencias en los niveles de glucosa, proteína total y fosforo.

En definitiva, parece que la mezcla de gases, si bien no contribuye ni a un mantenimiento ni a un agotamiento de las reservas corporales previo al sacrificio, si que afecta los valores del pH de la carne en los momentos iniciales, probablemente por la incidencia que el propio dióxido de carbono tiene a nivel tisular.

En cuanto al rigor mortis, la dorada, siguió un patrón considerablemente diferente del presentado en los experimentos anteriores. Si bien es cierto que a partir de las 24 horas postmortem la rigidez comienza a bajar, el máximo no se alcanza en ese momento, sino bastante antes en el tiempo, en algún caso ya a las 3 horas postmortem. Las evoluciones son muy similares en todos los tratamientos salvo en el que se aturdió con la mezcla de gases, con un descenso más acusado y que llegó a presentar un valor significativamente diferente a las 48 horas tras el sacrificio.

Es destacable que, a pesar de obtener en este experimento los datos más negativos en relación a la calidad de la carne, tanto en la evolución del pH como del rigor mortis, el aspecto externo obtiene una mejor valoración. El grado de descamación en dorada es similar o incluso menor que en el experimento de confinamiento, y aún es más diferenciador el hecho de que apenas se observan petequias para el caso de las lubinas. Hay algún individuo con laceraciones y descamación importante, pero estos deméritos del aspecto no son constantes en todos los individuos.

## RODABALLO

### **OBJETIVO 1: EVALUACIÓN Y MEJORA DE LAS PRÁCTICAS PARA EL SACRIFICIO EN AGUA MUY FRÍA Y SU EFECTO SOBRE EL ESTRÉS Y LA CALIDAD DE LA CARNE**

En esta especie los procedimientos habituales de sacrificio no exigen someter a los peces a situación previa de confinamiento, por lo que no se desarrollaron experimentos con el fin de evaluar dicha situación.

#### **Objetivo 1. Evaluación del manejo de sacrificio y de la proporción agua:hielo**

Con el fin de evaluar el protocolo habitual de sacrificio en hielo y definir la situación basal, se realizaron tres experimentos con los siguientes objetivos concretos:

- a) Evaluar el tiempo de aturdimiento y recuperación de los peces mantenidos en agua a 3 temperaturas (2°C, 1°C, -1 °C)
- b) Determinar el efecto del tiempo de permanencia de los rodaballos en agua:hielo a la temperatura de 0 °C, sobre parámetros sensoriales y actividad motora, así como sobre el tiempo de recuperación.
- c) Determinar los niveles basales y el efecto de la permanencia en hielo en parámetros bioquímicos y hormonales de la respuesta de estrés, y sobre la calidad de la carne.

#### **Experimento 1. Efecto de la temperatura del agua sobre el aturdimiento de los peces y su recuperación.**

Se usaron grupos de peces de tamaño comercial (aproximadamente 1,2 Kg) mantenidos en agua a 15.4 °C, a los que se añadió hielo hasta alcanzar la temperatura objetivo en cada tanque. Para cada temperatura se evaluó en comportamiento de los peces en base al test de Morzel.

#### **Experimento 2. Efecto del tiempo de permanencia en agua:hielo (0°C) sobre el grado de aturdimiento de los rodaballos y su recuperación.**

Se usaron peces de tallas distintas: a) grandes, de aproximadamente 1,2 Kg; b) pequeños, de aproximadamente 400 g, que se mantuvieron en agua a 15.4 °C a los que se añadió hielo hasta alcanzar la temperatura de 0 °C (seleccionada a partir de resultados de experimento 1). Posteriormente se añadieron los peces a cada tanque. Se evaluó el grado de aturdimiento de los peces a los siguientes tiempos 5, 10, 15, 25, 30, 45, 60 y 120 minutos. A partir de los 30 minutos en hielo se trasladó un pez de cada talla a un tanque con agua a temperatura normal, a fin de evaluar su capacidad de recuperación.

#### **Experimento 3. Determinación de niveles basales. Efecto de la captura y de la permanencia en hielo sobre parámetros de la respuesta a estrés y sobre la calidad de la carne.**

Se usaron rodaballos de dos tallas comerciales: grandes (aproximadamente 1,5 Kg) y pequeños (aproximadamente 500 g). Inicialmente los animales se distribuyeron a 15 °C y a 18 °C, simulando las condiciones de temperatura con las que se encuentran a lo largo del año. Dentro cada grupo de temperatura (15 °C y 18°C) y talla (500 g y 1,5 Kg) se establecieron dos subgrupos, en base a la utilización o no de anestésico, en el tanque. Se establecieron tres niveles temporales a fin de estimar los niveles basales (muestreo previo a añadir hielo al tanque) o tras la adición de una cierta cantidad de hielo a cada tanque a fin de alcanzar la temperatura de 0°C. En este caso se muestrearon los peces a los 8 min y 60 min de alcanzarse la temperatura deseada.

Se determinarán los siguientes parámetros: Hematocrito, concentración de hemoglobina en plasma, niveles de glucosa y lactato en plasma, niveles de cortisol en plasma y contenido hepático de glucosa y glucógeno.

#### **Calidad de la Carne.**

Se tomaron muestras de los peces para el análisis organoléptico y de calidad de la carne. Para ello los peces se guardaron en cajas de porexpán cubiertas de plástico y sendas capas, superior e inferior, de hielo. Las muestras se enviaron a la empresa ANFACO (Vigo) que realizará los análisis correspondientes,

incluyendo éstos la determinación de nitrógeno básico volátil total (NBVT), análisis sensorial, análisis colorimétrico y análisis de la textura del producto.

## RESULTADOS OBJETIVO 1

### Efecto de la temperatura de la mezcla agua:hielo y del tiempo de permanencia en el grado de aturdimiento y en la recuperación de los rodaballos.

Se han desarrollado 3 experimentos diferentes que han aportado información sobre la influencia de la temperatura de la mezcla agua:hielo en el tiempo de aturdimiento de los animales y, adicionalmente, el tiempo de permanencia del hielo sobre el grado de aturdimiento de los peces y su capacidad de recuperación. En relación con la temperatura de la mezcla agua:hielo, se ha constatado que existe una relación entre el valor de esta variable y el tiempo de aturdimiento de los animales, de forma que aquellos mantenidos en agua: hielo a 2°C tardan más del doble de tiempo en aturdirse que los que permanecen en hielo a 0°C ó -1°C. Como esperábamos, el tiempo de recuperación de los animales mantenidos en esta situación se correlaciona inversamente con la temperatura de la mezcla agua:hielo.

Por otro lado, los resultados relativos al efecto de tiempo de permanencia en hielo nos indican el cese de la actividad motora y de la respuesta a estímulos entre los 15 y 25 minutos de situar los peces en esta situación. Por tanto, podemos considerar que a partir de este tiempo los peces están en una situación de aturdimiento similar a la de la inconsciencia, aunque pueden recuperar su plena actividad si son devueltos a agua normal. Sin embargo, hay que destacar que incluso pasado un largo tiempo (120 min) en la mezcla agua:hielo, los peces son capaces a recuperarse si se trasladan a agua de temperatura normal, es decir que mantienen intacta su capacidad vital. Este hecho nos hace sospechar que el método actual de sacrificio en hielo es eficaz para aturdir los peces, pero carece de rigurosidad a la hora de estimar la muerte del pez. Por tanto, creemos que este punto debe ser evaluado en experimentos posteriores.

### Determinación de niveles basales. Efecto de la captura y de la permanencia en hielo sobre

Se observó que el método seguido de aturdimiento en agua:hielo (aprox. 0°C) no conlleva una activación de la respuesta fisiológica de estrés, que incluye la secreción de cortisol desde el tejido interrenal. La ausencia de aumento de esta hormona en el plasma, junto con los mínimos cambios detectados en parámetros sanguíneos (hematocrito, contenido de hemoglobina, concentración de glucosa), nos permiten descartar tal activación. Incluso cabe destacar que en situación de permanencia en hielo los niveles de cortisol tendieron a descender lo que podría deberse a una ralentización de la esteroidogénesis interrenal o una menor activación del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal debido al bajo nivel metabólico que inducen esas temperaturas del agua en los peces. Por otro lado, se detectó un incremento en los niveles de lactato en plasma que podría ser originado por una activación de rutas metabólicas anaerobias derivadas de una situación de hipoxia. Dicha situación es probable que ocurra en el método de aturdimiento en hielo y probablemente sea la principal causante de alteraciones del metabolismo del pez.

Bajo situación de anestesia previa al aturdimiento en hielo se detectaron en todos los peces elevados niveles de cortisol, hematocrito, concentración de hemoglobina en plasma y, en menor medida, de la concentración de glucosa y lactato en plasma. Este hecho nos hace pensar que el anestésico indujo un efecto de estrés en los rodaballos con incremento de la secreción de cortisol y presumiblemente de catecolaminas, como principales mediadores de dicha respuesta. Por tanto, bajo esta situación de anestesia no parece ser adecuado hacer estimas del método de aturdimiento en hielo debido a la interferencia probable que tiene el anestésico con la respuesta de estrés.

En resumen, los resultados apoyan que el método del aturdimiento en hielo no parece comprometer gravemente los parámetros fisiológicos de bienestar en los rodaballos, al menos durante el periodo de tiempo ensayado (primeros 60 minutos) de permanencia en hielo. Teniendo en cuenta que previamente habíamos estimado que los rodaballos mantenidos sobre hielo tardan entre 15-25 minutos en entrar en un periodo de inconsciencia (ausencia de respuesta sensorial a estímulos), es previsible que en esta fase inicial se

produzca una cierta activación de la respuesta de estrés, pero ello no parece tener consecuencias importantes sobre los principales indicadores fisiológicos de dicha respuesta.

## **Objetivo 2. Optimización del método de aturdimiento en hielo. Comparación del efecto del cambio brusco de temperatura del agua (mezcla agua:hielo) con el que produce un cambio gradual de temperatura del agua sobre la respuesta al estrés y el bienestar en rodaballo.**

Los resultados anteriores indican que en el rodaballo no hay una activación importante del eje de estrés ante el shock térmico (cambio brusco de temperatura del agua). No obstante, hemos creído necesario confirmar dicha conclusión con nuevos experimentos, así como comparar la respuesta de estrés en dicha situación con aquella que tiene lugar cuando los peces son sometidos a un cambio gradual de temperatura. Estos datos tratan de contribuir a la optimización del método de aturdimiento en hielo desde un punto de vista del bienestar animal.

Se planteó un único experimento con los siguientes grupos de peces:

- *Basales: Control:* se muestrea un grupo de 10 peces en agua a 15°C; *Control anestesiado:* en un tanque con agua a 15 °C se anestesia un grupo de 10 peces y se muestrean. Este grupo permitirá determinar el efecto de la manipulación en el muestreo.
- *Cambio brusco de temperatura (10 minutos hasta valor final).* En el tanque se añade una cantidad de hielo que permita una caída brusca de temperatura hasta 0°C (aprox. 10 min). Una vez alcanzada esa temperatura se muestrean los peces transcurridos 8 minutos (10 peces) y 60 minutos (10 peces).
- *Cambio gradual rápido de temperatura (30 minutos hasta punto final).* En el tanque se añaden pequeñas cantidades de hielo que permitan bajar gradualmente la temperatura, de modo que cada 10 minutos se produzca una caída de 5°C. Una vez alcanzados los 0°C se muestrean los peces transcurridos 8 minutos (10 peces) y 60 minutos (10 peces).
- *Cambio gradual lento de temperatura (120 minutos hasta punto final).* En el tanque se añaden de forma continua cantidades de hielo muy pequeñas que permiten bajar gradualmente la temperatura, de modo que cada 40 minutos se produce una caída de 5°C. Una vez alcanzados los 0°C se muestrean los peces transcurridos 8 minutos (10 peces) y 60 minutos (10 peces).

Se usaron rodaballos de aproximadamente 100 gramos de peso que se distribuyeron en 8 tanques stock. A fin de definir adecuadamente la situación basal, un grupo de peces fue anestesiado mediante fenoletanol a la dosis de 0.25 cm<sup>3</sup>.L<sup>-1</sup>. En los demás grupos de peces no se utilizó anestesia previa ni se realizó ninguna manipulación de los animales en sus respectivos tanques de cultivo, a fin de evitar interacciones debidas al manejo de los animales. Para conseguir la temperatura deseada, se añadieron jarras de hielo a los tanques donde estaban los peces hasta alcanzar dicho valor de temperatura del agua.

Tras muestrear los rodaballos, se determinaron diversos parámetros indicadores de la activación de la respuesta de estrés, de modo similar a lo realizado en la actividad 1.

## **RESULTADOS OBJETIVO 2**

En los experimentos incluidos en la actividad 2 hemos evaluado si el procedimiento de bajada de temperatura (inmersión brusca, enfriado gradual, enfriado lento) condiciona el bienestar de los peces y, en ese caso, elegir aquel que menos afectase a los diversos parámetros que nos permiten definir el grado de respuesta del animal ante una situación estresante. Por ello, se han comparado los cambios en parámetros relativos a la respuesta de estrés en tres situaciones de enfriado:

Aunque en todos los métodos de enfriamiento estudiados se observaron cambios hormonales y metabólicos indicativos de la existencia de estrés, estos fueron menores en el caso del shock térmico rápido,

hecho que fue claramente visible en el aumento de los niveles de cortisol en plasma que fue mucho mayor en los peces enfriados lentamente. También los niveles de algunos metabolitos en plasma y a nivel hepático apoyan el uso de este método frente al enfriado lento.

En conclusión, los experimentos desarrollados hasta el presente momento avalan la eficacia del método de aturdimiento en hielo para esta especie dado que no parece tener grandes repercusiones desde el punto de vista del estrés y del bienestar animal. El hecho de que el enfriado rápido parezca ser menos gravoso en términos fisiológicos debe ser tenido en cuenta en los procedimientos de aturdimiento y sacrificio, dado que aunque los parámetros medidos no permitan excluir la existencia de un proceso de sufrimiento del pez ante estas situaciones, si nos ayudan a verificar el grado de alteración fisiológica producido en el animal. Además, desde un punto de vista de aplicabilidad en piscifactoría los resultados apoyan el uso de procedimientos de enfriado rápido, lo que también permite ahorrar costes en hielo y tiempo del proceso. No obstante, ha de tenerse en cuenta lo ya comentado en el informe del año anterior, cuando se señalaba que, aunque los peces mantenidos sobre hielo permanecen aturdidos largo tiempo, todavía pueden recuperar su actividad normal si se vuelven al agua de temperatura ambiente. Ello indica que deben realizarse estudios más precisos que permitan estimar el tiempo de muerte del pez, dado que un método eficaz sería aquel que minimice la situación de agonía del pez sin inducir fuertemente una respuesta de estrés.

Además de lo comentado anteriormente, sería deseable realizar estudios precisos con otros métodos de aturdimiento, tales como el shock eléctrico, y comparar las respuestas fisiológicas del pez con aquellas observadas para el método de aturdimiento en hielo.

## 2.5. CONCLUSIONES/APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL PLAN

**Para completar este apartado, se acompañará una presentación en Power Point (máximo 10-15 diapositivas) que incluirá solo los aspectos más generales de los objetivos generales y las acciones desarrolladas y dedicará especial atención a los resultados y su utilidad para el sector acuícola.**

## 2.6. VALORACIÓN

Los resultados indican que el método de sacrificio en hielo tiene pocas posibilidades de ser mejorado de manera significativa y que difícilmente podrá cumplir con los requisitos para satisfacer la legislación europea y las demandas del consumidor. Sin embargo los resultados del uso de mezcla de gases fueron alentadores tanto en tiempos como en comportamiento de los peces.

En el caso del rodaballo, se ha constatado que el método de aturdimiento en hielo no induce una fuerte respuesta fuerte de estrés, por lo que puede ser un método adecuado. El traslado rápido de los peces a la situación de hielo parece ofrecer ventajas sobre un cambio gradual de temperatura, lo que debe ser tenido en cuenta para optimizar el método. Sin embargo, en esta especie este método no parece ser adecuado como método de punto final, dado que los animales que permanecen en aturdimiento largo tiempo en hielo son susceptibles de recuperación si se vuelven a condiciones de agua normal. Por tanto, es necesario buscar una alternativa técnica para terminar con la vida de los animales una vez aturdidos por la bajada de temperatura.

## 2.7. DIFUSIÓN

A Roque, M Manchado, D Hernandez, R Gines, C Berbel, E Fatsini, M Aparicio, I Gairin and N Duncan 2013. STUNNING OF SEABREAM-PRELIMINARY RESULTS. A presentar en UFAW International Animal Welfare Science Symposium. Universitat Autònoma de Barcelona Barcelona, Spain 4-5th July 2013

JM Míguez, M. Conde-Sieira, M. López-Patiño, M. Gesto, M. Librán, J. Hernández, JL Soengas, JM Míguez. Physiological responses during thermal shock in pre-slaughter procedures in turbot. International Congress of Comparative Endocrinology (ICCE). Barcelona, Spain, July 15-19th, 2013.

## 2.8. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

Como es del conocimiento de la Jacumar el presupuesto real de estos dos años fue reducido (60% del otorgado en el 2º año) y el proyecto fue abruptamente terminado dos años antes de lo previsto al momento de su aprobación. Todo esto tiene como consecuencia que no se llevaron a cabo todas las analíticas previstas, además no se repitieron parte de los experimentos y el objetivo 3 no se abordó, por lo que no hay resultados conclusivos. Sin embargo los resultados aunque preliminares son alentadores y podrían haber cumplido con las expectativas del sector de no haber sido por estas circunstancias. Este proyecto fue la primera demanda del sector.

## 3.- JUSTIFICACIÓN ECONÓMICA DEL PRESUPUESTO ASIGNADO

(Deberá se cumplimentada una hoja para cada una de las Comunidades Autónomas participantes en el Plan).

COMUNIDAD AUTÓNOMA: -----

Presupuesto transferido:

¿Se ha ajustado el gasto a las partidas presupuestarias previstas inicialmente en el plan?  
.....x Si No

En caso de NO, indicar a qué partidas se han asignado

Firma de la Autoridad Competente

## **INFORME FINAL EXTENSO**

### **1.- DATOS ADMINISTRATIVOS**

#### **TÍTULO:**

Análisis y evaluación de diferentes métodos de sacrificio de peces marinos de cultivo. Consecuencias sobre la calidad de la carne, estrés y bienestar

#### **FECHAS DE REALIZACIÓN**

Inicio: enero 2011

Finalización: diciembre 2012

#### **PRESUPUESTO TOTAL EN EUROS**

#### **DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO**

Nombre y Apellidos: Ana Roque

Organismo/ Centro: IRTA-SCR

Departamento: Sant Carles de la Ràpita

Teléfono: 977 745427

Fax: 977 744138

Correo electrónico: Ana.Roque@irta.es

Dirección postal completa: Carretera al Poblenou SN Km 5.5

43540 Sant Carles de la Ràpita

#### **PARTICIPANTES por cada Comunidad Autónoma**

##### **CENTROS DE INVESTIGACIÓN**

##### **1) CATALUÑA**

Tipo de centro: Centro Público de I+D

Nombre: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries

CIF: Q5855049B

Nombre Representante Legal: Agusti Fonts Cavestany

##### **DATOS DE LOS INVESTIGADORES**

Apellidos: Roque

Nombre: Ana

Organismo: IRTA

Centro: Sant Carles de la Ràpita

Departamento: Subprograma de Cultivos Acuáticos

Equipo:

Teléfono: 977 745427

Fax.: 977 744138  
Correo electrónico: Ana.Roque@irta.es  
Dirección Postal: Carretera al Poblenou SN Km 5.5  
43540 Sant Carles de la Ràpita

Apellidos: Duncan  
Nombre: Neil  
Organismo: IRTA  
Centro: Sant Carles de la Ràpita  
Departamento: Subprograma de Cultivos Acuáticos  
Equipo:  
Teléfono: 977 745427  
Fax.: 977 744138  
Correo electrónico: Neil.Duncan@irta.es  
Dirección Postal: Carretera al Poblenou SN Km 5.5  
43540 Sant Carles de la Ràpita

Apellidos: Gairin Deulofeu  
Nombre: Joan Ignasi  
Organismo: IRTA  
Centro: Sant Carles de la Ràpita  
Departamento: Subprograma de Cultivos Acuáticos  
Equipo:  
Teléfono: 977 745427  
Fax.: 977 744138  
Correo electrónico: Ignasi.Gairin@irta.es  
Dirección Postal: Carretera al Poblenou SN Km 5.5  
43540 Sant Carles de la Ràpita

## 2) ANDALUCIA

### CENTROS DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Centro Público I+D Nombre: Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y de la Producción Ecológica. Junta de Andalucía.  
CIF: Q-4100689-A  
Nombre Representante Legal: Victor Ortiz Somovilla

### DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Manchado Campaña  
Nombre: Manuel  
Organismo: IFAPA  
Centro: Centro IFAPA El Toruño  
Departamento: Biología Molecular  
Equipo:  
Teléfono: 956011315  
Fax.: 956011324  
Correo electrónico: manuel.manchado@juntadeandalucia.es  
Dirección Postal: Camino tiro de pichón s/n, 11500 El Pto de Sta Maria (Cadiz)

Apellidos: Berbel Vecino  
Nombre: Concepción  
Organismo: IFAPA  
Centro: Centro IFAPA El Toruño  
Departamento: Biología Molecular  
Equipo:  
Teléfono: 956011315  
Fax.: 956011324  
Correo electrónico: mariac.berbel@juntadeandalucia.es  
Dirección postal: Camino tiro de pichón s/n, 11500 El Pto de Sta Maria

### 3) MURCIA

#### CENTROS DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Centro Público I+D  
Nombre: IMIDA  
CIF: S-3000012-I  
Nombre Representante Legal: Adrián Martínez Cutillas.

#### DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Hernández Llorente  
Nombre: María Dolores  
Organismo: Comunidad Autónoma de la Región de Murcia  
Centro: IMIDA  
Departamento: Producción Animal  
Equipo: Acuicultura Marina  
Teléfono: 968184518  
Fax.: 968184518  
Correo electrónico: mdolores.hernandez6@carm.es  
Dirección Postal: Carretera del puerto s/n. San Pedro del Pinatar

Apellidos: García García  
Nombre: Benjamín  
Organismo: Comunidad Autónoma de la Región de Murcia  
Centro: IMIDA  
Departamento: Producción Animal  
Equipo: Acuicultura Marina  
Teléfono: 968184518  
Fax.: 968184518  
Correo electrónico: benjamin.garcia@carm.es  
Dirección Postal: Carretera del puerto s/n. San Pedro del Pinatar

#### 4) CANARIAS

##### CENTROS DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Centro Público de I+D  
Nombre: Instituto Canario de Ciencias Marinas  
CIF: S-3511001-D  
Nombre del representante legal:

##### DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Ginés Ruiz  
Nombre: Rafael  
Organismo: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria  
Centro: Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria  
Departamento: Acuicultura y Genética Marina  
Equipo:  
Teléfono: 928454361  
Fax.:  
Correo electrónico:  
Dirección Postal:

#### 5) GALICIA

##### CENTROS DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Universidad  
Nombre: Universidade de Vigo  
CIF: Q-8650002-B  
Nombre Representante Legal: Salustiano Mato de la Iglesia (Rector)

##### DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Míguez Miramontes  
Nombre: Jesús Manuel  
Organismo: Universidad de Vigo  
Centro: Facultad de Biología  
Departamento: Biología Funcional y CC Salud  
Equipo: Grupo de investigación FB2  
Teléfono: 986 812386  
Fax.: 986 812556  
Correo electrónico: jmmiguez@uvigo.es  
Dirección Postal: Universidad de Vigo, Facultad de Biología, Campus Universitario Lagoas-Marcosende, 36310 Vigo

Apellidos: Soengas Fernández  
Nombre: José Luis  
Organismo: Universidad de Vigo  
Centro: Facultad de Biología  
Departamento: Departamento de Biología Funcional y CC Salud  
Equipo: Grupo de Investigación FB2

Teléfono: 986 812564  
Fax.: 986 812556  
Correo electrónico: jsoengas@uvigo.es  
Dirección Postal: Universidad de Vigo, Facultad de Biología, Campus Universitario Lagoas-Marcosende, 36310 Vigo

Apellidos: López Patiño  
Nombre: Marcos Antonio  
Organismo: Universidad de Vigo  
Centro: Facultad de Biología  
Departamento: Biología Funcional y CC Salud  
Equipo: Grupo de investigación FB2  
Teléfono: 986 812386  
Fax.: 986 812556  
Correo electrónico: mlopezpat@uvigo.es  
Dirección Postal: Universidad de Vigo, Facultad de Biología, Campus Universitario Lagoas-Marcosende, 36310 Vigo

Apellidos: Cabaleiro Martínez  
Nombre: Santiago  
Organismo: Centro Tecnológico Gallego de Acuicultura (CETGA)  
Centro:  
Departamento:  
Equipo:  
Teléfono: 981841600  
Fax.: 981841516  
Correo electrónico: cabaleiro@cetga.org  
Dirección Postal: Punta de Couso s.n., Aguiño, Ribeira E15695 A Coruña

## 2.- RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL

Para describir los resultados finales del proyecto se ha seguido el formato de este formulario para los objetivos generales y parciales inicialmente planteados subdivididos por especies según se recoge a continuación.

### 2.1. OBJETIVOS INICIALES

El OBJETIVO GENERAL fue el de:

*Evaluar métodos de sacrificio compatibles con un estatus adecuado y aceptable de bienestar animal y de calidad de la carne en las especies de peces marinos de mayor producción e importancia económica en España.*

Los objetivos parciales se dividieron según la especie de trabajo (peces planos y pelágicas), dadas las diferencias morfológicas y fisiológicas y por extensión las diferencias en su cultivo.

#### A) OBJETIVOS PARCIALES EN DORADA Y LUBINA

- 1) Evaluación y mejora de las prácticas para el sacrificio de peces marinos en agua muy fría y su efecto sobre el estrés y calidad de la carne:
  - a) Evaluación del efecto de manejo previo al sacrificio

- b) Evaluación de la proporción agua:hielo
  - c) Evaluación del efecto densidad poblacional en el recipiente de sacrificio
- 2) Evaluación de métodos de sacrificio alternativos al agua fría y su aplicabilidad como métodos de aturdimiento previo aplicados al sacrificio de dorada y lubina. Efectos sobre el bienestar, estrés, calidad de la carne e impacto económico.
  - a) Evaluación de la mezcla de gases
  - b) Evaluación la anestesia
- 3) Aplicación en condiciones reales de producción

## B) OBJETIVOS PARCIALES EN RODABALLO (INICIALES)

- 1) Evaluación y mejora de las prácticas para el sacrificio de peces marinos en agua muy fría y su efecto sobre el estrés y calidad de la carne:
  - a) Evaluación del efecto de manejo previo al sacrificio
  - b) Evaluación de la proporción agua:hielo
- 2) Evaluación de aturdimiento eléctrico como método alternativo al sacrificio en hielo.
- 3) Aplicación en condiciones reales de producción

## 2.2. OBJETIVOS REALIZADOS

### A) OBJETIVOS PARCIALES EN DORADA Y LUBINA

- 1) Evaluación y mejora de las prácticas para el sacrificio de peces marinos en agua muy fría y su efecto sobre el estrés y calidad de la carne:
  - a) Evaluación del efecto de manejo previo al sacrificio
  - b) Evaluación de la proporción agua:hielo
  - c) Evaluación del efecto densidad poblacional en el recipiente de sacrificio
- 2) Evaluación de métodos de sacrificio alternativos al agua fría y su aplicabilidad como métodos de aturdimiento previo aplicados al sacrificio de dorada y lubina. Efectos sobre el bienestar, estrés, calidad de la carne e impacto económico.
  - a) Evaluación de la mezcla de gases
  - b) Evaluación la anestesia

## 2.3. METODOLOGÍA

### 2.3.Objetivo1. Evaluación y mejora de las prácticas para el sacrificio de peces marinos en agua muy fría y su efecto sobre el estrés y calidad de la carne

**Actividad 2.3.1.1. Análisis de los protocolos de sacrificio utilizados por las empresas españolas**  
 Previo al ensayo de diferentes métodos de sacrificio con distintas proporciones de hielo y agua, se realizó una recopilación y análisis de los protocolos de sacrificio utilizados en las empresas de acuicultura. Debido a que alguna información no estaba estandarizada se solicitó a la Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España (APROMAR) que distribuyera un cuestionario cerrado (opción múltiple) a sus socios productores de dorada o lubina.

El cuestionario contenía 8 preguntas:

1. Forma de pesca (salabre vs bombeo)
2. Tiempo de agrupamiento peces
3. Ritmo de pesca (ton/min)
4. Proporción agua- hielo invierno
5. Proporción agua- hielo verano
6. Temperatura de la mezcla
7. Proporción pescado-mezcla
8. Tiempo estimado a la muerte

El análisis de los protocolos fue descriptivo.

Además, se acordó con algunos productores visitar sus instalaciones para realizar un seguimiento del proceso de sacrificio desde la captura en las redes hasta la muerte: temperatura del agua al largo de la columna de agua, tiempos de permanencia en red, modo de trasvase de red a tanques de sacrificio, cantidad de agua y hielo, densidad de peces, evolución de la temperatura del medio, oxígeno disuelto. En todos casos se midió el tiempo empleado en los distintos pasos del proceso de sacrificio. Los tiempos fueron medidos en diferentes filmaciones

Participantes:

Grupo	Centro	Investigadores	Actividad específica
APROMAR		Javier Ojeda y empresas anónimas	Consulta a empresas asociadas. Normalización de protocolos a escala industrial
Cataluña	IRTA	Ana Roque/Neil Duncan/ Ignasi Gairin	Análisis de datos e informe.
Doramenor		Antonio Belmonte	Aportación de datos e instalaciones
Cases d'Alcanar		José Luis Tejedor	Aportación de datos e instalaciones

### **Actividad 2.3.1.2. Evaluación del sacrificio en agua fría**

Para la evaluación del sacrificio en agua fría se realizaron dos experimentos: un primer experimento fue orientado a establecer el nivel basal que las operaciones de captura, aturdimiento y sacrificio tenían sobre los parámetros de comportamiento, marcadores bioquímicos, moleculares e índices de calidad. En un segundo experimento, se ensayaron varias condiciones relativas a la densidad y temperatura de sacrificio

**Experimento 1:** Evaluación de los protocolos de sacrificio actuales basados en agua fría y establecimiento de los niveles basales para las variables de estudio

Los experimentos de esta tarea se llevaron a cabo en las instalaciones del centro IFAPA El Toruño (El Puerto de Santa María, Cádiz).

Diseño experimental

En el experimento se utilizaron 80 peces de talla comercial (400-500 gr). Las doradas tenían un peso vivo medio de 500g y las lubinas de 423g. Para evaluar el efecto debido a la captura y confinamiento previo al sacrificio, los ejemplares de dorada y lubina se repartieron en grupos de 40 en tanques de 4 m<sup>3</sup> a

temperatura controlada (18-20°C). Los peces fueron aclimatados durante 6 semanas en las instalaciones del centro IFAPA El Toruño y 24 h antes del inicio de los experimentos se mantuvieron en ayunas.

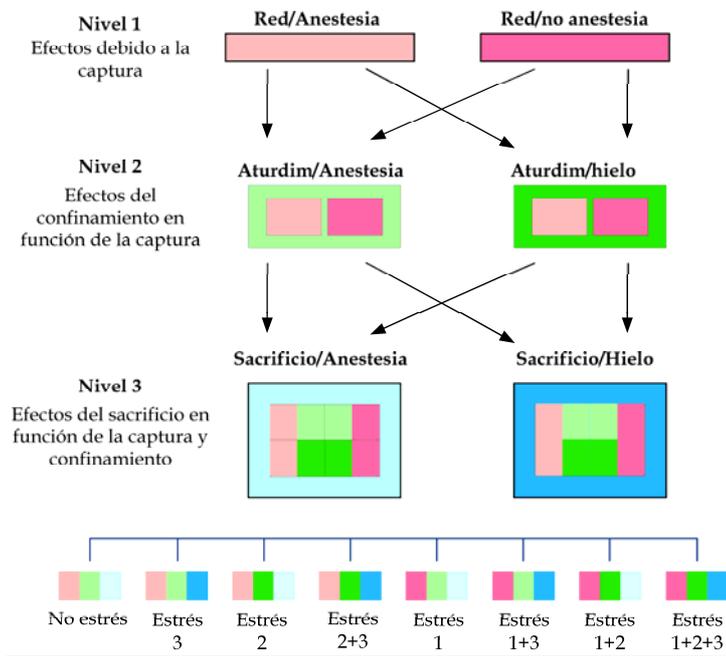


Figura 2: Diseño experimental propuesto para evaluar los efectos de la captura y confinamiento previos al sacrificio de peces mediterráneos.

El esquema del experimento se indica en la Fig. 2. Existieron 3 niveles de ensayo: Captura (nivel 1), Aturdimiento (nivel 2) y Sacrificio (nivel 3). En total, existieron 8 grupos experimentales con 10 individuos cada uno tal como se describen a continuación.

- 1) **Grupo SAA:** Sedación con 100 ppm de fenoxietanol previo captura durante 5 minutos, aturdimiento en 300 ppm de fenoxietanol hasta pérdida de reflejos y sacrificio en sobredosis de fenoxietanol (550 ppm)
- 2) **Grupo SAF:** Sedación con 100 ppm de fenoxietanol previo captura, aturdimiento en 300 ppm de fenoxietanol y sacrificio en agua con hielo en una proporción 1:1
- 3) **Grupo SFA:** Sedación con 100 ppm de fenoxietanol previo captura, aturdimiento en agua con hielo en una proporción 1:1 y sacrificio en sobredosis de fenoxietanol (550 ppm)
- 4) **Grupo SFF:** Sedación con 100 ppm de fenoxietanol previo captura, aturdimiento en agua con hielo en una proporción 1:1 y sacrificio en agua con hielo en una proporción 1:1
- 5) **Grupo DAA:** Captura directa con red simulando las condiciones de la empresa dejando constante el tiempo, aturdimiento en 300 ppm de fenoxietanol y sacrificio con sobredosis de fenoxietanol (550 ppm)
- 6) **Grupo DAF:** Captura directa con red simulando las condiciones de la empresa dejando constante el tiempo, aturdimiento en 300 ppm de fenoxietanol y sacrificio en agua con hielo en una proporción 1:1
- 7) **Grupo DFA:** Captura directa con red simulando las condiciones de la empresa dejando constante el tiempo, aturdimiento en agua con hielo en una proporción 1:1 y sacrificio con sobredosis de fenoxietanol (550 ppm)
- 8) **Grupo DFF:** Captura directa con red simulando las condiciones de la empresa dejando constante el tiempo, aturdimiento en agua con hielo en una proporción 1:1 y sacrificio en agua con hielo en una proporción 1:1

El experimento se llevó a cabo por duplicado y para cada tratamiento se registró el tiempo de duración cada fase, los parámetros de comportamiento y se diseccionaron 5 individuos para parámetros sanguíneos y moleculares y otros 5 individuos se utilizaron para evaluar los parámetros de calidad de carne.

**Respecto a los parámetros de comportamiento se evaluó:**

- 1) Pérdida parcial del equilibrio
- 2) Reacción a estímulos externos: Presión fuerte del pedúnculo caudal.= aturrido
- 3) Pérdida de movimiento ocular (vestíbulo-ocular reflex-VOR). Determinado por la falta de repuesta al estimular el ojo.
- 4) Tiempo de muerte(cese de los movimientos operculares y oculares)= muerto

**Respecto a los parámetros bioquímicos y hormonales**, se extrajo sangre de la vena caudal mediante jeringas heparinizadas. Posteriormente, se separó el plasma para medir la determinación de osmolalidad, niveles de glucosa, lactato y cortisol plasmático.

**Respecto a los marcadores moleculares**, se tomaron muestras independientes de cerebro, hígado y riñón como órganos diana del sistema neuroendocrino sensor de estrés. Las muestras se fijaron en nitrógeno líquido (IFAPA) o RNAlater (ICCM) según grupo de acuerdo con las condiciones de transporte.

Para el aislamiento del ARN total se utilizó el kit Rneasy® Mini (Qiagen) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. El lisado del tejido se realizó con el homogenizador FatsPrep® - 24 (MP Biomedicals) durante 40 segundos a una velocidad de 6 m/s. Las muestras de tejido se colocaron dentro de las columnas Lysing Matrix D (MP Biomedicals) que contenían 1 mL de tampón RLT (Qiagen) y 10 µL de TCEP-HCl 1M. Todas las muestras se trataron dos veces con RNase-Free DNase (Qiagen) para eliminar los restos de ADN genómico. Para evitar la presencia de ribonucleasas, los materiales utilizados (puntas para pipetas y tubos para microcentrífuga o PCR) fueron esterilizados dos veces en el autoclave (120°C/20 minutos). Para comprobar la calidad del ARN extraído, las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X. La cuantificación del ARN se llevó a cabo en un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific). El ARN se conservó a -80 °C hasta el momento de su utilización.

Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la cuantificación de la expresión génica se diseñaron cebadores específicos con el software Oligo v6.89. El panel de genes finalmente estudiado para dorada se indica en la tabla 1. La expresión de cada gen se cuantificó mediante PCR a tiempo real en el Thermal Cycler CFX96 Real-Time System (Bio-Rad). Las condiciones fueron: 95°C, 3:30 min + (68°C, 15s; 72°C, 30 s) x 40 ciclos + 95°C, 1 min. Para las reacciones se utilizó el kit GeneAmp® Fast PCR Master Mix y las muestras se prepararon y el ciclado se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR a tiempo real se llevaron a cabo en un volumen de 25 µL conteniendo ADNc equivalente a 10 ng del ARN original, 300 nM de oligos específicos forward/reverse, 12,5 µL de iQ™ SYBR Green Supermix (Bio Rad) y 9 µL de H<sub>2</sub>O ultra pura. Cada muestra se analizó por triplicado. Para el análisis de los datos se llevó a cabo una cuantificación relativa. Para normalizar se utilizó la ubiquitina (EEF1a o RPL13a). Para dicho estudio se utilizó como calibrador la condición SAA. La expresión génica relativa se determinó mediante el método  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS. Se usó análisis de varianza multivariado (MANOVA) de dos vías para evaluar los efectos de los factores de captura, aturdimiento y sacrificio, sobre las variables dependientes (genes). Antes de realizar el análisis estadístico se evaluaron los supuestos de normalidad (prueba de Lilliefors) y homocedasticidad de varianza (prueba de Levene) y se realizaron transformaciones logarítmicas cuando estos supuestos no se cumplieron.

Tabla 1: Genes estudiados en dorada. Se indicada el gen, la referencia de la secuencia (Accession number), los cebadores diseñados y su dirección y el amplicón.

Gen	Secuencia	Dirección	Secuencia cebador (5'-3')	Amplicon (pb)
HSP70	FP335776	F	GCTGGAGAAGGTGTGCAACCC CATC	111
		R	GCACCACCGGCTCCAGGGAAG	
HSP90AB	FG590322	F	CACGAAGACTCTCAAACCGC AAGAAGC	119
		R	TTCTGGTTTTCTTCATGCGGG TCA	
GR	DQ486890	F	AAAGCATTAAACGGCAGTGGGG CAGT	93
		R	CAGATGGGGATATGCTAGGGC ACGAC	
TGF- $\beta$ 1	AF510084	F	CTTGGAGATGGTGAAGAAAA GCGCATT	127
		R	GAGGGACAACAGGCTGCTGGG GATT	
IL-6	EU244588	F	GCGCCTTCACCGACAATCCAG A	74
		R	CAGTGGGTCCGCGGGCCTCT	
PEPCK mitocondrial	AF427868	F	CGGCACCTCAGACAAGACCAA CCCCTA	111
PEPCK citosólica	HS987135	R	GCCAGGCCCTCCCACCACA	105
		F	TGGATCAGGAGTTCTGGCAGA AGGAGGT	
COX-2	AM296029	R	GGAGATCCAGTTGCCGGGCCA C	116
		F	GGCTCGTCTGCAATAACGTGA AGGGA	
RPL13a	HS987746	R	ACTGCCGCCTGAGTGGGACGT G	89
		F	CGAAGGCATCAACATCTCCGG CAACT	
EEF1A	AF184170	R	GGGAAGGGTTGGTGTTCATCC TCTTACGC	98
		F	AGTGGCTGTTGGTGTCATCAA GGCTGT	
		R	CGACCATTCAATTTCTTCTCTG GCGCTTC	

**Respecto a los análisis de calidad de la carne**, para detectar posibles variaciones debidas a las distintos niveles del experimento se realizaron los siguientes análisis a las 0, 2, 6, 12, 24 y 48 horas *postmortem* (según parámetro):

- Desarrollo del *rigor mortis* según Bito et al., 1983.
- pH: pHmetro 210A con electrodo de penetración (Thermo Orion).
- Sensorial *de visu* tanto del animal entero como del filete valorando la presencia de: descamaciones, magulladuras, hemorragias, manchas de color, etc.

## Participantes y distribución de tareas entre los grupos

<i>Dorada y lubina</i>						
Grupo	Centro			Investigadores	Metodología específica	
<b>Andalucía</b>	IFAPA			Manuel Manchado, Concha Berbel	Experimentación	Tarea 1.
<b>Todas</b>	IFAPA	IRTA	ICCM	Manuel Manchado, Concha Berbel, Ana Roque, María Dolores Hernández, Rafael Ginés	Participación en la experimentación	
<b>Cataluña</b>	IRTA			Ana Roque	Parámetros bioquímicos y hormonales	
<b>Andalucía</b>	IFAPA (dorada)			Manuel Manchado, Concha Berbel, Rafael Ginés	Marcadores moleculares	
<b>Canarias</b>	ICCM (lubina)					
<b>Canarias y Murcia</b>	IMIDA, ICCM			María Dolores Hernández, Rafael Ginés	Parámetros de calidad de la carne	

### Rodaballo- Diseño experimental

En esta especie los procedimientos habituales de sacrificio no exigen someter a los animales a situación previa de confinamiento. Por tanto, no se desarrolló el nivel 2 establecido para dorada y lubina.

-Número de animales: 40 peces de talla comercial (400-500 gr).

El diseño experimental que se siguió se explica en la Figura 3. Para estudiar los efectos debido a la captura previo al sacrificio se procederá con el siguiente diseño experimental (nivel 1): un grupo se sometió a anestesia profunda previa a la captura y otro grupo se capturará directamente con red simulando las condiciones de la empresa. Posteriormente, los animales se sacrificaron (nivel 2) según las combinaciones de captura bien con anestésico o con hielo según la proporción utilizada en las empresas tal como se obtendrá del punto 3.6.1.1.

El sacrificio se realizó por la mañana y tras 24 horas de ayuno. Las condiciones de temperatura serán 15°C utilizando fenoxietanol como anestésico en las dosis referidas anteriormente.

Para cada muestreo indicado arriba se le realizaron los siguientes análisis (metodología descrita más abajo):

- 1.- Parámetros de comportamiento (todos los individuos)
- 2.- Parámetros bioquímicos y hormonales (todos individuos por grupo)
- 3.- Marcadores moleculares (5 individuos por grupo)
- 4.- Parámetros de calidad de la carne (todos individuos por grupo)

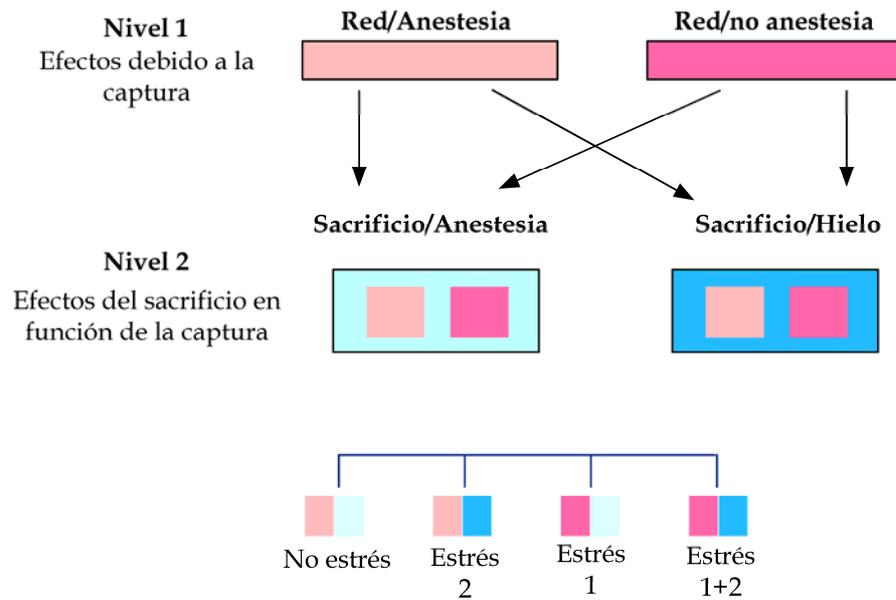


Figura 3: Diseño experimental propuesto para evaluar los efectos de la captura y sacrificio en rodaballo.

#### **Actividad 2.3.1.3.: Optimización del sacrificio en agua fría**

Esta tarea fue llevada a cabo en las instalaciones del IMIDA-San Pedro del Pinatar para dorada y lubina. Para dicha tarea se realizaron 3 experimentos con el objetivo de establecer las proporciones adecuadas de agua/hielo, las densidades en las cubas y los tiempos de confinamiento previos al sacrificio.

##### *Experimento 2. Evaluación de distintas proporciones de agua /hielo y densidad (dorada y lubina)*

Para este experimento se capturaron animales que habían sufrido un confinamiento de 15 y 60 min (nivel 1) y se sacrificaron a dos distintas proporciones de hielo y agua de tal forma que la temperatura final del agua fue de 1.5°C y 4.5°C. Además, para evaluar el efecto densidad los animales se sacrificaron a densidades de 12.5 (LD) y 50% (HD) peso/volumen para cada proporción de agua/hielo. En este experimento se usaron 5-6 peces en la densidad baja y por tratamiento y 25 peces en la densidad alta. En el caso de la lubina no se ensayaron la temperatura de 4-5°C porque no había mortalidad

Figura 4: Diseño experimental propuesto para evaluar los efectos de las proporciones de 12.5% de biomasa de peces: 87.5 % volumen de agua fría  
 50% de biomasa de peces: 50% volumen de agua fría

<i>Sparus aurata</i>					
Condición	1	2	3	4	Peces sacrificados en baño de hielo a la temperatura y densidad indicadas
Tiempo:	15'	15'	15'	15'	
temperatura:	1-2°C	1-2°C	4-5°C	4-5°C	
%	50%	2.5%	50%	2.5%	
Peso* 1	398.2	512.0	337.4	338.2	
2	401.2	384.7	358.7	307.4	
3	549.1	319.5	397.7	527.4	
4	467.3	404.5	411.7	409.5	
5	457.3	430.5	435.6	448.9	
Condición	5	6	7	8	
Tiempo:	60'	60'	60'	60'	
temperatura:	1-2°C	1-2°C	4-5°C	4-5°C	
%	50%	2.5%	50%	2.5%	
Peso* 1	346.7	463.5	443.3	399.3	
2	476.4	330.8	485.1	363.6	
3	389.1	363.3	468.7	665.9	
4	386.2	327.7	310.5	469.9	
5	406.1	386.4	426.2	330.2	
Condición	11	12	13	14	Experimento de confinamiento 10kg/10L. Sacrificados por contusión
Tiempo:	0'	15'	60'	120'	
Sacrificio:	Contusión	Contusión	Contusión	Contusión	
Peso* 1	420.5	504.0	461.2	235.7	
2	438.9	425.0	396.4	558.6	
3	523.2	464.2	300.9	390.3	
4	389.7	504.9	430.3	371.0	
5	293.5	542.4	495.6	374.5	

\*Pesos de los animales a los cuales se les ha tomado muestra (cerebro, hígado, riñón y sangre)

<i>Dicentrarchus labrax</i>						
Condición		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	Peces sacrificados en baño de hielo a la temperatura indicada.
Tiempo:		15'	15'			
temperatura:		1-2°C	1-2°C			
%		50%	2.5%			
Peso:	1	193.1	254.2			
	2	264.3	238.7			
	3	288.0	221.3			
	4	316.5	258.7			
	5	215.1	215.7			
Condición		<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	
Tiempo:		60'	60'			
temperatura:		1-2°C	1-2°C			
%		50%	2.5%			
Peso:	1	223.9	172.4			
	2	298.4	195.6			
	3	293.7	292.3			
	4	332.4	358.3			
	5	305.1	250.0			
Condición		<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	Experimento de confinamiento 10kg/10L. Sacrificados por contusión
Tiempo:		0'	15'	60'	120'	
Sacrificio		Contusión	Contusión	Contusión	Contusión	
Peso:	1	270.9	232.6	224.2	177.7	
	2	223.9	230.8	183.5	210.2	
	3	264.9	193.3	216.6	292.7	
	4	171.2	234.0	242.0	192.2	
	5	220.0	200.6	181.4	204.5	

*Experimento 3. Evaluación del confinamiento en los tiempos previos al sacrificio (dorada y lubina)*  
 Para determinar el efecto del confinamiento, se siguió el modelo de la Figura 4. Se establecieron 4 tiempos: 0min, 15 min (tiempo mínimo estimado en las granjas-ver tarea 1), 60 minutos (tiempo máximo estimado en las granjas- ver tarea 1) y 120 minutos. En este experimento los peces se sacrificaron mediante contusión con un golpe en la cabeza.

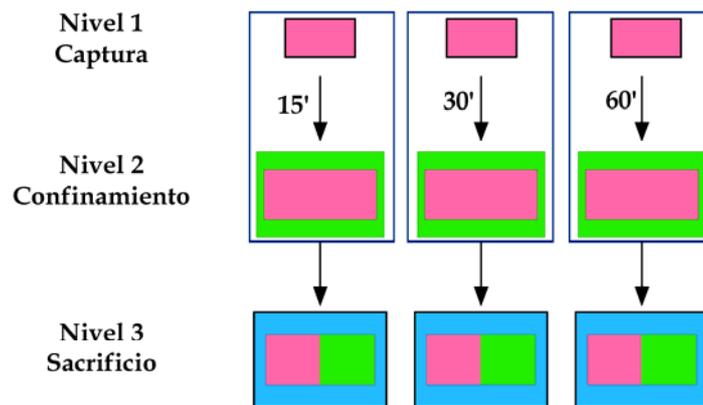


Figura 5: Diseño experimental propuesto para evaluar el efecto de los tiempos de captura y confinamiento antes del sacrificio.

Participantes y distribución de tareas entre los grupos

<i>Dorada y lubina</i>			
Grupo	Centro	Investigadores	Metodología específica
Murcia	IMIDA	María Dolores Hernández,	Experimentación Tarea 2. Dorada y lubina
Todas	IFAPA, IRTA, ICCM, IMIDA	Manuel Manchado, Concha Berbel, Ana Roque, María Dolores Hernández, Rafael Ginés, Ignasi Gairin	Participación en la experimentación Parámetros de comportamiento
Cataluña	IRTA	Ana Roque	Parámetros bioquímicos y hormonales
Andalucía	IFAPA (dorada)	Manuel Manchado, Concha Berbel, Rafael Ginés	Marcadores moleculares
Canarias	ICCM (lubina)		
Canarias y Murcia	IMIDA, ICCM	María Dolores Hernández, Rafael Ginés	Parámetros de calidad de la carne

La metodología para análisis de parámetros de comportamiento, bioquímicos, moleculares y de calidad es igual a la descrita anteriormente

**2.3.objetivo2. Evaluación de métodos de sacrificio alternativos al agua fría y su aplicabilidad como métodos de aturdimiento previo aplicados al sacrificio de dorada, lubina y rodaballo. Efectos sobre el estrés, calidad de la carne e impacto económico.**

**2.3.2.1 Evaluación de la mezcla de gases en dorada y lubina**

Se ensayaron distintas proporciones de gases (CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>) para aturdimiento seguido de sacrificio en agua fría 50:50. Se ensayaron diferentes proporciones de los dos gases, primero nitrógeno solo y después mezcla con las siguientes combinaciones: 20ppm CO<sub>2</sub>+15-20% O<sub>2</sub> Sa; 52ppm CO<sub>2</sub> + 16% O<sub>2</sub>; 79ppm CO<sub>2</sub>+20% O<sub>2</sub>; 101ppm CO<sub>2</sub>+13%O<sub>2</sub>; 145ppm CO<sub>2</sub>+15% O<sub>2</sub> Sa; 68ppm CO<sub>2</sub>+15%N<sub>2</sub>+5°C. Se asumió que el Nitrógeno desplazaba en una proporción de 1:1 el oxígeno, dado que no se disponía de manera de medir el N<sub>2</sub> en el agua al momento. Las condiciones de temperatura fueron 18-20°C.

### 2.3.2.2 Evaluación la anestesia en dorada y lubina

Para el uso de Aqui-S se hizo una prueba preliminar para ver qué cantidad era que podría aturdir estas especies. Se ensayaron distintas dosis del anestésico para aturdimiento seguido de sacrificio en agua fría:

-Dorada 15, 30, 40, 200, 300 y 400 ppm

-Lubina: 100, 150, 200 y 300 ppm

Los peces pasaron a agua fría cuando se vieron aturdidos (sin respuesta a estímulos y con pérdida de equilibrio).

Para evaluar el efecto de anestesia y gases, se ensayaron los parámetros de comportamiento y calidad de la carne *in situ* y se tomaron muestras de sangre, y órganos internos para evaluación del estrés en las condiciones que se indican en la figura siguiente. Se tomaron muestras de los tratamientos que se consideraron los tiempos hasta aturdimiento aceptables (cercanos a 1min) y de los respectivos controles. Se muestrearon 5 peces por grupo.

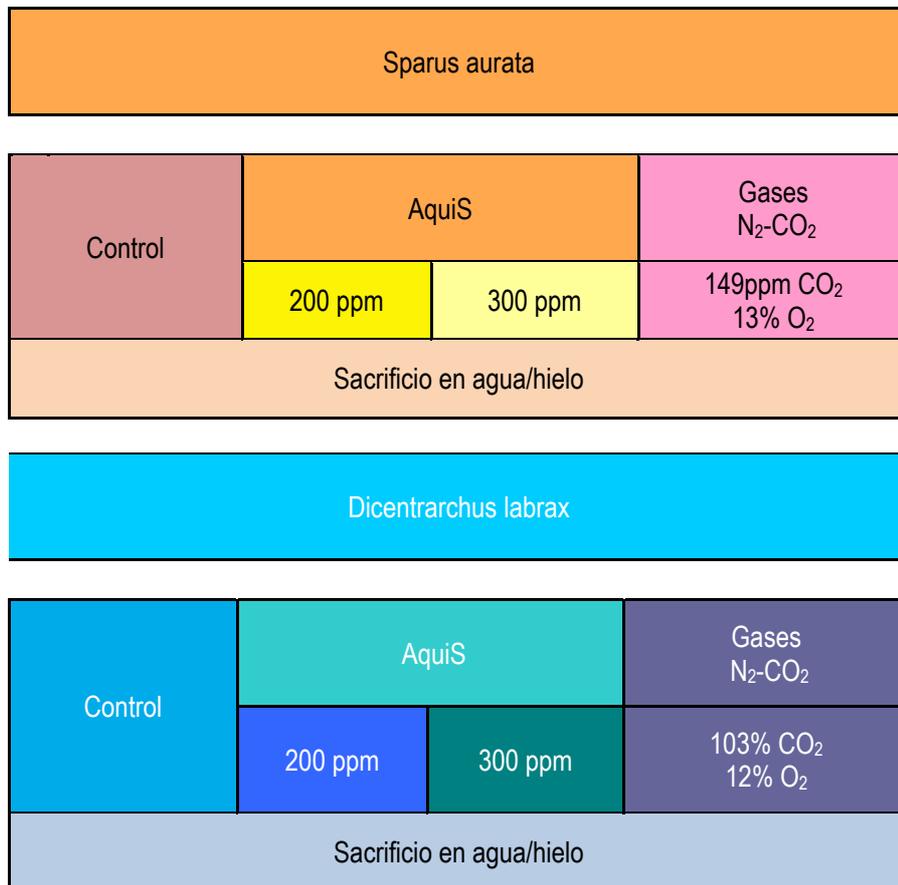


Figura 6 Tratamientos utilizados en los experimentos 4 y 5

## Participantes y distribución de tareas entre los grupos

Grupo	Centro	Investigadores	Metodología específica
<b>Dorada y lubina</b>			
Cataluña	IRTA	Ana Roque, Ignasi Gairin	Experimentación Tarea 3. Dorada y lubina
Todas	IFAPA, IRTA, ICCM, IMIDA	Manuel Manchado, Concha Berbel, Ana Roque, María Dolores Hernández, Rafael Ginés, Ignasi Gairin	Participación en la experimentación Parámetros de comportamiento
Cataluña	IRTA	Ana Roque	Parámetros bioquímicos y hormonales
Andalucía Canarias	IFAPA, ICCM	Manuel Manchado, Concha Berbel, Rafael Ginés	Marcadores moleculares
Canarias y Murcia	IMIDA, ICCM	María Dolores Hernández, Rafael Ginés	Parámetros de calidad de la carne

## 2.4. RESULTADOS

### **2.4.1. Objetivo 1: Evaluación y mejora de las prácticas para el sacrificio de peces marinos en agua muy fría y su efecto sobre el estrés y calidad de la carne**

#### **Actividad 2.4.1.1: Analizar los protocolos de sacrificio utilizados por las empresas españolas**

En total se accedió a 11 protocolos de sacrificio (6 de lubina y 5 de dorada) usados por empresas con jaulas en España. Debido a que alguna información no estaba estandarizada se solicitó a la Apromar que distribuyera un cuestionario cerrado (opción múltiple) a sus socios productores de dorada o lubina.

El cuestionario contenía 8 preguntas:

- Forma de pesca (salabre vs bombeo)
- Tiempo de agrupamiento peces
- Ritmo de pesca (ton/min)
- Proporción agua- hielo invierno
- Proporción agua- hielo verano
- Temperatura de la mezcla
- Proporción pescado-mezcla
- Tiempo estimado a la muerte

Tanto para lubina como para dorada el 100% de las respuestas decían usar salabre aunque uno también usaba el bombeo para las 2 especies. La gran mayoría tardaba de 15 a 30 minutos en agrupar los peces, aunque esta fase podía durar en algunos casos hasta 60 minutos (pesca por bombeo). El ritmo de pesca varió de 2 min/ton (dorada) y de 5 min/ton (lubina) a más de 10 min por tonelada en ambas especies. La proporción de agua-hielo en invierno es variable y va de 1-1/3 a 1-1.25 en las dos especies. En verano, la cantidad de hielo para la mayoría fue de una proporción 1-1.5. La temperatura de la mezcla para casi todos se situó entre 0 y 3°C, y sólo en un caso para cada especie la temperatura varió entre 1 y 5°C. La proporción pescado-mezcla varió mucho con las respuestas situadas entre 300 kg en 200 L y 300 kg en 600 L. La mayoría (excepto uno) situó el tiempo estimado a la muerte entre 1 y 5 min.

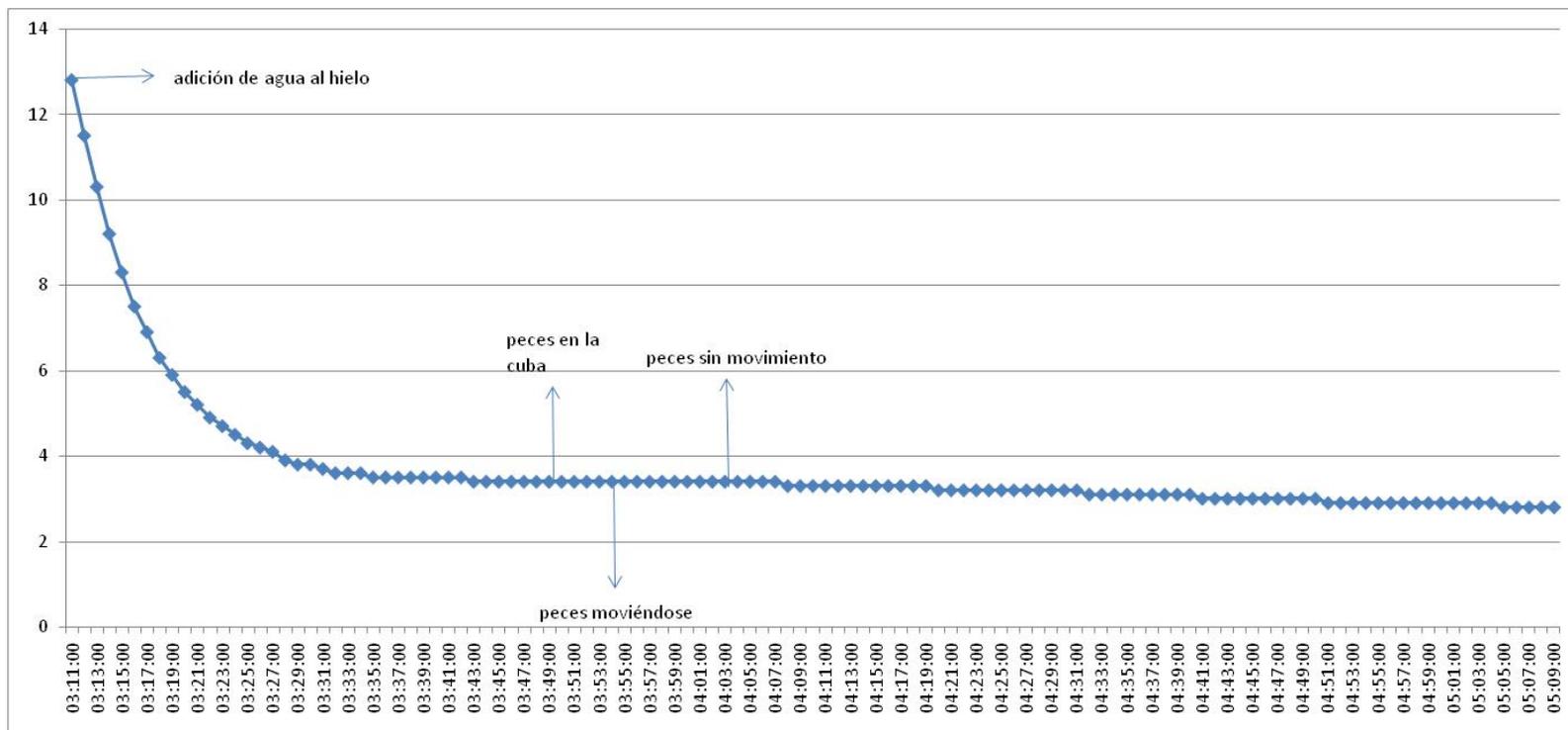
Se realizaron 2 salidas acompañando al personal de las empresas a las cosechas: una de dorada en Cataluña y una de lubina en Murcia. En estas dos salidas, se llevó un datalogger que registró la temperatura cada minuto en una de las cubas de sacrificio y se filmó de forma detallada el proceso del sacrificio.

Del análisis de la información recogida en estas visitas se cuenta con la siguiente información:

## LUBINA

Se cosecharon 40 toneladas de ~~lobina~~ lubina con un peso de 400 a 500 g. El barco salió de puerto a la 1:00 h y pescó hasta las 7:00h aprox. Se pescaron dos jaulas. A la llegada a la jaula la temperatura del agua del mar en la superficie era de 13.5 °C y el oxígeno era 8.3 mgO<sub>2</sub>/L. La agrupación de peces y el despesque se prolongó por un periodo de cerca de 30 min con unos preparativos previos de unos 15 min realizados por los buzos. El despesque fue hecho con un salabre mecanizado con una grúa. Las lubinas estaban en el salabre por un periodo de 35±5 segundos; aproximadamente 20 segundos era el tiempo que duraba la maniobra desde que los peces salían del agua hasta llegar a los contenedores de cosecha y entre 10-20 segundos es el tiempo que se tardaba en ~~para~~ vaciar el salabre. Con un solo salabre casi se llenaba un tanque de cosecha. Los contenedores de cosecha tienen una capacidad de unos 1000 L. Los tanques contenían entre un 15-20% de su capacidad de hielo y agua antes de poner las lubinas. Midiendo con un oxímetro Oxyguard, la temperatura de la mezcla era de 2.2±0.2°C y el oxígeno estaba a 45% de saturación (10 mg/L). El datalogger ubicado en el fondo del tanque registró una temperatura de 3.4°C cuando las lubinas fueron depositadas en el tanque. La temperatura siguió bajando hasta llegar a un mínimo de 2.8°C, 1 h después de la entrada de los peces (figura 7). Observando el comportamiento de los peces, se comprobó que, durante los primeros 5 minutos aparentemente todas las lubinas estaban muy activas intentando escapar del tanque. A los 10 minutos el porcentaje de lubinas que se movían decreció notablemente, y a los 15 minutos ya no había ningún tipo de movimiento en las cubas. Con esta información se estimó que el ritmo de cosecha fue de 1 ton cada 3 a 5 min y que las cubas contenían cerca de 500kg de pescado.

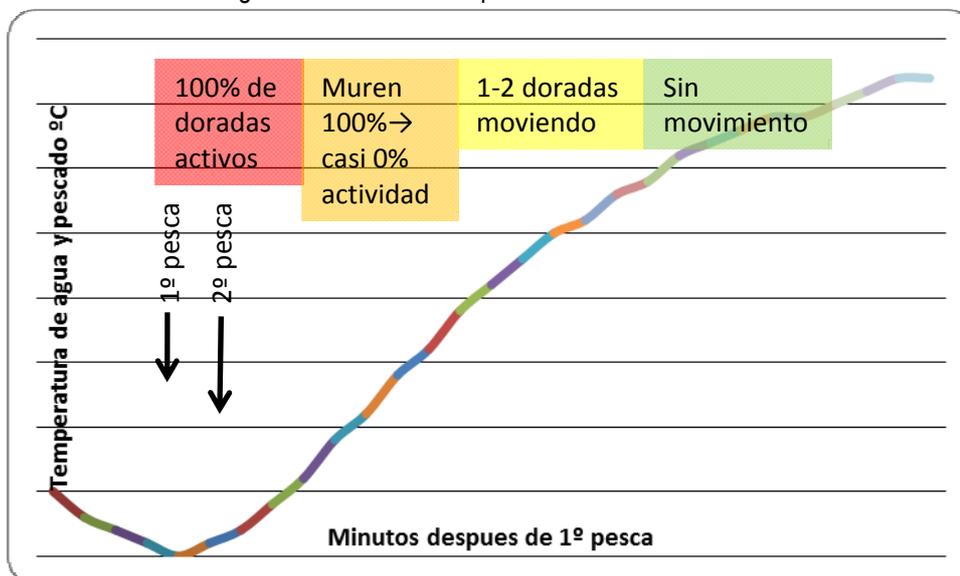
Figura 7- Gráfica de temperatura de una de las cubas de sacrificio



## DORADA

Se cosecharon 6 toneladas de dorada con peso medio de approx 460g. El barco salió de puerto a las 7:00 am y regresó a las 9.30 am. Sólo se hizo cosecha parcial de una jaula. A la llegada a la jaula la temperatura del agua a la superficie era de 11.8°C y el oxígeno era 7.7 mgO<sub>2</sub>/L. Durante el agrupamiento, la mínima concentración de oxígeno registrada fue de 5.5 mgO<sub>2</sub>/L. Los preparativos previos realizados por los buzos duraron unos 8 minutos. El proceso de agrupamiento o confinamiento de las doradas en un pequeño volumen con el encierro de la malla de jaula fue realizado en 6 minutos, y el despesque, empezó un minuto después. El despesque duró 30 minutos y se realizó con un salabre mecanizado con una grúa. Las doradas estaban en el salabre por un periodo de 30±5 segundos, aproximadamente. La maniobra duraba 16 segundos desde que salían del agua hasta llegar a los contenedores de cosecha y entre 6-34 segundos es lo que se tardaba en vaciar el salabre. Con un salabre casi se llenaba un tanque de cosecha. Los contenedores de cosecha tenían una capacidad de unos 500 L y se llenaban entre un 20-25% de su capacidad de hielo y agua antes de poner las doradas. La temperatura de la mezcla era de -0.6±0.2°C medido con la sonda del oxímetro. El datalogger en el fondo del tanque registro 0.5°C en el momento en que las doradas fueron depositadas en el tanque, la temperatura bajó a 0°C durante los primero 4 minutos y después en los siguientes 28 minutos la temperatura fue subiendo gradualmente hasta estabilizarse en 3.7°C momento en el cual se sacó el datalogger del tanque (figura 8). Durante los primeros 5 minutos aparentemente todas las doradas estaban muy activas intentando escapar del tanque. A los 10 minutos el porcentaje de doradas que intentaban escapar decreció notablemente hasta solo quedar 1-2 peces moviéndose (boquear o colear). En los tres tanques observados, el último movimiento que se observó en los peces fue a los, 15±1.7 minutos después de que el último pez vivo fuera depositado en el tanque.

Figura 8- Gráfica de temperatura de una de las cubas de sacrificio



### Actividad 2.4.1.2: Evaluación del sacrificio en agua fría

Para la evaluación del sacrificio en agua fría se desarrolló un primer experimento para definir los niveles basales de los distintos parámetros de medida tomando tres niveles de tratamiento: captura, aturdimiento y sacrificio. Si tomamos como referencia las condiciones generales a respetar en el sacrificio de los animales (REAL DECRETO 54/1995), no se causará a los animales agitación, dolor o sufrimiento evitables durante las operaciones de traslado, conducción, estabulación, sujeción, aturdimiento, y sacrificio

En total se ensayaron 8 grupos experimentales:

- 1) **Grupo SAA:** Sedación con 100 ppm de fenoxietanol previo captura durante 5 minutos, aturdimiento en 300 ppm de fenoxietanol hasta pérdida de reflejos y sacrificio en sobredosis de fenoxietanol (550 ppm)
- 2) **Grupo SAF:** Sedación con 100 ppm de fenoxietanol previo captura, aturdimiento en 300 ppm de fenoxietanol y sacrificio en agua con hielo en una proporción 1:1
- 3) **Grupo SFA:** Sedación con 100 ppm de fenoxietanol previo captura, aturdimiento en agua con hielo en una proporción 1:1 y sacrificio en sobredosis de fenoxietanol (550 ppm)
- 4) **Grupo SFF:** Sedación con 100 ppm de fenoxietanol previo captura, aturdimiento en agua con hielo en una proporción 1:1 y sacrificio en agua con hielo en una proporción 1:1
- 5) **Grupo DAA:** Captura directa con red simulando las condiciones de la empresa dejando constante el tiempo, aturdimiento en 300 ppm de fenoxietanol y sacrificio con sobredosis de fenoxietanol (550 ppm)
- 6) **Grupo DAF:** Captura directa con red simulando las condiciones de la empresa dejando constante el tiempo, aturdimiento en 300 ppm de fenoxietanol y sacrificio en agua con hielo en una proporción 1:1
- 7) **Grupo DFA:** Captura directa con red simulando las condiciones de la empresa dejando constante el tiempo, aturdimiento en agua con hielo en una proporción 1:1 y sacrificio con sobredosis de fenoxietanol (550 ppm)
- 8) **Grupo DFF:** Captura directa con red simulando las condiciones de la empresa dejando constante el tiempo, aturdimiento en agua con hielo en una proporción 1:1 y sacrificio en agua con hielo en una proporción 1:1

### RESULTADOS:

Los tiempos registrados para cada nivel de los 8 distintos grupos experimentales se indican en la tabla 2. Además, los tratamientos de captura directa se hicieron por duplicado (indicados como I y II). Para el aturdimiento, los tiempos se definieron como el período transcurrido hasta que el pez se giró con el vientre hacia arriba y no reaccionó a un estímulo de presión en el pedúnculo caudal. Para muerte, los tiempos se definieron como el tiempo transcurrido hasta que el pez dejó de presentar movimientos operculares indicando que no respiraba.

	DORADA			LUBINA		
Tratamiento	Captura	Aturdimiento	Muerte	Captura	Aturdimiento	Muerte
<b>I-DAA</b>	Directa( 5min)	00:04:40	<b>00:02:00</b>	Directa( 5min)	00:03:40	<b>00:03:19</b>
<b>I-DAF</b>	Directa (5min)	00:04:40	00:14:08	Directa (5min)	00:03:40	00:13:47
<b>I-DFA</b>	Directa (5min)	00:09:00	00:04:28	Directa (5min)	00:05:57	<b>00:11:12</b>
<b>I-DFE</b>	Directa (5min)	00:09:00	00:16:00	Directa (5min)	00:05:57	00:05:39
<b>I-SAA</b>	sedado (5min)	00:05:08	00:04:07	sedado (5min)	00:01:50	00:03:26
<b>I-SAF</b>	sedado (5min)	00:05:08	00:13:47	sedado (5min)	00:01:50	00:16:56
<b>I-SFA</b>	sedado (5min)	00:13:00	00:02:44	sedado (5min)	00:10:42	00:02:46
<b>I-SFE</b>	sedado (5min)	00:13:00	00:06:45	sedado (5min)	00:10:42	00:05:50
<b>II-DAA</b>	Directa( 5min)	<b>00:04:54</b>	00:01:45	Directa( 5min)	<b>00:01:05</b>	00:04:12
<b>II-DAF</b>	Directa (5min)	<b>00:04:54</b>	00:11:46	Directa (5min)	<b>00:01:05</b>	00:14:24
<b>II-DFA</b>	Directa (5min)	00:15:00	00:01:59	Directa (5min)	00:13:20	00:03:55
<b>II-DFE</b>	Directa (5min)	00:15:00	00:08:49	Directa (5min)	00:13:20	00:07:35

Tabla 2: Tiempos de aturdimiento y muerte durante el experimento 1.

## ANÁLISIS DE LA CALIDAD DE LA CARNE

### Actividad 2.4.1.2. Evaluación del sacrificio en agua fría

#### pH

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos para la evolución del pH de la carne desde el momento del sacrificio y hasta 72 horas postmortem, en función de la especie (dorada y lubina), método de captura (sin utilizar anestésico o usándolo para reducir la agitación en esta parte del proceso), tipo de aturdimiento (con hielo más agua o con empleo de anestésico) y medio de sacrificio (en hielo más agua o con exceso de anestésico).

Como se puede apreciar hay notables diferencias atendiendo a los factores considerados (se ha seguido un modelo lineal general con los cuatro factores fijos detallados en el párrafo anterior). De todos ellos, los que más influyen en la evolución del pH tras el sacrificio son el método de captura y el tipo de aturdimiento. Así, tenemos que el pH en el momento cero es más alto tanto en los peces que han sido parcialmente anestesiados para su captura como los que se han aturdido en un medio con anestésico. Parece lógico pensar que las reservas corporales en una situación menos estresante se han mantenido más intactas, por lo que no ha habido acúmulo muscular de los metabolitos de su utilización y que han conllevado a que los otros peces presenten un valor de pH inicial ya claramente por debajo de siete en la mayor parte de los casos.

Añadiendo a esto, los valores mínimos de pH son alcanzados por los peces sometidos a esas condiciones ya a las 9 horas postmortem, mientras que en los otros casos viene a ser a partir de las 24 horas. Esto va a condicionar la evolución y resolución del *rigor mortis*, tal y como se explicará más adelante, con un efecto claro sobre el mantenimiento de los atributos de frescura durante la conservación en hielo.

Aunque a priori no se planteó como un factor a tener en cuenta, la especie ha manifestado una clara influencia en la evolución del pH en función del protocolo seguido. De esta forma, la lubina tiene valores más bajos justo en el momento tras el sacrificio. Posteriormente se igualan para las dos especies, aunque a las 72 horas, cuando ya se ha superado el punto de pH más bajo y se inicia su ascenso debido a la acumulación de productos nitrogenados por el progresivo deterioro bacteriano, este es más acusado en el caso de la lubina (Figuras 9 y 10).

El medio de sacrificio también ha ejercido un efecto significativo, pero es de destacar su interacción con la especie. Se puede constatar que si bien cuando se utiliza exceso de anestésico el valor de pH en el momento 0 es mayor que cuando es agua más hielo para el caso de la dorada, en la lubina no es tan claro, y llega incluso en este último medio a proporcionar valores menores en la mayor parte de los casos.

Reseñar por último el importante efecto de la interacción entre la especie y el tipo de aturdimiento. Como ya se ha comentado con anterioridad, el aturdimiento en agua más hielo da valores de pH menores, pero las diferencias son más grandes para el caso de la dorada. En la lubina, con agua más hielo los valores no son tan bajos, mientras que en anestésico no son tan altos.

Tabla 3. Valores de pH tras el sacrificio (a 0, 2, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas postmortem) según especie, método de captura, tipo de aturdimiento y medio de sacrificio.

especie	DORADA								LUBINA								Significación de los factores						
	SA				CA				SA				CA										
	H		CA		H		CA		H		CA		H		CA								
sacrificio	H	CA	H	CA	H	CA	H	CA	H	CA	H	CA	H	CA	H	CA	ES	CP	AT	SC	ES*CP	ES*AT	ES*SC
pH-0	6,47	6,72	7,12	7,20	7,04	7,24	7,26	7,49	6,54	6,59	6,87	6,77	7,05	6,96	7,11	7,01	***	***	***	*	ns	***	***
pH-2	6,11	6,21	6,74	6,84	6,80	6,74	7,09	7,34	6,28	6,22	6,50	6,55	6,78	6,85	6,99	6,91	ns	***	***	ns	ns	***	ns
pH-6	5,79	6,08	6,38	6,51	6,27	6,41	6,74	7,08	5,95	5,94	6,20	6,33	6,52	6,64	6,94	6,81	ns	***	***	**	*	**	*
pH-9	5,81	5,92	6,26	6,39	6,48	6,31	6,46	6,89	5,73	5,93	5,94	6,01	6,22	6,31	6,48	6,52	*	***	***	*	ns	*	ns
pH-12	5,91	5,87	6,16	6,37	6,31	6,20	6,31	6,84	5,86	5,94	5,93	5,89	6,18	5,92	6,43	6,32	**	***	***	ns	ns	*	*
pH-24	5,87	6,05	5,90	5,94	5,75	5,87	5,94	5,98	5,92	6,02	5,93	5,93	6,01	6,05	5,92	6,04	*	ns	ns	***	*	*	ns
pH-48	5,93	6,09	5,97	5,97	5,84	5,82	6,02	5,99	5,95	5,93	6,00	6,00	5,98	5,97	6,04	6,05	ns	ns	*	ns	*	ns	ns
pH-72	5,86	5,83	5,93	5,89	5,90	5,79	5,98	5,90	6,06	6,07	6,11	6,04	6,14	6,08	6,12	6,11	***	ns	*	**	ns	ns	ns

SA – sin aturdimiento  
 CA – con aturdimiento  
 H – hielo más agua  
 ES – especie  
 CP – captura  
 AT – aturdimiento  
 SC – sacrificio

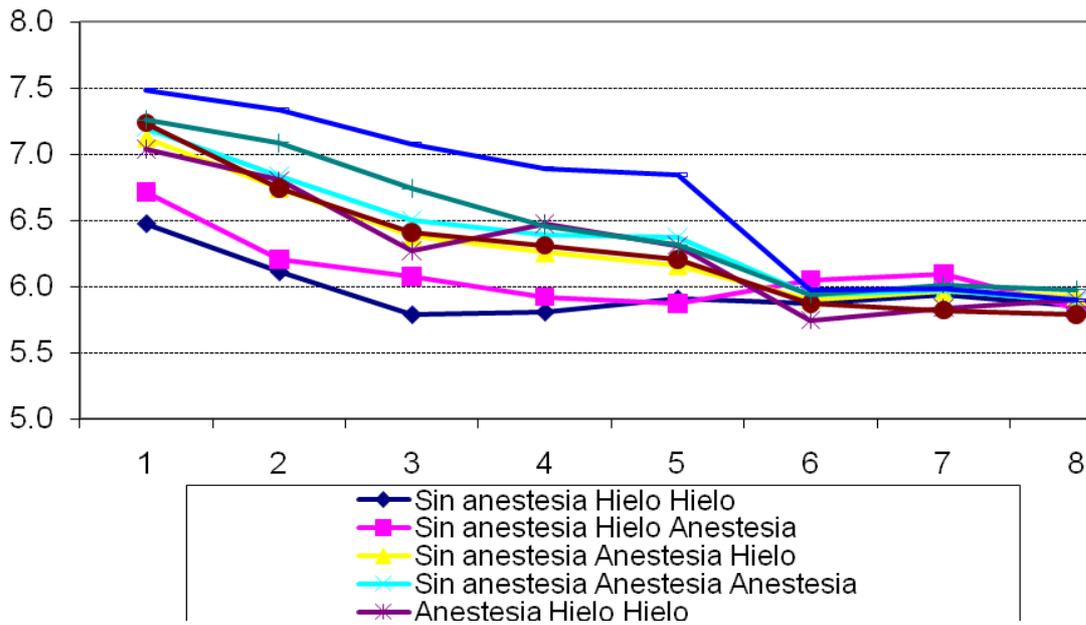


Figura 9. Evolución del pH de la carne tras el sacrificio (a 0, 2, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas postmortem) en dorada atendiendo al método de captura (con y sin anestesia), tipo de aturdimiento (agua más hielo y con anestesia) y al medio de sacrificio (agua más hielo y exceso de anestésico).

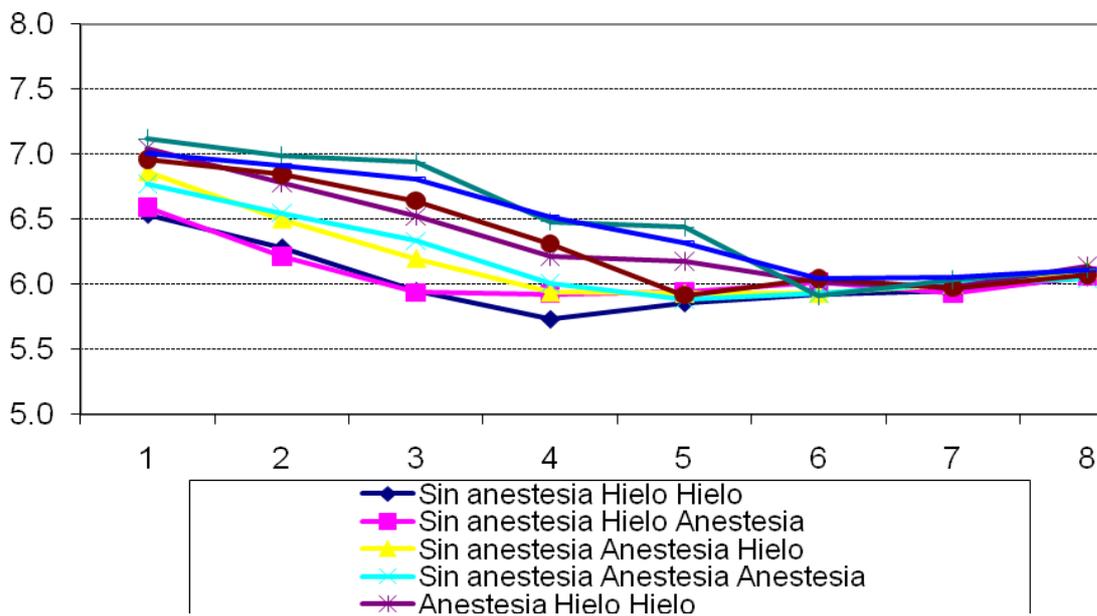


Figura 10. Evolución del pH de la carne tras el sacrificio (a 0, 2, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas postmortem) en lubina atendiendo al método de captura (con y sin anestesia), tipo de aturdimiento (agua más hielo y con anestesia) y al medio de sacrificio (agua más hielo y exceso de anestésico).

## Rigor mortis

En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos para la evolución del *rigor mortis* desde las 2 hasta las 72 horas postmortem, atendiendo en el mismo sentido a la especie (dorada y lubina), método de captura (sin utilizar anestésico o usándolo para reducir la agitación en esta parte del proceso), tipo de aturdimiento (con hielo más agua o con empleo de anestésico) y medio de sacrificio (en hielo más agua o con exceso de anestésico).

Al igual que ha sucedido con el pH, las diferencias entre tratamientos son importantes, en concreto el método de captura y el tipo de aturdimiento. Es de destacar que no se ha encontrado efecto ni de la especie ni del medio de sacrificio.

Cuando se realiza la captura con anestésico, la instauración del *rigor mortis* claramente se retrasa. Cuando el aturdimiento se realiza con anestésico progresa de igual forma, con un retraso en su instauración. Por el contrario, captura y aturdimiento en hielo promueven que el *rigor mortis* se instaure en menor tiempo, y teniendo en cuenta que este es un hecho determinante del progreso del deterioro postmortem, estos peces sufrirán con más prontitud fenómenos de autólisis y ablandamiento muscular.

Hay una interacción importante entre la captura y el aturdimiento. Así, la combinación de uso o no de anestésico para la captura con anestésico o agua más hielo respectivamente en aturdimiento, llegan a ejercer efectos similares, es decir, parece como si se desarrollara bajo un sistema de umbrales, obteniéndose el mismo resultado tanto si el anestésico se usa en uno u otro nivel (captura o aturdimiento). Por su parte, el uso de anestésico a los dos niveles mejora la instauración del *rigor mortis* ya que lo retrasa aún un poco más con respecto al caso de sólo utilizarlo en un nivel.

Si bien de forma conjunta la especie no tiene *per se* efecto, sí que se observa una elevada significación de la interacción con la captura. Se puede ver a las seis horas postmortem (quizá el punto más claro pero también a las 9, 12 y 24 horas) que los valores de dorada cuando es capturada sin anestésico son en general menores que para la lubina con el mismo tipo de captura, mientras que cuando se hace con anestésico, los menores valores son para la lubina.

En las Figuras 11 y 12 está representada gráficamente la evolución del grado de *rigor mortis* tanto para la dorada como la lubina. En ambos casos se aprecian de manera clara los diferentes efectos descritos.

Tabla 4. Índices de *rigor mortis* tras el sacrificio (a 2, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas postmortem) según especie, método de captura, tipo de aturdimiento y medio de sacrificio.

especie	DORADA								LUBINA								Significación de los factores						
	SA				CA				SA				CA										
	H		CA		H		CA		H		CA		H		CA								
sacrificio	H	CA	H	CA	H	CA	H	CA	H	CA	H	CA	H	CA	H	CA	ES	CP	AT	SC	ES*CP	ES*AT	CA*AT
rg-2	58,6	41,6	2,3	1,9	4,5	1,0	1,5	0,0	51,1	43,5	4,4	3,2	0,0	0,0	0,5	0,5	ns	***	***	ns	ns	ns	***
rg-6	60,4	70,0	36,5	40,2	41,3	23,7	20,0	4,8	86,8	76,3	38,6	33,7	8,6	13,2	1,3	2,4	ns	***	***	ns	***	ns	**
rg-9	68,4	75,5	51,9	45,8	36,3	46,3	56,8	27,8	90,7	80,2	76,2	74,6	24,6	34,6	7,2	6,2	ns	***	***	ns	***	ns	ns
rg-12	89,7	91,4	89,0	81,2	77,2	79,3	69,5	56,8	86,5	76,4	87,2	90,4	59,5	59,0	37,6	30,7	ns	***	**	ns	**	ns	**
rg-24	82,2	81,9	82,6	80,8	86,1	86,3	89,4	90,5	87,0	86,3	88,2	92,1	73,0	79,3	79,6	79,1	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns
rg-48	85,7	87,1	86,6	83,0	83,3	84,6	87,9	87,6	83,8	76,1	79,3	81,3	83,7	89,9	86,5	86,0	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
rg-72	65,2	67,9	65,7	69,9	52,0	56,9	66,1	64,8	62,0	50,3	67,2	64,5	54,9	64,0	63,0	64,4	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns

SA – sin aturdimiento  
 CA – con aturdimiento  
 H – hielo más agua  
 ES – especie  
 CP – captura  
 AT – aturdimiento  
 SC – sacrificio

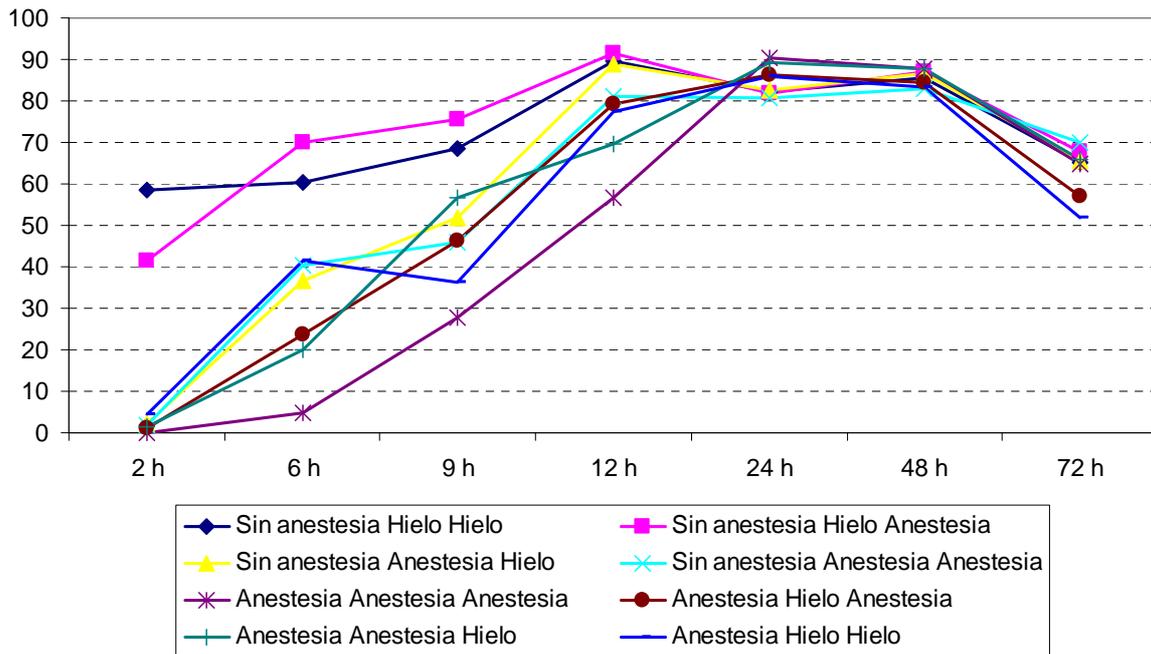


Figura 11. Evolución de la instauración del *rigor mortis* tras el sacrificio (a 2, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas postmortem) en dorada atendiendo al método de captura (con y sin anestesia), tipo de aturdimiento (agua más hielo y con anestesia) y al medio de sacrificio (agua más hielo y exceso de anestésico).

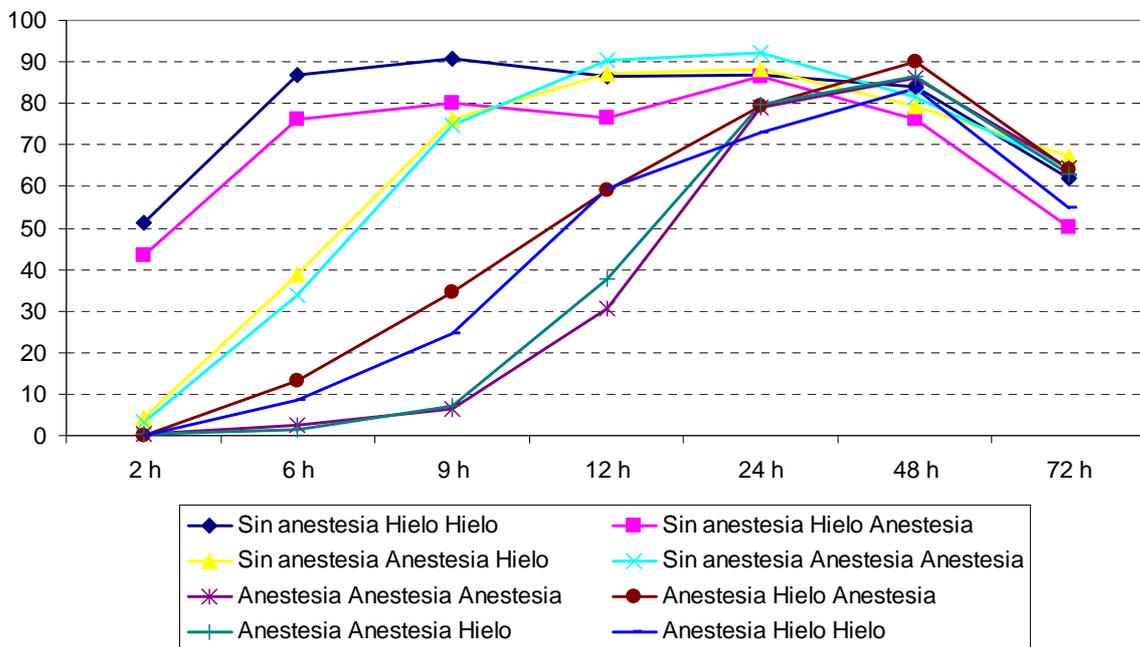


Figura 12. Evolución de la instauración del *rigor mortis* tras el sacrificio (a 2, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas postmortem) en lubina atendiendo al método de captura (con y sin anestesia), tipo de aturdimiento (agua más hielo y con anestesia) y al medio de sacrificio (agua más hielo y exceso de anestésico).

## Aspecto externo

Para valorar el aspecto externo se ha tomado una foto a cada animal y sobre la misma se han valorado como puntos de demérito la presencia de petequias (i) en la zona ventral (frecuentes para la lubina y raras en el caso de la dorada), (ii) en el opérculo (en este caso ya con presencia en ambas especies), (iii) aletas pectorales, ventrales y anal, (iv) laceraciones y/o pérdida de escamas en el flanco y (v) decoloraciones y/o pérdidas de brillo en el dorso achacadas también a la pérdida de escamas. Se ha desarrollado una escala subjetiva desde ausencia con un valor de cero, hasta máxima presencia con un valor de tres, sumándose todos los puntos de demérito por individuo, pudiendo llegar en el peor de los casos a quince.

No se han encontrado diferencias entre tratamientos. De hecho, la Figura 13, foto ampliada de la zona ventral de una lubina, se corresponde con un tratamiento en el cual la captura, aturdimiento y sacrificio se realizó con anestésico, no aportando, como tal vez pudiera desprenderse del grado de lucha ejercido por el pez, mejora en el aspecto externo.



Figura 13. Dorada con hemorragia por encima de las aletas ventrales, petequias en zona ventral entre aletas y poro anal, y pequeña laceración con pérdida de escamas a la altura del poro anal.



Figura 14. Dorada con laceración y petequias en flanco.



Figura 15. Dorada con pérdida de escamas.



Figura 16. Lubina con laceración en flanco.



Figura 17. Lubina con hemorragias en vientre y petequias en aletas ventrales.



Figura 18. Lubina con petequias generalizadas en zona ventral.

## MARCADORES MOLECULARES

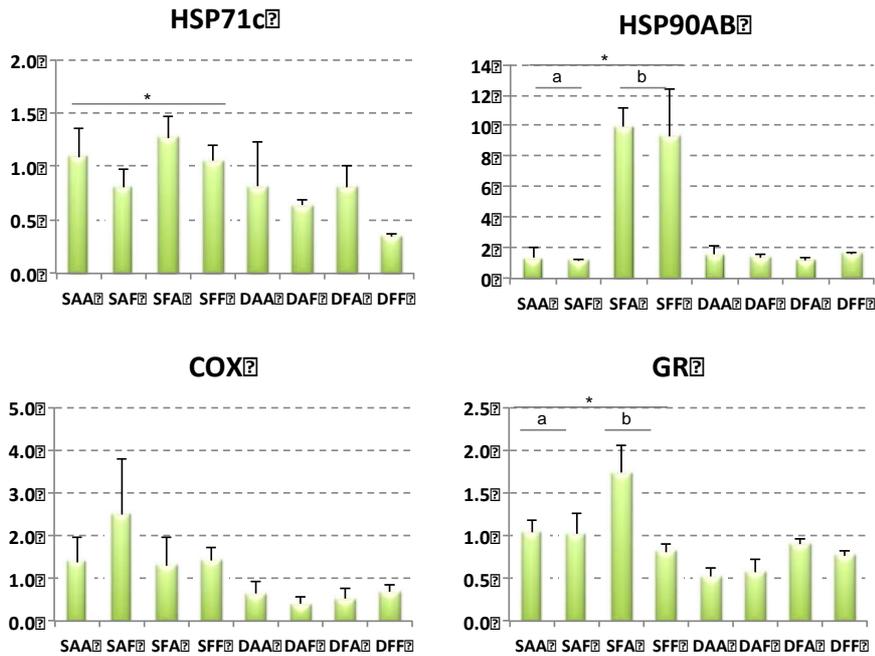
A partir de las doradas sacrificadas para cada tratamiento se tomaron muestras de tres tejidos diferentes: hígado, cerebro y riñón. La extracción de cerebro falló con lo cual sólo se pudo cuantificar la expresión génica en hígado en riñón. Además, para estos tejidos se analizaron 4 individuos. En total se analizaron 7 genes relacionados con la respuesta a estrés de las proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90AB así como para el receptor de glucocorticoides (GR), ciclooxigenasa II (COX2), la Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica (PEPCKCIT) y mitocondrial (PEPCKMIT).

Tabla5: Resultados de MANOVA en hígado

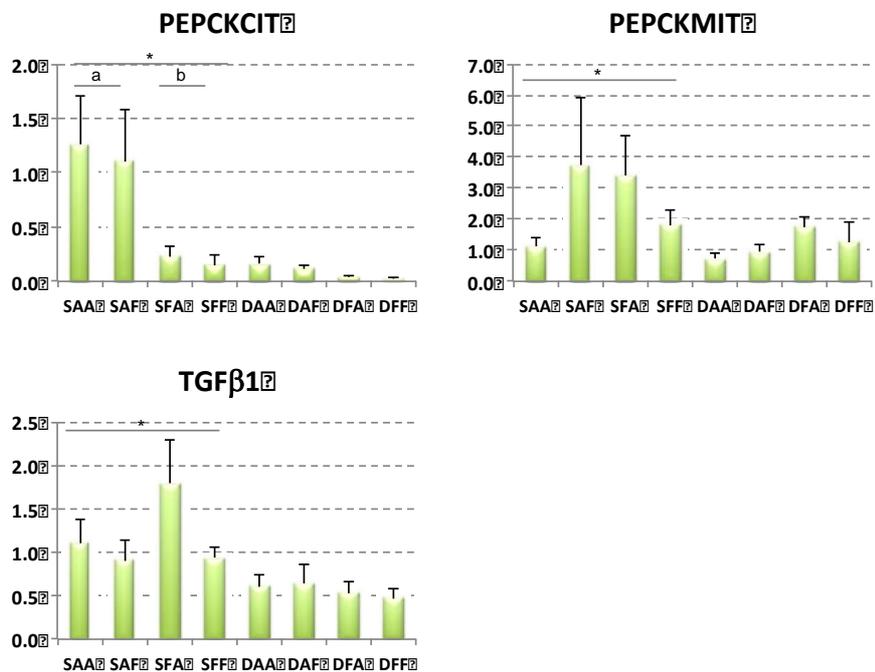
Efecto	Lambda de Wilks	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Sig.
Intersección	.039	59.606 <sup>b</sup>	7.000	17.000	.000
CAPTURA	.299	5.688 <sup>b</sup>	7.000	17.000	.002
ATURDIMIENTO	.111	19.538 <sup>b</sup>	7.000	17.000	.000
SACRIFICIO	.609	1.557 <sup>b</sup>	7.000	17.000	.215
CAPTURA * ATURDIMIENTO	.291	5.916 <sup>b</sup>	7.000	17.000	.001
CAPTURA * SACRIFICIO	.668	1.207 <sup>b</sup>	7.000	17.000	.351
ATURDIMIENTO * SACRIFICIO	.656	1.273 <sup>b</sup>	7.000	17.000	.320
CAPTURA * ATURDIMIENTO * SACRIFICIO	.662	1.241 <sup>b</sup>	7.000	17.000	.335

En hígado, el análisis de MANOVA mostró diferencias significativas para el factor captura y aturdimiento. Los datos de expresión fueron significativos para 6 de los 7 genes analizados para el efecto captura (HSP70, HSP90AB, GR, PEPCKMIT, PEPCKCIT y TGF $\beta$ 1) y para tres en el factor aturdimiento (HSP90AB, GR, PEPCKCIT). También se observó una interacción entre captura y aturdimiento. En concreto se observó que para la HSP90AB y GR, el aturdimiento con frío aumentaba la expresión (~10 y 1,7 veces, respectivamente) cuando la sedación había sido con anestesia. Estos animales presentaron cierta agitación al pasar de la anestesia al frío. Sin embargo, esta activación no se detectó en los animales capturados sin anestesia para los mismos tratamientos de aturdimiento y sacrificio incluso con un tiempo de exposición a frío similar o con un plano mayor de anestesia. Estos datos sugieren la presencia de una respuesta asociada a estrés térmico y que estaría modulada por el estrés de captura previo.

Los genes HSP71c, GR, TGF $\beta$ 1, PEPCKCIT y PEPCKMIT presentaron mayores niveles de expresión en aquellos animales que tuvieron sedación durante la captura mediante 2-fenoxietanol. Cabe destacar que los animales expuestos durante más tiempo con anestésico, tratamientos SAA y SAF presentaron niveles superiores de PEPCKCIT. El fenoxietanol además de su acción anestésica puede presentar una acción inmunosupresiva e incluso activar una respuesta a estrés en peces. Así en dorada, la aplicación de una dosis de 1.6 mM (~230 ppm) durante 1 h era capaz de activar significativamente los niveles de glucosa en sangre (Ortuño et al., 2002a). Estos datos se confirmaron posteriormente con dosis inferiores de 60 ppm (sedación) y 200 ppm (narcosis) en los que se pudo determinar que dosis altas podrían incluso potenciar el efecto de un agente estresante (Ortuño et al., 2002b). Respecto al cortisol, sólo dosis elevadas de anestésico eran capaces de aumentar significativamente los niveles plasmáticos pero no tendrían un efecto aditivo con un agente estresante (Ortuño et al., 2002b). No obstante, estas repuestas, van a depender del tiempo de exposición, dosis, especie, tamaño, estado metabólico, temperatura



**Figura 19: Niveles de expresión relativa de HSP71c, HSP90AB, COX2 y GR en hígado en los 8 grupos experimentales ensayados.** Los valores de expresión fueron normalizados a los de EEF1a. Los datos se expresan como el incremento medio (media  $\pm$  SEM, n = 4) con respecto al grupo calibrador (SAA). Las diferencias significativas debidas a la captura se indican con asterisco. Las diferencias debidas al aturdimiento se indican con letras



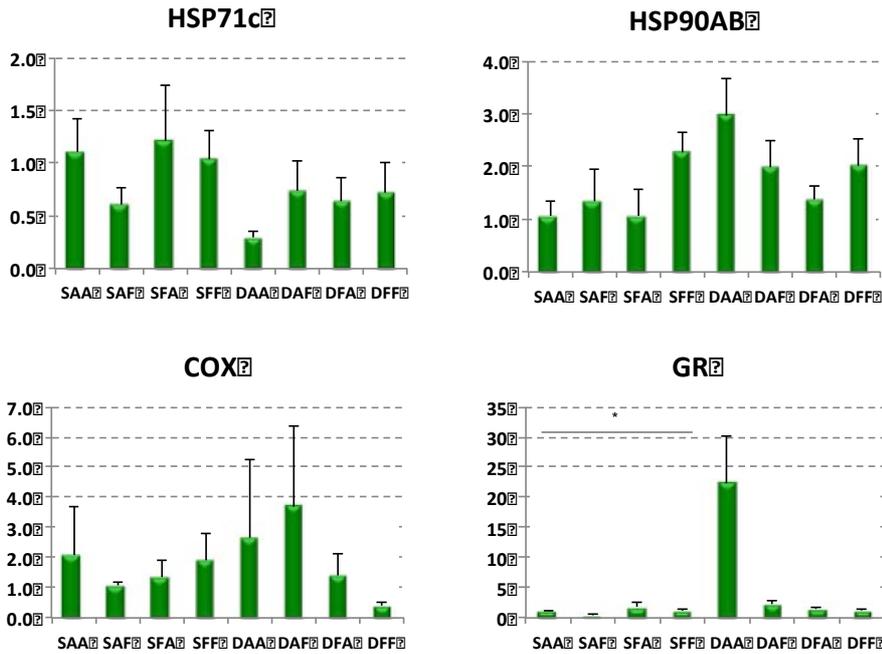
**Figura 20: Niveles de expresión relativa de PEPCKCIT, PEPCKMIT y TGFβ1 en hígado en los 8 grupos experimentales ensayados.** Los valores de expresión fueron normalizados a los de EEF1a. Los datos se expresan como el incremento medio (media  $\pm$  SEM, n = 4) con respecto al grupo calibrador (SAA). Las diferencias significativas debidas a la captura se indican con asterisco. Las diferencias debidas al aturdimiento se indican con letras.

Para confirmar las respuestas observadas en hígado, se estudiaron los efectos de estos factores sobre los patrones de expresión en riñón, un órgano importante regulador de la respuesta al estrés por poseer células cromafines sintetizadoras de catecolaminas y células productoras de corticoides.

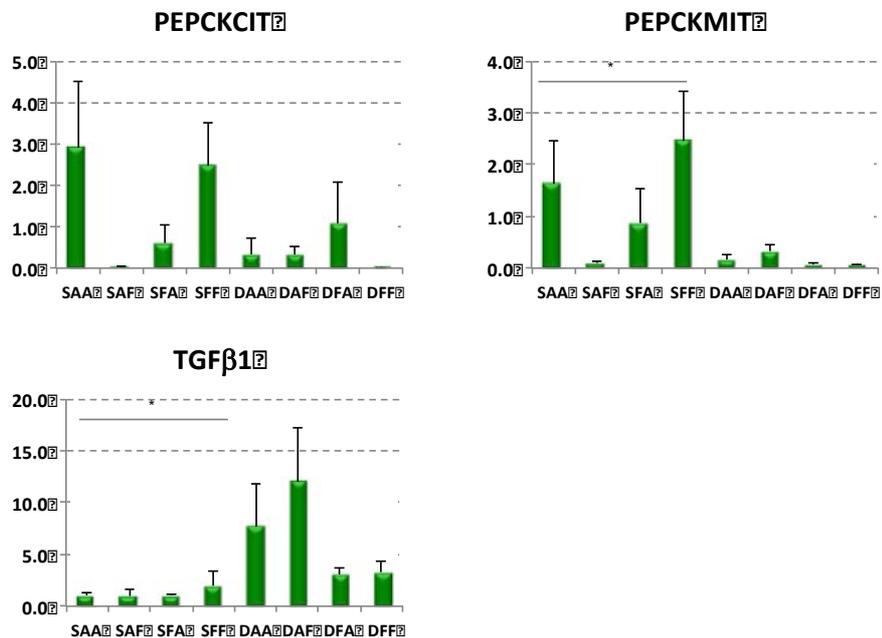
Tabla 6: Resultados de MANOVA en Riñón

Efecto	Lambda de Wilks	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Sig.
Intersección (Lambda de Wilks)	.118	14.917 <sup>b</sup>	7.000	14.000	.000
CAPTURA	.243	6.222 <sup>b</sup>	7.000	14.000	.002
ATURDIMIENTO	.695	.880 <sup>b</sup>	7.000	14.000	.546
MUERTE	.586	1.415 <sup>b</sup>	7.000	14.000	.274
CAPTURA * ATURDIMIENTO	.416	2.810 <sup>b</sup>	7.000	14.000	.047
CAPTURA * MUERTE	.816	.452 <sup>b</sup>	7.000	14.000	.853
ATURDIMIENTO * MUERTE	.655	1.052 <sup>b</sup>	7.000	14.000	.440
CAPTURA * ATURDIMIENTO * MUERTE	.502	1.981 <sup>b</sup>	7.000	14.000	.131

El análisis estadístico confirmó la importancia del efecto captura y su interacción con el procedimiento de aturdimiento. En este caso, sólo tres genes mostraron diferencias significativas: GR, PEPCKMIT y TGF $\beta$ 1). Tal como se observó en hígado, los niveles de expresión del PEPCK (en este caso la mitocondrial) estaban aumentados en los animales capturados utilizando anestesia, lo que indica que el anestésico podría estar induciendo un estrés y la producción de glucosa. Sin embargo, la activación de GR y TGF $\beta$ 1 en los animales de captura directa y especialmente con la condición DAA nos indican un estrés agudo mediado por cortisol.



**Figura 21: Niveles de expresión relativa de HSP71c, HSP90AB, COX2 y GR en riñón en los 8 grupos experimentales ensayados.** Los valores de expresión fueron normalizados a los de EEF1a. Los datos se expresan como el incremento medio (media  $\pm$  SEM, n = 4) con respecto al grupo calibrador (SAA). Las diferencias significativas debidas a la captura se indican con asterisco.



**Figura 22: Niveles de expresión relativa de PEPCKCIT, PEPCKMIT, y TGFβ1 en riñón en los 8 grupos experimentales ensayados.** Los valores de expresión fueron normalizados a los de EEF1a. Los datos se expresan como el incremento medio (media  $\pm$  SEM, n = 4) con respecto al grupo calibrador (SAA). Las diferencias significativas debidas a la captura se indican con asterisco.

Además de este experimento se decidió verificar que efectivamente los peces estaban muertos y no se recuperaban.

Para eso se colocaron peces directamente en hielo y en sobredosis de fenoxietanol (550 ppm) y se devolvieron a los tanques con agua de mar limpia y aireación a diferentes tiempos (10 min a 80 min) después de haber

establecido que estaban muertos debido a ausencia de respiración y falta de reflejos tanto a estímulos luminosos como físicos.

Los resultados se presentan en la tabla 7:

DORADA			LUBINA		
Tratamiento	Tiempo (min)	No de muertos (%)	Tratamiento	Tiempo (min)	No de muertos (%)
Hielo	19	0	Hielo	10	0
Hielo	32	0	Hielo	15	0
Hielo	40	0	Hielo	26	100
Hielo	57	0			
Hielo	72	100			
Anestésico	13	0	Anestésico	10	0
Anestésico	27	0	Anestésico	23	100
Anestésico	40	0			
Anestésico	52	0			
Anestésico	64	50			
Anestésico	74	50			
Anestésico	80	100			

## MARCADORES BIOQUÍMICOS

A partir de las doradas sacrificadas para cada tratamiento se tomaron muestras de sangre de cual se extrajo el plasma para los análisis de los siguientes parámetros: glucosa, lactato, cortisol, proteína, albumina, potasio, cloro, magnesio, sodio y potasio. En la tabla 8 se presentan los valores medios por parámetro y por tratamiento probado.

Tratam	glucosa	lactato	cortisol	proteína	Albumina	K	Cl	Mg	Na	P
SAA	83.7	3.1	63.0	2.4	1.8	7.7	184.6	2.1	127.1	6.3
SHA	46.6	3.2	9.44	2.6	1.9	Nd	208.7	2.4	148.4	9.8
SAH	61.0	3.4	96.4	2.5	1.9	9.1	275.2	2.4	139.7	11.9
SHH	69.0	3.5	47.6	1.9	1.9	12.1	293.5	2.4	153.3	8.1
CAA	81.0	3.2	130.0	1.7	2.1	9.6	179.7	2.2	111.3	5.9
CHA	62.3	3.6	185.8	2.2	2.1	10.0	188.3	2.4	77.4	7.4
CAH	59.2	2.8	300.4	2.5	1.9	7.9	262.5	2.4	90.2	7.0
CHH	53.2	3.5	139.4	2.8	1.8	12.1	333.0	2.1	150.7	9.7

Tabla 8: Promedio de los parámetros plasmáticos medidos en dorada para los diferentes tratamientos en el experimento 1.

Los valores medios por parámetro y tratamiento fueron comparados con un análisis de ANOVA y se detectaron las siguientes diferencias:

**LACTATO:** Tratamiento Captura, anestésico y hielo (CAH) es diferente de todos los otros. Además los tratamientos Captura, Anestésico, hielo o anestésico (CAH y CAA) y los tratamientos sedación, hielo o anestésico, anestésico (SAA y SHA) son diferentes de los otros cuatro tratamientos.

**CORTISOL**- El tratamiento sedación anestésico, anestésico (SAA) es diferente de sedación, hielo, anestésico (SHA). Sedación, anestésico, anestésico (SAA) ≠ Sedación, hielo, anestésico (SHA). Sedación, hielo, anestésico (SHA) ≠ Captura, anestésico o hielo, hielo (CAH, CHH) y de Sedación anestésico hielo (SAH).

Finalmente el tratamiento Sedación hielo hielo (SHH) ≠ Captura anestésico hielo (CAH)

**PROTEINA**: Tratamiento Sedación hielo anestésico (SHA) ≠ Sedación hielo hielo (SHH) y Captura anestésico anestésico (CAA); Captura anestésico anestésico (CAA) ≠ Sedación anestésico anestésico (SAA), Sedación anestésico hielo (SAH), Captura anestésico, hielo (CAH) y Captura hielo hielo (CHH); Sedación hielo hielo (SHH) ≠ Captura hielo hielo (CHH).

**CLORO**- Captura hielo hielo (CHH) ≠ Captura o Sedación anestésico anestésico (CAA y SAA)

**SODIO**- Sedación anestésico anestésico (SAA) ≠ Sedación hielo hielo (SHH) y Captura hielo anestésico (CHA); Sedación hielo hielo (SHH) y Sedación hielo anestésico (SHA) ≠ Captura hielo anestésico (CHA) y Captura anestésico hielo (CAH); Captura hielo anestésico (CHA) ≠ Captura hielo hielo (CHH)

**FOSFORO**: Captura hielo hielo (CHH) ≠ Captura anestésico anestésico o hielo (CAA y CAH) y Captura hielo anestésico (CHA).

Los resultados de estos análisis no indican que ninguno de los tratamientos sea mejor que otro y en casos que un tratamiento indica un valor especialmente bajo para un parámetro (SHA en cortisol) eso no se repite con los otros parámetros asociados al estrés (glucosa y lactato).

#### **Actividad 2.4.1.3.: Optimización del sacrificio en agua fría**

##### *Experimento 2.4.1.3.2 Evaluación de distintas proporciones de agua /hielo y densidad (dorada y lubina)*

Los datos correspondientes a los tres experimentos llevados a cabo en esta tarea se presentan conjuntamente porque se decidió que los parámetros de comportamiento no eran por si solos suficientes para llevar a una toma de decisión sobre el siguiente paso por lo que los tratamientos se hicieron cruzados:

En todos los tratamientos se pudieron percibir movimientos en el hielo hasta 25-30 minutos después de haber colocado los peces en las cubas de sacrificio por lo que se considera que en todos ellos los peces estaban conscientes durante todo este periodo, lo que es inaceptable de acuerdo a la legislación europea. No se vio en ninguno de los tratamientos ninguna mejoría aparente debida al tratamiento.

Tabla 9: Tiempos de muerte en doradas sometidas a 15 min de confinamiento y sacrificadas en dos proporciones de agua fría y densidades

Tratamiento	Tiempo	Temp (°C)	mg/l O <sub>2</sub>	Observ.
<b>Condición 1</b> Confinamiento 15' Temperatura 1-2°C Densidad 50%	10'	1.2	8.34	
	30'	1.1	7.56	
	45'	1.1	7.30	
<b>Condición 2</b> Confinamiento 15' Temperatura 1-2°C Densidad 12,5%	0'		6.32	
	4'	0.1	7.08	
	6'	-0.7	13.00	
	10'	-0.8	12.16	
	20'	1.0	10.80	T <sup>a</sup> anal 2,6°C
	28'	2.6	8.81	T <sup>a</sup> anal 2,3°C
	35'	1.7	11.88	
40'	1.4	12.52	T <sup>a</sup> anal 1,4°C	
<b>Condición 3</b> Confinamiento 15' Temperatura 4-5°C Densidad 50%	0'			
	5'	5.0	3.00	
	10'	5.8	3.10	
	15'	4.9	2.90	
	20'	5.4	2.60	
	25'	5.1	2.40	
	30'	5.0	2.30	
	35'	5.3	2.10	
	40'	4.8	2.30	T <sup>a</sup> anal 5,7°C
45'	4.9	2.20	T <sup>a</sup> anal 5,3°C	
<b>Condición 4</b> Confinamiento 15' Temperatura 4-5°C Densidad 12,5%	0'	0.3	5.80	
	4'	0.6		
	5'	5.5	4.80	
	7'	4.3		
	8'	2.7		
	8'	3.9	4.80	
	10'	5.3	4.95	
	15'	4.4	4.90	
	20'	5.3	4.70	
	25'	5.6	4.50	
	26'	4.9		T <sup>o</sup> anal 5,8°C
	30'	4.6	4.77	
	35'	4.7	4.50	T <sup>a</sup> anal 4,9°C

Tabla 10: Tiempos de muerte en doradas sometidas a 60 min de confinamiento y sacrificadas en dos proporciones de agua fría y densidades

Tratamiento	Tiempo	Temp (°C)	mg/l O <sub>2</sub>	Observ.
<b>Condición 5</b> Confinamiento 60' Temperatura 1-2°C Densidad 50%	0'	1.9	6.84	
	6'	1.0	6.64	
	11'	1.1	6.53	
	16'	1.5	6.84	
	21'	1.7	6.37	
	31'	2.1	6.50	T <sup>a</sup> anal 2,0°C
	36'	1.5	5.94	T <sup>a</sup> anal 1,6°C
	41'	2.0	5.65	
	46'	1.3	6.23	
	56'	1.3		T <sup>a</sup> anal 1,3°C
<b>Condición 6</b> Confinamiento 60' Temperatura 1-2°C Densidad 12,5%	0'	0.4	7.25	
	7'	0.3	6.93	
	12'	0.9	7.07	
	17'	1.3	7.04	
	22'	1.7	6.16	
	27'	1.4	6.84	T <sup>a</sup> anal 2,3°C
	32'	1.9	6.59	
	37'	2.3	6.27	
	42'	1.9	6.50	
	47'			T <sup>a</sup> anal 1,9°C
<b>Condición 7</b> Confinamiento 60' Temperatura 4-5°C Densidad 50%	5'	5.1	2.70	
	10'	4.8	2.50	
	15'	5.5	2.40	
	20'	4.7	2.00	
	25'	4.9	1.90	
	30'	4.2	1.80	
	35'	4.4	1.80	T <sup>a</sup> anal 5,4°C
	40'	4.5	1.70	
	45'	4.7	1.70	
<b>Condición 8</b> Confinamiento 60' Temperatura 4-5°C Densidad 12,5%	0'	2.3		
	2'	5.2	4.70	
	5'	5.5	4.70	
	10'	5.9	4.10	
	15'	3.9	4.30	
	20'	4.6	4.30	
	25'	5.0	4.10	
	30'	4.1	4.20	
	35'	4.1	3.90	
	40'	4.6	3.90	T <sup>a</sup> anal 4,7°C
	44'	4.7	3.80	

Tabla 11: Tiempos de muerte en lubinas sometidas a 15 min de confinamiento y sacrificadas a dos densidades con agua en el rango 1-2°C

Tratamiento	Tiempo	Temp (°C)	mg/l O <sub>2</sub>	Observ.
<b>Condición 1</b> Confinamiento 15' Temperatura 1-2°C Densidad 50%	0'	2.7	9.30	
	6'	1.8	7.89	
	11'	1.6	7.27	
	16'	2.3	6.89	
	21'	1.7	6.70	
	26'	1.9	5.60	
	31'			
	36'	1.5	5.40	
	41'	1.1	5.65	
	46'	1.6	4.43	
	56'	1.6	5.22	T <sup>a</sup> anal 1,7 - 1,9 °C
<b>Condición 2</b> Confinamiento 15' Temperatura 1-2°C Densidad 12,5%	0'	0.3	5.10	
	6'	1.0	5.21	
	11'	1.7	5.03	
	16'	2.0	5.09	
	21'	2.0	5.09	
	26'	1.8	4.90	
	31'			
	36'	1.7	4.80	
	41'	1.5	4.67	
	46'	1.6	4.60	
	56'	1.3	4.83	T <sup>a</sup> anal 1,9 -+ 2,0 °C

Tabla 12: Tiempos de muerte en lubinas sometidas a 60 min de confinamiento y sacrificadas en dos proporciones de agua fría y densidades

Tratamiento	Tiempo	Temp (°C)	mg/l O <sub>2</sub>	Observ.
<b>Condición 5</b> Confinamiento 60' Temperatura 1-2°C Densidad 50%	0'	1.3	8.77	
	7'	1.8	8.35	
	12'	1.6	7.80	
	17'	1.9	8.05	
	22'	1.9	8.33	
	27'	1.9	8.17	
	32'	1.9	7.66	
	37'	1.3	7.51	T <sup>a</sup> anal 2,1 °C
	42'	1.6	7.33	T <sup>a</sup> anal 2,7 °C
47'	1.6	6.37	T <sup>a</sup> anal 0,5 - 1,0 °C	
<b>Condición 6</b> Confinamiento 60' Temperatura 1-2°C Densidad 12,5%	0'	1.7	8.13	
	7'	0.8	7.22	
	12'	1.0	7.17	
	17'	1.5	6.75	
	22'	1.8	7.15	
	27'	1.5	7.14	
	32'	1.8	6.75	
37'	2.0	6.78	T <sup>a</sup> anal 1,6 °C	
<b>Condición 8</b> Confinamiento 60' Temperatura 4-5°C Densidad 12,5%	0'	4.7	4.50	
	5'	5.3	4.30	+H 0,5L
	10'	3.7	4.06	
	15'	3.9	3.90	Movimientos
	20'	4.3	3.80	
	25'	4.8	3.60	
	30'	5.2	3.60	+H 0,5L
	35'	3.6	3.60	Movimientos
	40'	3.6	3.50	
	45'	3.9	3.40	Movimientos
	50'	4.3	3.45	
	55'	4.6	3.26	
	60'	5.1	3.34	T <sup>a</sup> anal 4,4 - 4,6 °C

## ANÁLISIS DE LA CALIDAD DE LA CARNE

### Actividad 2.4.1.3. Optimización del sacrificio en agua fría

#### pH

Siguiendo igualmente un modelo lineal general la Tabla 13 presenta los resultados obtenidos para el pH atendiendo a la especie, tiempo de confinamiento, temperatura del agua de aturdimiento/sacrificio y densidad de los peces en kg por unidad de volumen de agua más hielo, así como las interacciones entre la especie y los otros factores.

Llama la atención que, a diferencia del experimento anterior, las diferencias achacables a la especie no son significativas hasta las 9 horas postmortem. A partir de este momento, los valores más altos han sido para la lubina. Esta situación es reiterada y hace pensar en un mayor gasto metabólico acompañado de menores reservas corporales que hace que el valor de este parámetro no pueda llegar a niveles tan bajos en la lubina como en la dorada. En cualquier caso, y para ambas especies, los valores en los momentos iniciales fueron en general más bajos y en los momentos finales más altos si los comparamos con el otro experimento. En definitiva, el confinamiento, como era de esperar, supone un gasto de reservas corporales que hace que el pH de la carne inmediatamente tras el sacrificio ya haya descendido algo sobre el valor ligeramente superior a 7 en el animal vivo, y que no pueda alcanzar idéntico grado de descenso a las 72 horas postmortem.

Si nos centramos en el efecto del tiempo de confinamiento, prácticamente en todos los puntos de muestreo este factor ejerce un efecto significativo, llegando a niveles más bajos de pH aquellos peces sometidos a un menor tiempo de confinamiento. Parece lógico pensar que estos individuos no han llegado a los mismos niveles de agotamiento de reservas y por ello la evolución del pH de su carne puede progresar con descensos más importantes. Curiosamente esto no sucede en el punto de 72 horas postmortem para la lubina, lo cual viene reflejado por la interacción en este momento de muestreo entre la especie y el confinamiento. Llegado a este punto de la conservación en hielo, el pH de la lubina, a diferencia de la dorada, comienza ligeramente a subir y lo hace sin que se aprecien diferencias significativas entre los tratamientos (Figuras 23 y 24).

Apenas hay efectos de los otros factores como tampoco de las interacciones presentadas, únicamente en el cambio que se acaba de explicar ya que la lubina no llega a diferenciarse tanto entre puntos de muestreo. Hay una interacción no presentada que se manifiesta de modo más o menos general entre el confinamiento y la temperatura, y así, a pesar de que la temperatura no presenta efecto por sí sola, cuando se analiza dentro de los confinamientos de menor duración, ejerce un efecto positivo sobre el descenso del pH el hecho de sacrificar los peces en aguas algo más frías.

Tabla 13. Valores de pH tras el sacrificio (a 0, 2, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas postmortem) según especie, tiempo de confinamiento previo a la captura (15 o 60 minutos) temperatura del medio de aturdimiento (2 o 4°C) y densidad de peces en el medio de sacrificio (1:1 o 1:4, p/v).

especie	DORADA								LUBINA								Significación de los factores						
	15'				60'				15'				60'										
	2°C		4°C		2°C		4°C		2°C		4°C		2°C		4°C								
densidad	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	ES	CO	TE	DE	ES*CO	ES*TE	ES*DE
pH-0	6,64	6,74	6,64	6,59	6,63	6,79	6,56	6,62	6,93	6,58	6,54	6,58	6,72	6,62	6,74	6,64	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*
pH-2	6,64	6,69	6,56	6,65	6,78	6,72	6,46	6,82	6,55	6,44	6,53	6,65	6,66	6,74	6,71	6,63	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
pH-6	6,29	6,57	6,68	6,41	6,85	6,98	6,48	6,73	6,55	6,47	6,33	6,78	6,72	6,79	6,87	6,72	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns
pH-9	6,37	6,45	6,50	6,41	6,72	6,76	6,51	6,50	6,66	6,52	6,50	6,59	6,59	6,53	6,64	6,49	*	**	ns	ns	ns	ns	*
pH-12	6,10	6,37	6,35	6,37	6,37	6,31	6,36	6,38	6,53	6,49	6,47	6,51	6,53	6,51	6,54	6,48	***	*	ns	ns	ns	*	*
pH-24	6,14	6,17	6,17	6,23	6,10	6,22	6,24	6,21	6,26	6,31	6,13	6,36	6,38	6,287	6,33	6,27	***	*	ns	ns	ns	ns	ns
pH-48	6,11	5,98	6,13	6,15	6,02	6,16	6,16	6,05	6,32	6,29	6,18	6,34	6,29	6,25	6,39	6,30	***	ns	*	ns	ns	ns	ns
pH-72	6,01	6,07	6,19	6,09	6,14	6,20	6,17	6,20	6,35	6,42	6,33	6,43	6,37	6,38	6,41	6,28	***	**	ns	ns	***	*	ns

ES – especie  
 CO – confinamiento  
 TE – temperatura  
 DE – densidad

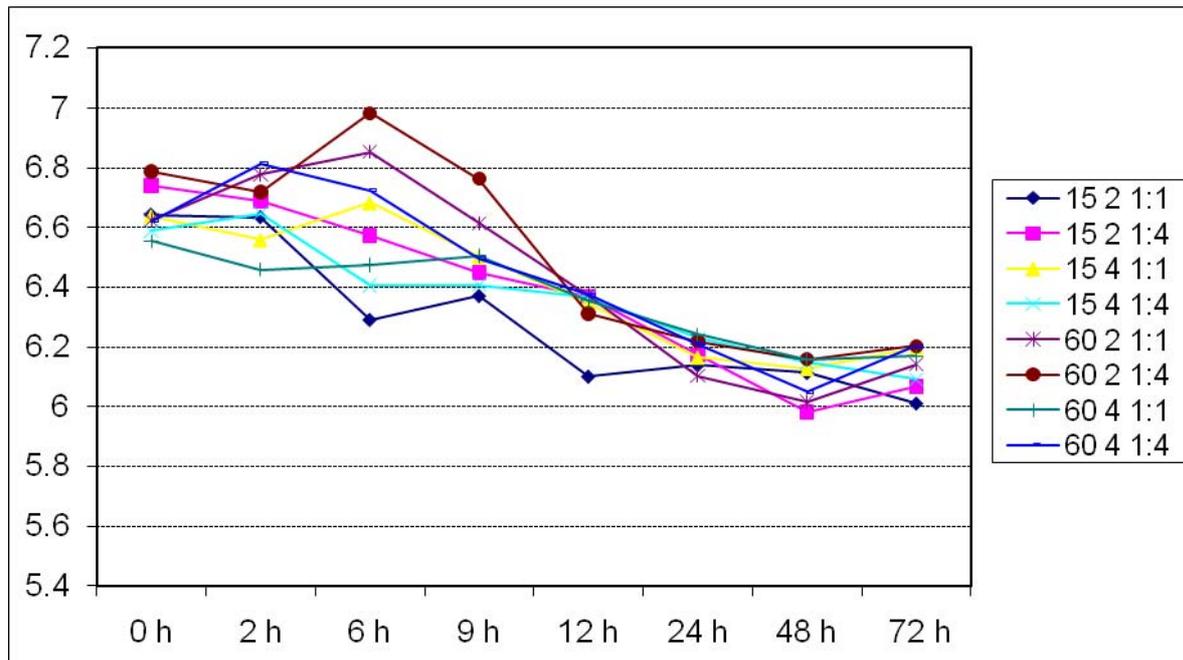


Figura 23. Evolución del pH de la carne tras el sacrificio (a 0, 2, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas postmortem) en dorada atendiendo al tiempo de confinamiento previo a la captura (15 o 60 minutos) temperatura del medio de aturdimiento (2 o 4°C) y densidad de peces en el medio de sacrificio (1:1 o 1:4, p/v).

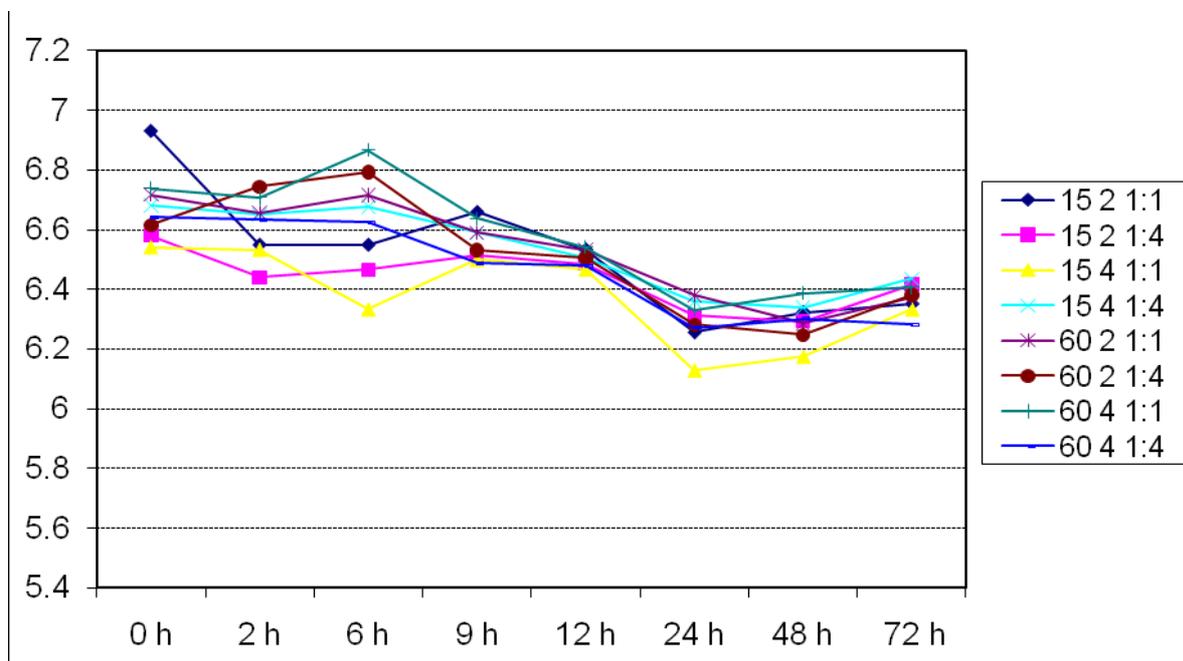


Figura 24. Evolución del pH de la carne tras el sacrificio (a 0, 2, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas postmortem) en lubina atendiendo al tiempo de confinamiento previo a la captura (15 o 60 minutos) temperatura del medio de aturdimiento (2 o 4°C) y densidad de peces en el medio de sacrificio (1:1 o 1:4, p/v).

### Rigor mortis

El comportamiento del rigor mortis motivado por los factores considerados en este experimento, amén de la especie, sigue una dinámica no sólo notablemente diferente, sino curiosa en cuanto a los momentos en que cada factor impone su trascendencia (Tabla 14). Aquí la especie ejerce una notable influencia, algo que no se apreció en el anterior experimento, pero sólo a partir de la resolución del rigor mortis, que para la lubina conlleva un progreso más rápido de relajación muscular.

Por su parte, los puntos de muestreo donde no hay diferencias entre especies, hasta las 12 horas postmortem, presentan valores notablemente más elevados que los observados en el otro experimento. Sin duda esto está condicionado por el confinamiento, que ejerce también una importante influencia sobre este parámetro. Pero también siguiendo una evolución peculiar, ya que es entre y después del rigor mortis cuando tiene un efecto significativo (Figuras 25 y 26). Antes del rigor el índice es más bajo con el mayor confinamiento pero después del rigor los valores más bajos son para los confinamientos más cortos.

El efecto de la temperatura del medio de aturdimiento/sacrificio no es muy trascendente. Únicamente en dos puntos de muestreo, y además, aunque no se ha presentado el resultado, interaccionando con el confinamiento.

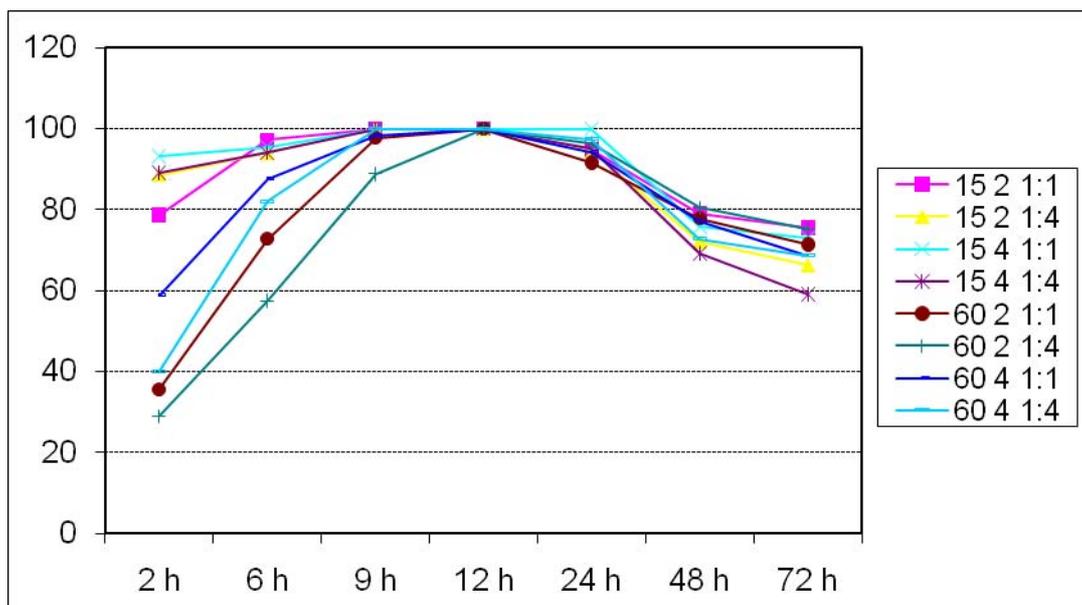


Figura 25. Evolución de la instauración del *rigor mortis* tras el sacrificio (a 2, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas postmortem) en dorada atendiendo al tiempo de confinamiento previo a la captura (15 o 60 minutos) temperatura del medio de aturdimiento (2 o 4°C) y densidad de peces en el medio de sacrificio (1:1 o 1:4, p/v).

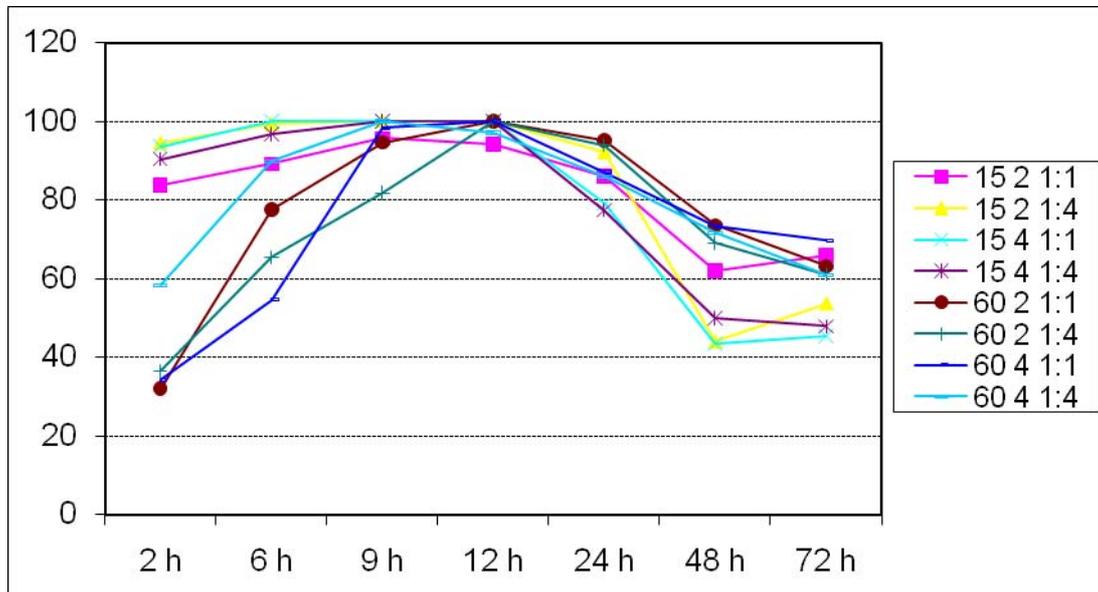


Figura 26. Evolución de la instauración del *rigor mortis* tras el sacrificio (a 2, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas postmortem) en lubina atendiendo al tiempo de confinamiento previo a la captura (15 o 60 minutos) temperatura del medio de aturdimiento (2 o 4°C) y densidad de peces en el medio de sacrificio (1:1 o 1:4, p/v).

Tabla 14. Índices de *rigor mortis* tras el sacrificio (a 2, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas postmortem) según especie, tiempo de confinamiento previo a la captura (15 o 60 minutos) temperatura del medio de aturdimiento (2 o 4°C) y densidad de peces en el medio de sacrificio (1:1 o 1:4, p/v).

especie	DORADA								LUBINA								Significación de los factores						
	15'				60'				15'				60'										
	2°C		4°C		2°C		4°C		2°C		4°C		2°C		4°C								
densidad	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	ES	CO	TE	DE	ES*CO	ES*TE	ES*DE
rg-2	78,7	88,7	93,2	89,1	35,6	29,0	58,8	40,0	83,7	94,5	96,3	90,3	32,0	36,5	34,3	58,2	ns	***	*	ns	ns	ns	ns
rg-6	97,2	94,0	95,5	94,1	72,8	57,5	87,6	82,1	89,1	99,3	100	96,8	77,6	65,4	54,5	89,9	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns
rg-9	100	100	100	100	97,8	88,8	98,3	100	95,7	100	100	100	94,6	81,8	98,3	100	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rg-12	100	100	100	100	100	100	100	100	94,1	100	100	100	100	100	100	97,1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rg-24	94,9	94,4	100	95,2	91,6	96,4	94,3	97,4	86,0	96,0	79,0	77,3	95,1	93,9	88,0	86,0	***	ns	*	ns	*	**	ns
rg-48	79,2	72,1	75,8	69,3	77,8	80,5	77,1	72,8	61,9	44,0	43,5	50,0	73,6	69,0	73,3	71,7	***	***	ns	ns	**	ns	ns
rg-72	75,6	66,2	73,1	59,1	71,4	75,2	68,6	68,7	65,9	53,6	45,3	47,9	63,2	61,1	69,6	60,1	***	**	ns	ns	ns	ns	ns

ES – especie  
 CO – confinamiento  
 TE – temperatura  
 DE – densidad

## Aspecto externo

Siguiendo el protocolo detallado en el experimento anterior, se han podido diferenciar efectos achacables a los protocolos desarrollados, aunque con implicaciones que varían entre especies. El caso más claro se presenta en la lubina. Para esta especie, aquellos animales que fueron confinados durante 60 minutos previos a su aturdimiento, mostraron una importante presencia de Petequias principalmente a nivel de la aleta caudal (Figura 27), aunque también se pueden apreciar en aletas pectorales y ventrales así como flanco lateral. Aquellos peces con menor tiempo de confinamiento, 15 minutos, tienen también cierto grado de exanguinación en las localizaciones mencionadas, pero son de menor intensidad, menor extensión (Figura 28) y en menor número de individuos. Tanto el efecto de la temperatura como el de la densidad en los confinamientos más largos no se puede valorar, probablemente porque ya está enmascarado por el propio efecto de dicho confinamiento, pero en los confinamientos cortos, el grupo de mayor temperatura y mayor densidad se podría considerar a un nivel cercano al de los confinamientos largos.



Figura 27. Lubina con numerosas Petequias a nivel de aletas y flanco sometida a 60 minutos de confinamiento previo aturdimiento.



Figura 28. Lubina con ligeras Petequias a nivel de aletas sometida a 15 minutos de confinamiento previo aturdimiento.

En referencia a la dorada, las valoraciones efectuadas no permiten diferenciar efectos relativos a los tratamientos testados. Para esta especie el signo más evidente de demérito en el aspecto es la pérdida de escamas, en mayor grado que en la lubina, pero las Petequias y/o lesiones a nivel de aletas o zonas ventrales más claras no son constantes. Si que se puede establecer una diferenciación con respecto al experimento anterior, siendo el confinamiento responsable de esa pérdida de escamas (Figura 29).



Figura 29. Dorada con pérdida de escamas sometida a confinamiento de 60 minutos previo aturdimiento.

## MARCADORES MOLECULARES

Efecto	Lambda de Wilks	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Sig.
Intersección	.040	140.036 <sup>b</sup>	6.000	35.000	.000
Tiempo confinamiento	.253	17.181 <sup>b</sup>	6.000	35.000	.000
Método sacrificio <sup>a</sup>	.580	4.218 <sup>b</sup>	6.000	35.000	.003
Densidad	.247	17.760 <sup>b</sup>	6.000	35.000	.000
Tiempo confinamiento * Método sacrificio	.274	15.476 <sup>b</sup>	6.000	35.000	.000
Tiempo confinamiento * Densidad	.587	4.104 <sup>b</sup>	6.000	35.000	.003
Método sacrificio * Densidad	.470	6.581 <sup>b</sup>	6.000	35.000	.000
Tiempo confinamiento * Método sacrificio * Densidad	.263	16.385 <sup>b</sup>	6.000	35.000	.000

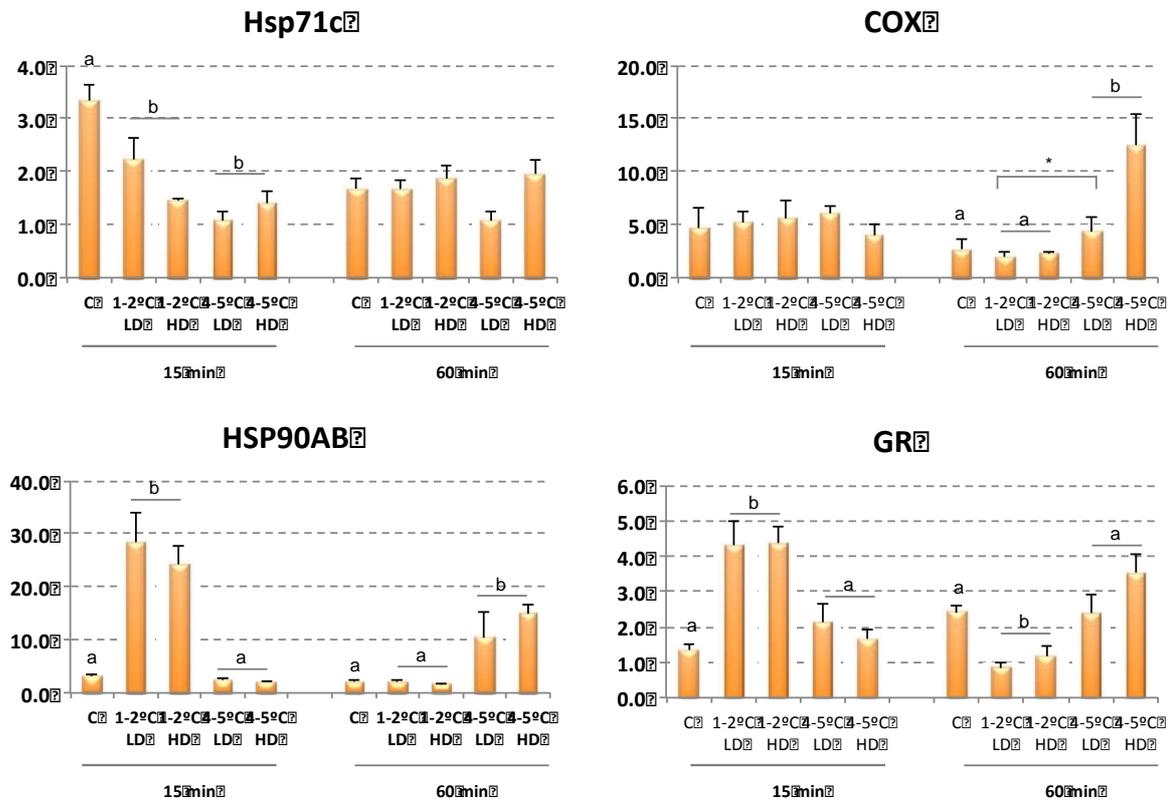
Tabla 15: <sup>a</sup> El método de sacrificio incluye contusión y agua/hielo a 1-2°C y 4-5°C. Resultados de Manova.

Los genes estudiados HSP71c, HSP90AB, GR y COX mostraron diferencias entre los tiempos de muestreo para las condiciones evaluadas. En el caso de HSP71c los niveles de expresión fueron superiores a 15 min. Por el contrario, los genes HSP90AB, GR y COX presentaron niveles superiores a 60 min. Para facilitar el análisis de datos e interpretación y dada las interacciones de factores, se decidió analizar los efectos debidos al método sacrificio y densidad para cada tiempo por separado.

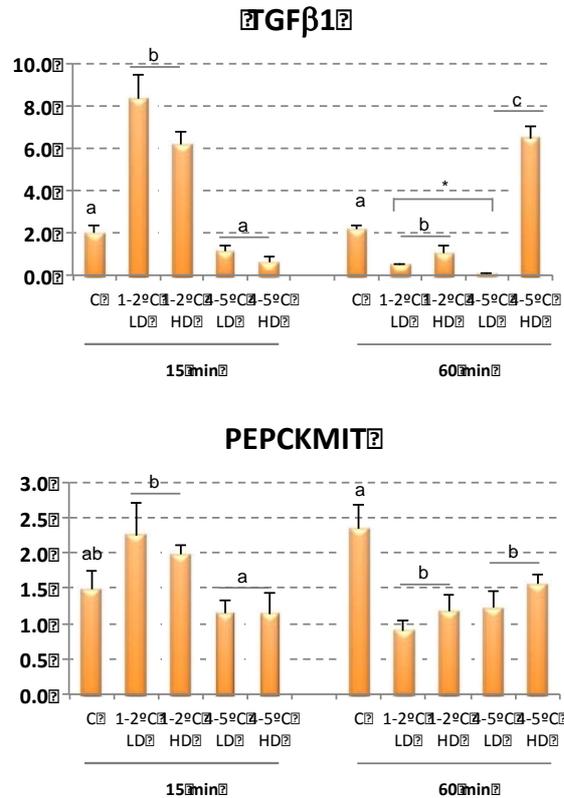
HSP71c sólo mostró diferencias en el método sacrificio a los 15 min y COX sólo a los 60 min. El resto de genes modificaron sus niveles de expresión significativamente a ambos tiempos.

A 15 min, los genes HSP90AB, GR, TGF $\beta$ 1 y PEPCKMIT activaron su expresión cuando el sacrificio era con agua/fría 1-2°C. Por el contrario, a los 60 min de confinamiento, la activación de HSP90AB, GR, TGF $\beta$ 1 ocurría a con el sacrificio con agua/fría 4-5°C (respecto a 1-2°C) sugiriendo que el estrés de confinamiento estaba modulando la respuesta a la temperatura de la mezcla agua hielo.

Para el factor densidad, sólo se encontraron diferencias significativas a los 60 min para COX y TGF $\beta$ 1 mostrando niveles superiores de expresión a alta densidad



**Figura 30: Niveles de expresión relativa de HSP71c, HSP90AB, COX y GR en hígado en doradas confinadas 15 y 60 min, y sacrificadas a dos temperaturas (1-2°C y 4-5°C) y dos densidades (HD y LD) . Los controles (C.) hacen referencia a sacrificio por contusión. Los valores de expresión fueron normalizados a los de EEF1a. Los datos se expresan como el incremento medio (media  $\pm$  SEM, n = 5) con respecto al grupo calibrador (confinamiento 0h sacrificio contusión). El análisis estadístico se realizó para cada tiempo de confinamiento por separado. Las diferencias significativas debidas al método de sacrificio se indican en letras. Las diferencias debidas a la densidad se indican con un \*.**



**Figura 31: Niveles de expresión relativa de PEPCKMIT y TGFβ1 en hígado en doradas confinadas 15 y 60 min, y sacrificadas a dos temperaturas (1-2°C y 4-5°C) y dos densidades (HD y LD) . Los controles (C.) hacen referencia a sacrificio por contusión. Los valores de expresión fueron normalizados a los de EEF1a. Los datos se expresan como el incremento medio (media ± SEM, n = 4) con respecto al grupo calibrador (confinamiento 0h sacrificio contusión). El análisis estadístico se realizó para cada tiempo de confinamiento por separado. Las diferencias significativas debidas al método de sacrificio se indican en letras. Las diferencias debidas a la densidad se indican con un \*.**

### MARCADORES BIOQUÍMICOS

A partir de las doradas sacrificadas para cada tratamiento se tomaron muestras de sangre de cual se extrajo el plasma para los análisis de los siguientes parámetros: glucosa, lactato, cortisol, proteína, albumina, potasio, cloro, magnesio, sodio y potasio. En la tabla 16 se presentan los valores medios por parámetro y por tratamiento probado.

Tratamiento	glucosa	lactato	cortisol	proteína	K	Cl	Na	P
15'-1.5°C-50%	162.2	0.32	137.6	2.0	Nd	144.2	135.4	12.8
15'-4.5°C-12.5%	152.8	0.32	134.1	2.0	Nd	155.4	138.9	12.4
15'-1.5°C-12.5%	98.5	0.32	139.6	2.0	Nd	112.6	145.7	11.7
15'-4.5°C-50%	148.2	0.32	137.6	2.0	Nd	119.0	152.8	11.8
60'-4.5°C-12.5%	238.1	0.28	147.0	2.0	Nd	123.1	216.2	6.9
60'-4.5°C-50%	232.7	0.28	136.5	1.9	Nd	136.8	181.2	7.8
60'-1.5°C-12.5%	180.1	0.28	157.6	2.0	Nd	171.7	178.5	6.8
60'-1.5°C-50%	174.3	0.28	117.5	2.0	Nd	107.4	174.9	8.2

Tabla 16: Promedio de los parámetros plasmáticos medidos en dorada para los diferentes tratamientos en el experimento 2.

Los valores medios por parámetro y tratamiento fueron comparados con un análisis de ANOVA y se detectaron las siguientes diferencias:

**GLUCOSA-** Hay diferencias significativas entre las condiciones 2 con condiciones 7 y 8

**LACATATO:** Hay diferencias significativas entre los tiempos de confinamiento, i.e. todos los tratamientos que se confinaron los peces 15 min (1 a 4) son significativamente diferentes de todos los que se confinaron los peces 60 min (5 a 8). A demás condición 1 es diferente de la 3.

**CORTISOL-** : Hay diferencias significativas entre los tiempos de confinamiento, i.e. todos los tratamientos que se confinaron los peces 15 min (1 a 4) son significativamente diferentes de todos los que se confinaron los peces 60 min (5 a 8). Además, la condición 2 es diferente de todas las otras

**SODIO-** : Hay diferencias significativas entre los tiempos de confinamiento, i.e. todos los tratamientos que se confinaron los peces 15 min (1 a 4) son significativamente diferentes de todos los que se confinaron los peces 60 min (5 a 8). La condición 8 es diferente de todas las otras. A demás las condiciones 1 y 4 son diferentes de la condición 3.

**FOSFORO-** Hay diferencias significativas entre los tiempos de confinamiento, i.e. todos los tratamientos que se confinaron los peces 15 min (1 a 4) son significativamente diferentes de todos los que se confinaron los peces 60 min (5 a 8).

Dado que el factor confinamiento parece ser el más influencia los resultados obtenidos se llevo a cabo un experimento solo para conocer el efecto de los diferentes tiempos de confinamiento

#### *Experimento 2.4.1.3.1. Evaluación del confinamiento en los tiempos previos al sacrificio (dorada y lubina)*

La captura se mostró en el experimento de la actividad 2.4.1.2 como un factor clave en la calidad del pescado mostrando efectos a nivel bioquímico y molecular. Para poder conocer más en detalle el efecto de este factor y de acuerdo con la información recopilada en la actividad 2.4.1.1 se diseñó un experimento sencillo en el

que los animales se confinaron durante 0, 15, 60 y 120 min antes del sacrificio. Para neutralizar los efectos debidos al aturdimiento y sacrificio, se procedió a eutanasiar los peces mediante contusión.

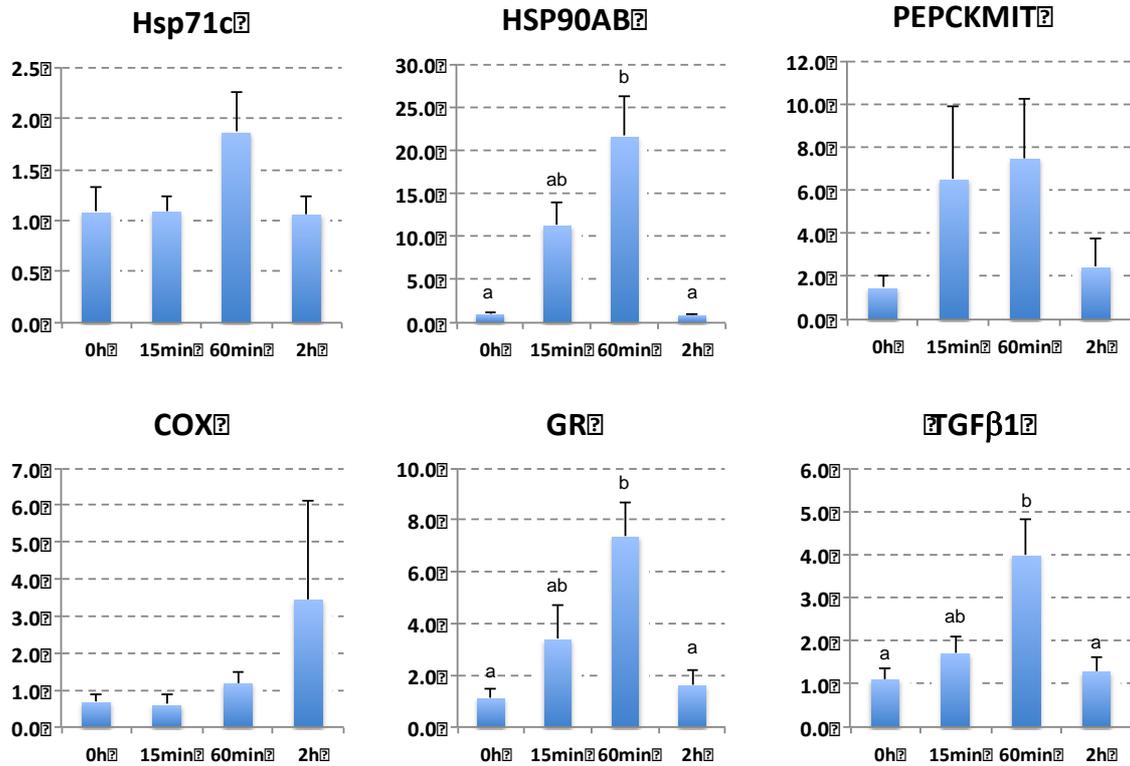
## MARCADORES MOLECULARES

Para evaluar el efecto confinamiento se analizó la expresión de 6 genes (HSP71c, HSP90, PEPCKMIT, COX2, GR y TGF $\beta$ 1) en muestras de cerebro e hígado de 5 ejemplares. El análisis estadístico demostró un claro efecto del tiempo en los patrones de expresión de los genes en estudio en ambos tejidos

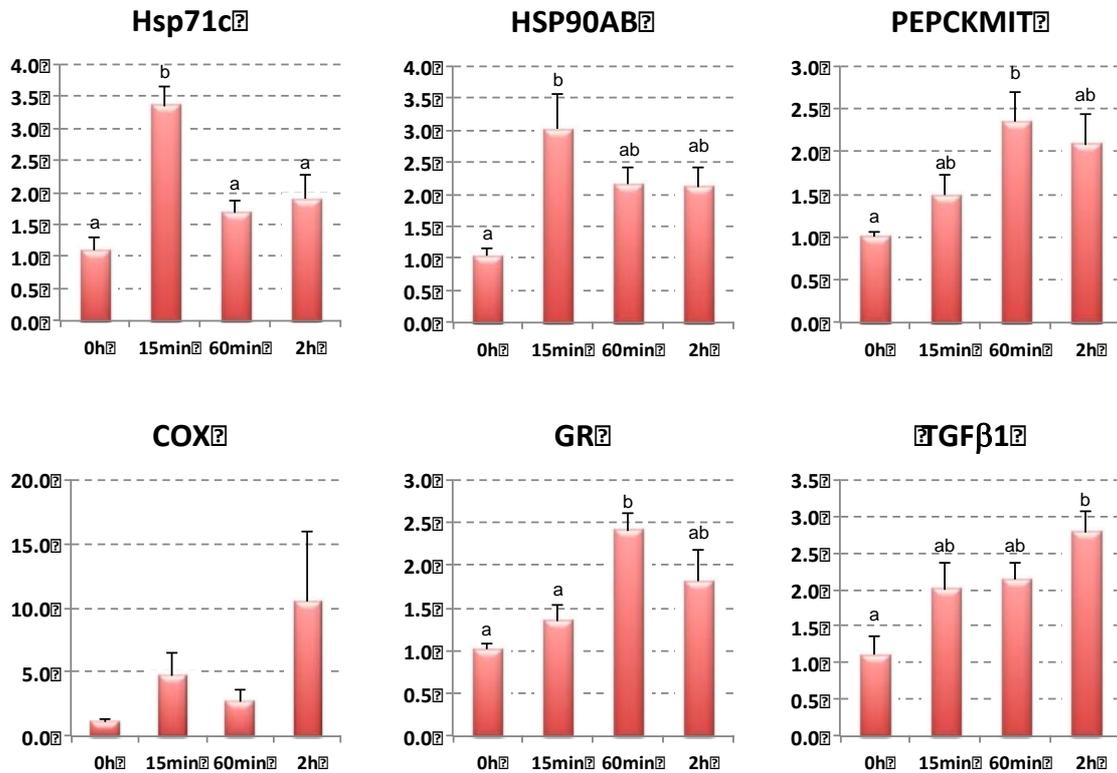
Tabla 17: Resultados de MANOVA para el efecto del confinamiento en cerebro

Efecto en Hígado	Lambda de Wilks	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Sig.
Intersección	.030	59.763	6.000	11.000	.000
Confinamiento	.037	3.900	18.000	31.598	.000
Efecto en Cerebro	Lambda de Wilks	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Sig.
Intersección	.042	34.571	6.000	9.000	.000
Confinamiento	.022	4.138	18.000	25.941	.001

En cerebro, los genes HSP90AB, y GR, TGF $\beta$ 1 incrementaron su expresión a los 15 y 60 min de confinamiento (21,6, 7,4 y 4 veces, respectivamente), recuperando los niveles basales a las 2 horas. En hígado, 5 de los 6 genes estudiados modificaron su expresión. Así, las HSP71c y HSP90AB incrementaron su expresión a los 15 min (3.3 y 3 veces, respectivamente), GR y PEPCKMIT a las 60 min (2.4 y 2.3 veces respectivamente) y TGF $\beta$ 1 a las 2 horas (2.8 veces).



**Figura 32: Niveles de expresión relativa de HSP71c, HSP90a, PEPCKMIT, COX, GR y TGFβ1 en cerebro en los 4 tiempos de confinamiento ensayados.** Los valores de expresión fueron normalizados a los de EEF1a. Los datos se expresan como el incremento medio (media ± SEM, n = 4) con respecto al grupo calibrador (0h). Las diferencias significativas debidas al tiempo de confinamiento se indican en letras.



**Figura 33: Niveles de expresión relativa de HSP71c, HSP90a, PEPCKMIT, COX, GR y TGFβ1 en hígado en los 4 tiempos de confinamiento ensayados.** Los valores de expresión fueron normalizados a los de EEf1a. Los datos se expresan como el incremento medio (media ± SEM, n = 5) con respecto al grupo calibrador (0h). Las diferencias significativas debidas al tiempo de confinamiento se indican en letras.

### MARCADORES BIOQUÍMICOS

A partir de las doradas sacrificadas para cada tratamiento se tomaron muestras de sangre de cual se extrajo el plasma para los análisis de los siguientes parámetros: glucosa, lactato, cortisol, proteína, albumina, potasio, cloro, magnesio, sodio y potasio. En la tabla 18 se presentan los valores medios por parámetro y por tratamiento probado.

Tratamiento	glucosa	lactato	cortisol	proteína	K	Cl	Na	P
0'	100.9	5.7	34.2	0.9	7.3	246.7	126.1	9.3
120'	291.3	10.0	22.6	0.8	7.8	179.0	175.6	8.5
60'	269.4	9.7	81.0	0.9	7.1	297.3	241.3	11.3
15'	196.9	11.0	69.4	0.8	6.3	204.5	183.3	10.3

Tabla 18: Promedio de los parámetros plasmáticos medidos en dorada para los diferentes tratamientos en el experimento 3.

Los valores medios por parámetro y tratamiento fueron comparados con un análisis de ANOVA y se detectaron las siguientes diferencias:

**GLUCOSA:** Sin confinamiento es diferente de un confinamiento de 60 min.

**LACTATO:** Sin confinamiento es diferente de cualquier confinamiento probado

**SODIO:** Sin confinamiento es diferente de un confinamiento de 120 min

**FOSFORO:** Sin confinamiento es diferente de un confinamiento de 120 min

**CLORO:** 60 minutos de confinamiento es diferente de cualquier otro tiempo ensayado y 120 minutos es diferente de cualquier otro tiempo ensayado.

Los resultados de este experimento demuestran claramente la influencia de un confinamiento (despesque en condiciones industriales) en el estrés que puedan sentir las doradas a la hora de la cosecha y sacrificio.

#### **2.4. 2. Objetivo2: Evaluación de métodos de sacrificio alternativos al agua fría y su aplicabilidad como métodos de aturdimiento previo aplicados al sacrificio de dorada, lubina y rodaballo. Efectos sobre el estrés, calidad de la carne e impacto económico.**

##### **Actividad 2.4.2.1 Experimento 4: Uso de mezcla de gases anestésicos**

Se sabía por observaciones propias por parte de investigadores del equipo que la exposición de doradas a CO<sub>2</sub> induce un comportamiento fuertemente aversivo (Ginés, pers. com) por lo que se decidió primero valorar la capacidad del N<sub>2</sub> como anestésico, dado que se conoce que al menos en mamíferos y aves es un gas tranquilizante.

Exp 4.1:	spp		tiempo	observaciones
N2	Sparus aurata	100% a 7%O <sub>2</sub>	sin anest a 10 min	muy tranquilas, no hay cambios entre introducción directa o ir bajando poco a poco
N2	Sparus aurata	8 %O <sub>2</sub>	sin anest a 10 min	
N2	Dicentrarchus labrax	13% O <sub>2</sub>	sin anest a 10 min	muy tranquilas

Tabla 19: Experimento preliminar para verificar si era posible utilizar el N<sub>2</sub> como gas anestésico

Una vez se observó que los peces quedaban tranquilos cuando expuestos a N<sub>2</sub>, se expusieron los peces a varias combinaciones de CO<sub>2</sub> con N<sub>2</sub> para valorar si el N<sub>2</sub> reduce el comportamiento aversivo mencionado

Exp 4.2:	spp	mezcla de gases	tiempo
N <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub>	Sparus aurata	79ppmCO <sub>2</sub> +20%O <sub>2</sub>	retraso la aversion de la dorada pero antes de anestesiarse se manifesto
N <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub>	Dicentrarchus labrax	79ppmCO <sub>2</sub> +20%O <sub>2</sub>	tranquilas y se anestasiaron en 10-15 min
N <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub>	Sparus aurata	20ppmCO <sub>2</sub> +15-20%O <sub>2</sub>	aversion
N <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub>	Dicentrarchus labrax	101ppmCO <sub>2</sub> +13%O <sub>2</sub>	anestesiados 1 min
N <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub>	Sparus aurata	101ppmCO <sub>2</sub> +13%O <sub>2</sub>	anestesiados 2 min
N <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub>	Dicentrarchus labrax	52ppmCO <sub>2</sub> + 16%O <sub>2</sub>	10 min sin anestesar
N <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub>	Sparus aurata	52ppmCO <sub>2</sub> + 16%O <sub>2</sub>	10 min sin anestesar
N <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub>	Sparus aurata	145ppmCO <sub>2</sub> +15%O <sub>2</sub>	1.28" anestesiadas
N <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> + frío	Sparus aurata	68pptCO <sub>2</sub> +15%N <sub>2</sub> +5°C	5.28"

Tabla 20: Comportamiento observado con el uso de diferentes mezclas de N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>

### Actividad 2.4.2.1 Experimento5: Uso de Aqui-S

Exp 5. 1:	spp	dosis	observaciones a 10 min.	comentarios
Aqui-S	Sparus aurata	15 ppm	Sin cambios	
	Sparus aurata	30 ppm	Sin cambios	
	Sparus aurata	45 ppm	Sin cambios	
	Sparus aurata	100 ppm	tranquilos	
	Sparus aurata	200 ppm	5 min anestesiados	buena recup en hielo
	Sparus aurata	300 ppm	2.24" anestesiados	buena recup en hielo
	Sparus aurata	400 ppm	1 min anestesiados	buena recup en hielo
Exp 5.2:				
Aqui-S	Dicentrarchus labrax	100 ppm	no pasa nada	
	Dicentrarchus labrax	200 ppm	2.55" anestesiados	
	Dicentrarchus labrax	300 ppm	1.07" anestesiados	
	Dicentrarchus labrax	150 ppm	10 min anestesiados	

Tabla 21: Comportamiento de los peces expuestos a diferentes concentraciones del anestésico Aqui-S

### Actividades 2.4.2.1. y 2.4.2.2. Evaluación de la mezcla de gases y de la anestesia

#### pH

La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos para la evolución del pH de la carne desde el momento del sacrificio y hasta las 48 horas postmortem. En este caso el modelo lineal general sólo ha contemplado dos factores, la especie y el medio de aturdimiento, ya que en todos los casos los peces fueron sacrificados en una mezcla de hielo y agua siguiendo las pautas que se vienen desarrollando a escala comercial. En relación al aturdimiento, además de un lote control que no se sometió a ningún proceso de aturdimiento y que directamente se introdujo tras la captura en la mezcla de hielo y agua citada, se testaron tres alternativas, dos concentraciones de anestésico Aqui-S y una mezcla de gases en las que se saturó con nitrógeno y se añadió dióxido de carbono y oxígeno en las proporciones detalladas en la metodología.

Es importante reseñar que, previamente a la introducción de los peces en los distintos medios de aturdimiento, se ejerció un cierto grado de estrés previo a la captura, persiguiéndolos en el tanque donde estaban confinados con un salabre durante cinco minutos. Esto condicionó, como se va a constatar con posterioridad, la evolución tanto del pH como del rigor mortis, sobre todo en los momentos más inmediatos a la consecución del sacrificio.

Tabla 22. Valores de pH tras el sacrificio (a 0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas postmortem) según especie y aturdimiento (control, AquiS-200, AquiS-300 o mezcla de gases).

especie	DORADA				LUBINA				Significación de los factores		
	C	A200	A300	GAS	C	A200	A300	GAS	ES	AT	ES*AT
aturdimiento	C	A200	A300	GAS	C	A200	A300	GAS	ES	AT	ES*AT
pH-0	6,70	6,91	6,56	6,38	6,19	6,21	6,19	6,17	***	**	*
pH-3	6,34	6,54	6,33	6,15	6,12	6,19	6,19	6,11	**	*	ns
pH-6	6,28	6,32	6,29	6,22	6,17	6,17	6,13	6,16	***	ns	ns
pH-12	6,25	6,23	6,33	6,38	6,13	6,21	6,20	6,21	**	ns	ns
pH-24	6,39	6,38	6,45	6,40	6,33	6,33	6,34	6,37	ns	ns	ns
pH-48	6,49	6,40	6,36	6,40	6,38	6,37	6,40	6,49	ns	ns	ns

ES – especie  
 AT – aturdimiento  
 C – control  
 A200 – AquiS-200  
 A300 – AquiS-300  
 GAS – mezcla de gases

Durante los cuatro primeros puntos de muestreo, hasta las 12 horas postmortem, hay un claro efecto de la especie. En este sentido, los valores medios obtenidos para la lubina son menores que para la dorada. Esto ya se vio, aunque no de manera tan manifiesta, en los experimentos previos. Aquí las diferencias son mucho más aparentes, dando a entender una mayor susceptibilidad de la lubina a las situaciones estresantes previas al sacrificio. La persecución durante el confinamiento ha ejercido un mayor impacto sobre la lubina, lo que se ha traducido en niveles más bajos de pH en las primeras horas tras el sacrificio, es decir, llegó al sacrificio con un mayor gasto de las reservas y parte de sus metabolitos ya acumulados, responsables de ese bajo pH inicial.

En cualquier caso, tanto la dorada como la lubina presentaron valores más bajos en los momentos iniciales con respecto a los experimentos ya citados. Para las dos especies, el manejo previo al aturdimiento generó un gasto energético que se tradujo en ese menor pH inicial. Pero no sólo eso, sino que ese agotamiento de reservas contribuyó a que el punto máximo de descenso no llegara a niveles tan bajos en este experimento, y además rápidamente alcanzó el punto de retorno y comenzó a ascender a partir de las 9 horas postmortem. Este ascenso fue más pronunciado en la lubina pero por el hecho de que partía de valores más bajos. Así, al final de las 48 horas, no se encontraron diferencias debidas a la especie (Figuras 34 y 35).

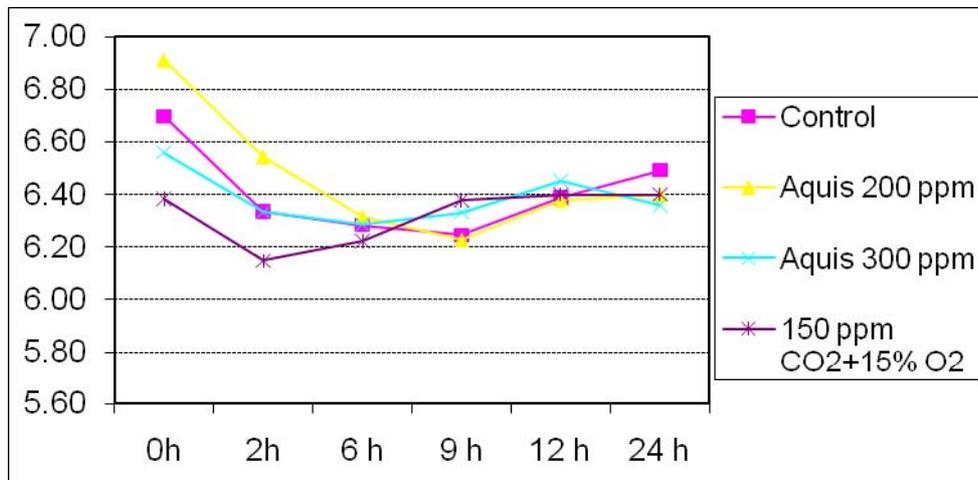


Figura 34. Evolución del pH de la carne tras el sacrificio (a 0, 2, 6, 12, 24, y 48 horas postmortem) en dorada atendiendo al tipo de aturdimiento (control, AquisS-200, AquisS-300 o mezcla de gases).

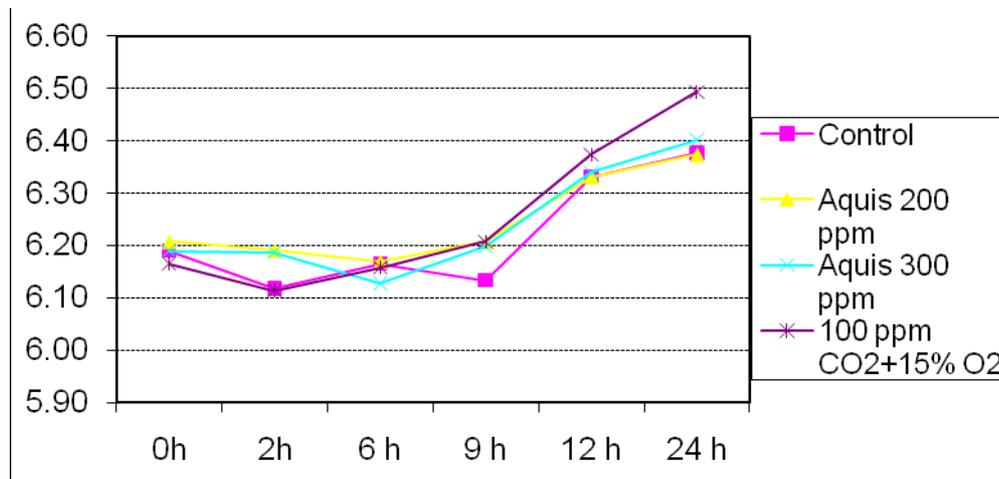


Figura 35. Evolución del pH de la carne tras el sacrificio (a 0, 2, 6, 12, 24, y 48 horas postmortem) en lubina atendiendo al tipo de aturdimiento (control, AquisS-200, AquisS-300 o mezcla de gases).

En relación con la metodología de aturdimiento se encontró un efecto significativo en los momentos iniciales después del sacrificio, así como una interacción con la especie en el momento inmediato tras el mismo. Aunque esto último puede estar condicionado por el efecto ya descrito sobre la lubina en la captura, con valores muy bajos del pH a las 0 horas tras el sacrificio en todos los tratamientos. Por su parte, en la dorada, los valores tras la utilización del Aquí-S no difirieron de los del lote control, y únicamente se iniciaron más bajos y alcanzaron un mayor descenso en el lote con la mezcla de gases. Esto sólo sucedió hasta las 6 horas postmortem, ya que a partir de entonces no hubo diferencias. En la lubina no las hubo en ningún momento.

En definitiva, parece que la mezcla de gases, si bien no contribuye ni a un mantenimiento ni a un agotamiento de las reservas corporales previo al sacrificio, si que afecta los valores del pH de la carne en los momentos iniciales, probablemente por la incidencia que el propio dióxido de carbono tiene a nivel tisular.

### Rigor mortis

En la determinación del rigor mortis, la manipulación previa a la captura ha condicionado que este parámetro no pueda ser evaluado en la lubina. Lo que determina esta técnica es el grado de rigidez y su evolución en el tiempo pero en referencia al que muestra el pez en el momento de su sacrificio. Si ya en este momento la rigidez es máxima, la referencia frente a este punto no tiene sentido y no puede calcularse. ¿Y por qué el pez estaba rígido ya en el tiempo cero? El agotamiento de las reservas ya detallado para explicar los valores del pH sin duda ha motivado ese estado de máxima rigidez muscular sin solución de continuidad.

Por su parte, la dorada, siguió un patrón considerablemente diferente del presentado en los experimentos anteriores. Si bien es cierto que a partir de las 24 horas postmortem la rigidez comienza a bajar, el máximo no se alcanza en ese momento, sino bastante antes en el tiempo, en algún caso ya a las 3 horas postmortem (Tabla 23).

Tabla 23. Índices de *rigor mortis* tras el sacrificio (a 3, 6, 12, 24 y 48 horas postmortem) en dorada según el tipo de aturdimiento (control, AquíS-200, AquíS-300 o mezcla de gases),

aturdimiento	C	A200	A300	GAS
rg-3	94,4	64,3	78,3	72,8
rg-6	95,0	83,8	90,3	81,6
rg-12	97,6	97,5	96,1	89,1
rg-24	93,8	93,8	93,9	80,5
rg-48	83,2 <sup>a</sup>	83,8 <sup>a</sup>	85,8 <sup>a</sup>	52,3 <sup>b</sup>

C – control

A200 – AquíS-200

A300 – AquíS-300

GAS – mezcla de gases

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

Las evoluciones son muy similares en todos los tratamientos (Figura 36), salvo en el que se aturdió con la mezcla de gases, con un descenso más acusado y que llegó a presentar un valor significativamente diferente a las 48 horas tras el sacrificio. Sin embargo hay que tener en consideración que los peces de este tratamiento tuvieron en el momento inmediatamente tras el sacrificio una mayor rigidez, y como al fin y al cabo este índice se referencia con dicho punto, un descenso de igual magnitud en valor absoluto aparece en valor porcentual más intenso.

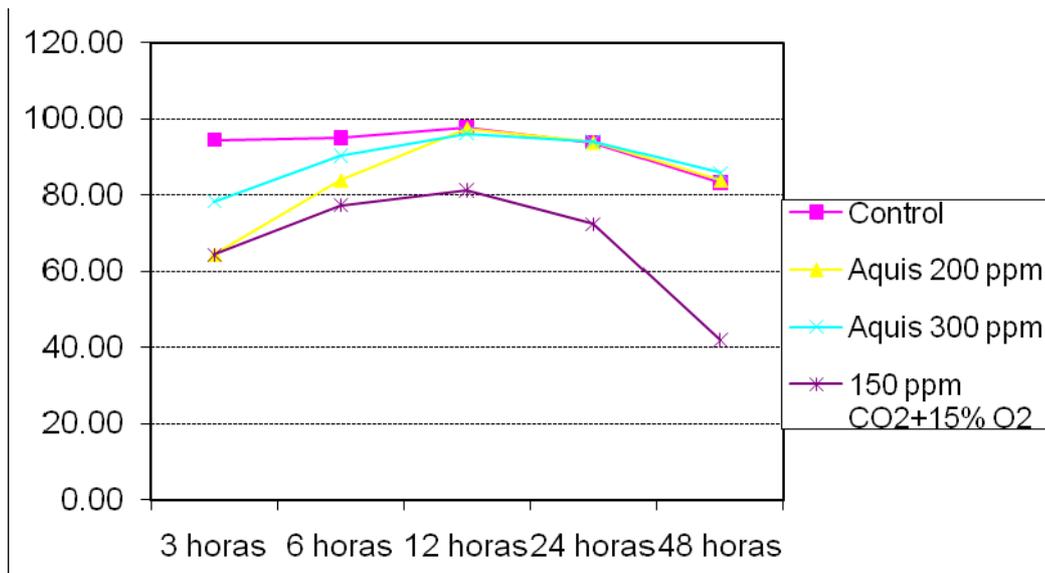


Figura 36. Evolución de la instauración del *rigor mortis* tras el sacrificio (a 0, 2, 6, 12, 24, y 48 horas postmortem) en dorada atendiendo al tipo de aturdimiento (control, Aquis-200, Aquis-300 o mezcla de gases).

A pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, al menos hasta las 48 horas, es reseñable que en los momentos iniciales, hasta las 6 horas postmortem, los peces del lote control presentaron un mayor grado de rigor mortis. Tal vez este efecto hubiera llegado a ser más representativo si no se hubiera realizado el manejo de persecución durante el confinamiento previo a la introducción en el medio de aturdimiento.

## Aspecto externo

Es destacable que, a pesar de obtener en este experimento los datos más negativos en relación a la calidad de la carne, tanto en la evolución del pH como del rigor mortis, el aspecto externo obtiene una mejor valoración. El grado de descamación en dorada es similar o incluso menor que en el experimento de confinamiento, y aún es más diferenciador el hecho de que apenas se observan Petequias para el caso de las lubinas. Hay algún individuo con laceraciones y descamación importante (Figura 37), pero estos deméritos del aspecto no son constantes en todos los individuos.



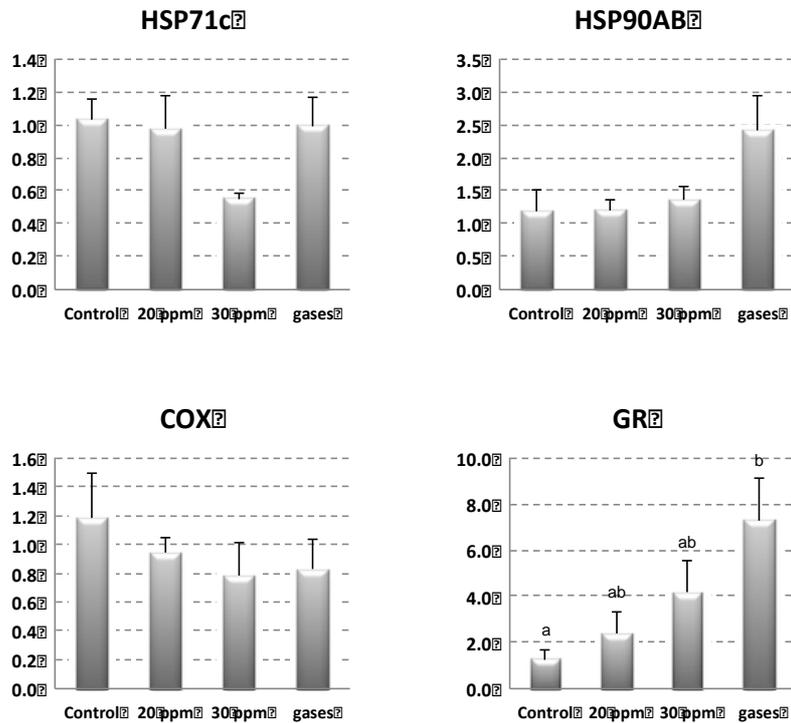
Figura 37. Lubina con importantes laceraciones y pérdida de escamas.

## MARCADORES MOLECULARES

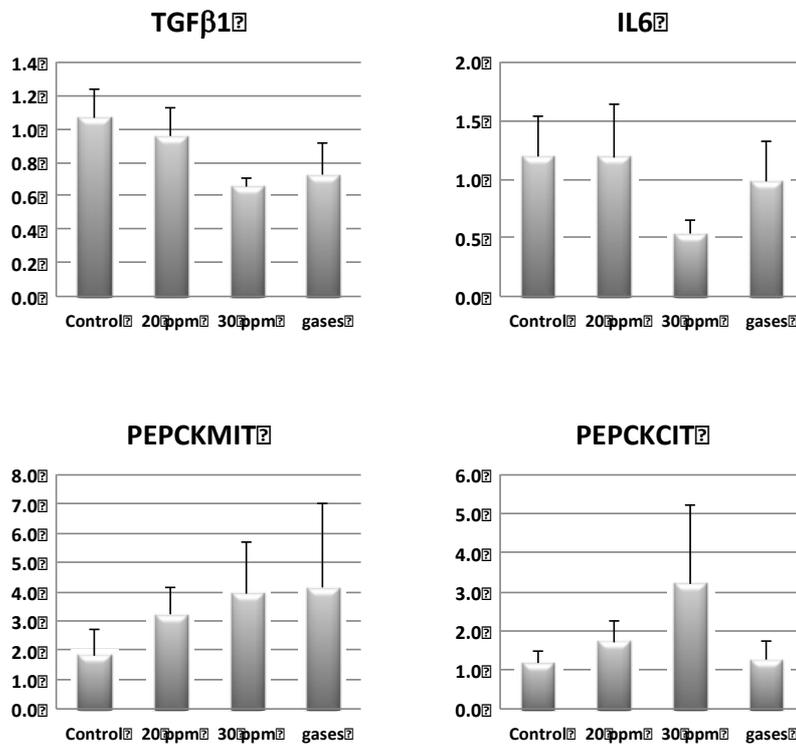
Tabla 24: Resultados de MANOVA para el efecto del sacrificio con anestésico y gases en cerebro

Efecto en cerebro	Lambda de Wilks	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Sig.
Intersección	.022	50.152 <sup>b</sup>	8.000	9.000	.000
METODO DE SACRIFICIO	.088	1.464	24.000	26.704	.169

El análisis estadístico no encontró diferencias entre los distintos métodos de sacrificio analizados. Sólo para el gen GR se encontraron diferencias significativas entre el sacrificio con gases y el directo con agua fría (Los niveles de transcrito fueron 7.27 veces superiores en los animales sacrificados con la mezcla de gases).



**Figura 38:** Niveles de expresión relativa de HSP71c, HSP90AB, COX y GR en cerebro en doradas confinadas 5 min y sacrificadas en hielo (control), con aquiS (20 y 30 ppm de euganol) y mezcla de gases. valores de expresión fueron normalizados a los de EEf1a. Los datos se expresan como el incremento medio (media  $\pm$  SEM, n = 5) con respecto al grupo calibrador (Sacrificio en hielo). Las diferencias significativas debidas al método de sacrificio se indican en letras.



**Figura 39:** Niveles de expresión relativa de TGFβ1, IL6, PEPCKMIT y PEPCKCIT en cerebro en

**doradas confinadas 5 min y sacrificadas en hielo (control), con aquí-S (20 y 30 ppm de euganol) y mezcla de gases.** valores de expresión fueron normalizados a los de EEf1a. Los datos se expresan como el incremento medio (media  $\pm$  SEM, n = 5) con respecto al grupo calibrador (Sacrificio en hielo). Las diferencias significativas debidas al método de sacrificio se indican en letras.

## MARCADORES BIOQUÍMICOS

A partir de las doradas sacrificadas para cada tratamiento se tomaron muestras de sangre de cual se extrajo el plasma para los análisis de los siguientes parámetros: glucosa, lactato, cortisol, proteína, potasio, cloro, magnesio, sodio y potasio. En la tabla 25 se presentan los valores medios por parámetro y por tratamiento probado.

Tratamiento	glucosa	lactato	Cortisol	Proteína	K	Cl	Na	P
<b>Hielo</b>	<b>79.37</b>	<b>62.7</b>	<b>16.2</b>	<b>0.98</b>	<b>5.0</b>	<b>171.8</b>	<b>106.5</b>	<b>8.8</b>
<b>200ppm aquí-S</b>	<b>115.3</b>	<b>50.5</b>	<b>17.8</b>	<b>0.95</b>	<b>2.8</b>	<b>171.0</b>	<b>88.6</b>	<b>9.0</b>
<b>300ppm aquí-S</b>	<b>90.6</b>	<b>57.3</b>	<b>6.9</b>	<b>1.0</b>	<b>2.8</b>	<b>152.8</b>	<b>107.7</b>	<b>10.4</b>
<b>Mezcla CO<sub>2</sub>+N<sub>2</sub></b>	<b>66.3</b>	<b>58.4</b>	<b>9.2</b>	<b>0.98</b>	<b>7.2</b>	<b>176.2</b>	<b>104.3</b>	<b>9.6</b>

Tabla 25: Promedio de los parámetros plasmáticos medidos en dorada para los diferentes tratamientos en el experimentos 4 y 5.

Los valores medios por parámetro y tratamiento fueron comparados con una prueba -T (Gases y control) y un análisis de ANOVA (AquiS y control) y se detectaron las siguientes diferencias:

La prueba de T indicó diferencias significativas solamente en el contenido en proteína total en entre los tratamientos control (sacrificio en agua muy fría) y aturdimiento con gases seguido de sacrificio.

En el uso de Aqui S para aturdimiento se encontraron las siguientes diferencias:

**GLUCOSA:** Uso de hielo es diferente de anestésico en cualquiera de las concentraciones usadas para aturdir los peces.

**PROTEINA:** Uso de hielo es diferente de anestésico en cualquiera de las concentraciones usadas para aturdir los peces.

**FOSFORO:** Uso de hielo y 200 ppm de AquiS es diferente de 300 ppm de Aqui S.

## B) OBJETIVOS PARCIALES EN RODABALLO

Se llevaron a cabo gran parte de las tareas que, dentro del proyecto JACUMAR, estaban previstas para ser realizadas en el año 2011 y 2012 por parte del grupo investigador encargado en la Comunidad autónoma de Galicia. Debido al fuerte recorte en el presupuesto inicial para esta anualidad, se han abordado aquellos experimentos que se habían indicado en la modificación del proyecto ya comunicada a los responsables de la Comunidad autónoma y de JACUMAR.

### 1) **Objetivo1. Evaluación y mejora de las prácticas para el sacrificio de peces marinos en agua muy fría y su efecto sobre el estrés y calidad de la carne:**

#### 1.1) **Evaluación del efecto de manejo previo al sacrificio y de la proporción agua:hielo**

## 1.2) Optimización del método de aturdimiento en hielo. Comparación del cambio brusco de temperatura del agua con el que produce el cambio gradual sobre la respuesta de estrés en rodaballo

## 2) Objetivo 2. Evaluación del método de aturdimiento eléctrico

A continuación se resumen las actividades concretas llevadas a cabo y los principales resultados obtenidos a lo largo de este periodo.

### 2.3. METODOLOGÍA

#### 2.3. OBJETIVO 1: Evaluación y mejora de las prácticas para el sacrificio de peces en agua muy fría (RODABALLO) y su efecto sobre el estrés y la calidad de la carne.

En esta especie los procedimientos habituales de sacrificio no exigen someter a los peces a situación previa de confinamiento, por lo que no se desarrollaron experimentos con el fin de evaluar dicha situación.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en las instalaciones del Centro Tecnológico Gallego de la Acuicultura (CETGA), Punta de Couso, Aguiño, Ribeira, A Coruña, participando personal cualificado del propio centro en colaboración con el personal de la Universidad de Vigo que realiza el proyecto.

#### 2.3.1. ACTIVIDAD 1. Evaluación del procedimiento actual de sacrificio en hielo

##### Diseños experimentales

Con el fin de evaluar el protocolo habitual de sacrificio en hielo y definir la situación basal, se realizaron tres experimentos con los siguientes objetivos concretos:

- Evaluar el tiempo de aturdimiento y recuperación de los peces mantenidos en agua a 3 temperaturas (2°C, 1°C, -1 °C)
- Determinar el efecto del tiempo de permanencia de los rodaballos en agua:hielo a la temperatura de 0 °C, sobre parámetros sensoriales y actividad motora, así como sobre el tiempo de recuperación.
- Determinar los niveles basales y el efecto de la permanencia en hielo sobre parámetros bioquímicos y hormonales relacionados con la respuesta de estrés, y sobre la calidad de la carne.

#### Experimento 1. Efecto de la temperatura del agua sobre el aturdimiento de los peces y su recuperación.

Se usaron tres grupos de peces (n=5 peces por tanque) de tamaño comercial (aproximadamente 1,2 Kg) mantenidos en tanques de 100 L de agua a 15.4 °C, a los que se añadió hielo hasta alcanzar la temperatura objetivo en cada tanque. Los peces permanecieron en ayunas desde 24 horas antes del experimento.

Para cada temperatura se evaluó en comportamiento de los peces en base al test de Morzel, tal y como se indica a continuación:

##### Parámetros de comportamiento:

- Pérdida parcial del equilibrio

- 2) Reacción a estímulos externos – Presión fuerte del pedúnculo caudal = aturdido
- 3) Pérdida de movimiento ocular (vestíbulo-ocular reflex-VOR). Determinado por la falta de respuesta al estimular el ojo.
- 4) Tiempo de muerte (cese de los movimientos operculares y oculares) = muerto

***Experimento 2. Efecto del tiempo de permanencia en agua:hielo (0°C) sobre el grado de aturdimiento de los rodaballos y su recuperación.***

Se usaron dos grupos de peces (N=5) de tallas distintas: a) grandes, de aproximadamente 1,2 Kg; b) pequeños, de aproximadamente 400 g, que se mantuvieron en dos tanques de 100 L de agua a 15.4 °C a los que se añadió hielo hasta alcanzar la temperatura de 0 °C (seleccionada a partir de resultados de experimento 1). Posteriormente se añadieron 5 peces a cada tanque.

Se evaluó el grado de aturdimiento de los peces siguiendo los parámetros indicados anteriormente (Test de Morzel), a los siguientes tiempos 5, 10, 15, 25, 30, 45, 60 y 120 minutos.

A partir de los 30 minutos en hielo se trasladó un pez de cada talla a un tanque con agua a temperatura normal, a fin de evaluar su capacidad de recuperación.

***Experimento 3. Determinación de niveles basales. Efecto de la captura y de la permanencia en hielo sobre parámetros relacionados con la respuesta a estrés y sobre la calidad de la carne.***

Se usaron un total de 192 animales de dos tallas comerciales:

- Rodaballos grandes: de aproximadamente 1,5 Kg de peso (N= 96)
- Rodaballos pequeños: de aproximadamente 500 g de peso (N= 96)

Inicialmente los animales se distribuyeron en 8 tanques stock, cuatro de los cuales tenían agua a 15 °C y otros 4 con agua a 18 °C, simulando las condiciones de temperatura con las que se encuentran a lo largo del año.

Dentro cada grupo de temperatura (15 °C y 18°C) y talla (500 g y 1,5 Kg) se establecieron dos subgrupos, en base a la utilización o no de anestésico, en el tanque, tal como se indica en la tabla anexa:

		Temperatura inicial 15 °C				Temperatura inicial 18°C			
		Grandes		Pequeños		Grandes		Pequeños	
		Anestesia	Sin anestesia	Anestesia	Sin anestesia	Anestesia	Sin anestesia	Anestesia	Sin anestesia
Niveles basales	Hielo + 0 min	N=8	N=8	N=8	N=8	N=8	N=8	N=8	N=8
	Hielo + 30 min	N=8	N=8	N=8	N=8	N=8	N=8	N=8	N=8
	Hielo + 60 min	N=8	N=8	N=8	N=8	N=8	N=8	N=8	N=8

**Esquema 1. Sumario del diseño experimental planteado para evaluar el efecto de la permanencia en agua:hielo (0°C) en rodaballos que inicialmente estaban adaptados a agua de dos temperaturas (15°C**

y 18 °C). Se utilizaron peces de dos tamaños: 500 gramos y 1500 gramos. Los peces fueron muestreados y sacrificados tras permanecer 8 y 60 minutos en hielo.

Se establecieron tres niveles temporales a fin de estimar los niveles basales (muestreo previo a añadir hielo al tanque) o tras la adición de una cierta cantidad de hielo a cada tanque a fin de alcanzar la temperatura de 0°C. En este caso se muestrearon los peces a los 8 min y 60 min de alcanzarse la temperatura deseada.

El anestésico utilizado fue aceite de clavo a la dosis de 130 ppm (equivalente a 13 ml de aceite de clavo por 100 L de agua). Previamente se bajó el nivel de agua de los tanques, se intensificó la oxigenación, se añadió el anestésico y se dejaron los peces durante 30 minutos en esa situación.

El muestreo consistió en la captura con truel de los peces y la inmediata extracción de sangre mediante punción venosa con jeringuillas heparinizadas.

### Calidad de la Carne.

Se tomaron muestras de los peces (N=6 grupo) para el análisis organoléptico y de calidad de la carne. Para ello los peces se guardaron en cajas de porexpán cubiertas de plástico y sendas capas, superior e inferior, de hielo. Las muestras se enviaron a la empresa ANFACO (Vigo) que realizará los análisis correspondientes, incluyendo éstos la determinación de nitrógeno básico volátil total (NBVT), análisis sensorial, análisis colorimétrico y análisis de la textura del producto.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en las instalaciones del Centro Tecnológico Gallego de la Acuicultura (CETGA), Punta de Couso (Aguíño, Ribeira), participando personal cualificado del propio centro en colaboración con el personal de la Universidad de Vigo que realiza el proyecto.

### 2.3.1. ACTIVIDAD 2. Optimización del método de aturdimiento en hielo. Comparación del efecto del cambio brusco de temperatura del agua (mezcla agua:hielo) con el que produce un cambio gradual de temperatura del agua sobre la respuesta al estrés y el bienestar en rodaballo.

Los resultados preliminares parecen indicar que en el rodaballo no hay una activación importante del eje de estrés ante el shock térmico (cambio brusco de temperatura del agua). No obstante, hemos creído necesario confirmar dicha conclusión con nuevos experimentos, así como comparar la respuesta de estrés en dicha situación con aquella que tiene lugar cuando los peces son sometidos a un cambio gradual de temperatura. Estos datos tratan de contribuir a la optimización del método de aturdimiento en hielo desde un punto de vista del bienestar animal.

### Diseño experimental:

Se planteó un único experimento con los siguientes grupos de peces:

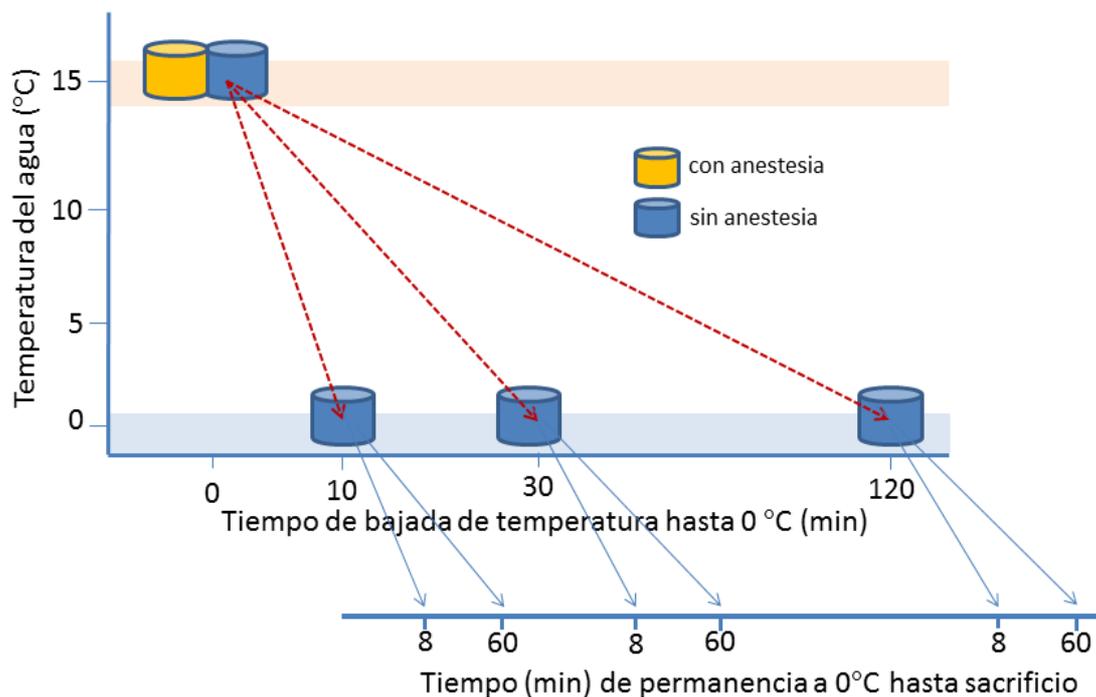
#### ➤ *Basales:*

Control: se muestrea un grupo de peces en agua a 15°C. 10 peces

Control anestesiado: en un tanque con agua a 15 °C se anestesia un grupo de peces y se muestrean. Este grupo permitirá determinar el efecto de la manipulación en el muestreo. 10 peces

➤ *Cambio brusco de temperatura (10 minutos hasta valor final).* En el tanque se añade una cantidad de hielo que permita una caída brusca de temperatura hasta 0°C (aprox. 10 min). Una vez alcanzada esa temperatura se muestrean los peces transcurridos 8 minutos (10 peces) y 60 minutos (10 peces).

- **Cambio gradual rápido de temperatura (30 minutos hasta punto final).** En el tanque se añaden pequeñas cantidades de hielo que permitan bajar gradualmente la temperatura, de modo que cada 10 minutos se produzca una caída de 5°C. Una vez alcanzados los 0°C se muestrean los peces transcurridos 8 minutos (10 peces) y 60 minutos (10 peces).
- **Cambio gradual lento de temperatura (120 minutos hasta punto final).** En el tanque se añaden de forma continua cantidades de hielo muy pequeñas que permiten bajar gradualmente la temperatura, de modo que cada 40 minutos se produce una caída de 5°C. Una vez alcanzados los 0°C se muestrean los peces transcurridos 8 minutos (10 peces) y 60 minutos (10 peces).



**Esquema 2. Diseño experimental planteado para evaluar el efecto del tiempo de enfriado de los peces y su posterior permanencia en hielo. Un grupo de rodaballos a tiempo cero fue tratado con anestesia para estimar el efecto de la manipulación. En los grupos sin anestesia, los peces permanecieron en hielo:agua (0°C) durante 8 o 60 minutos, procediéndose a su sacrificio y muestreo.**

Peces y condiciones experimentales: se usaron un total de 80 rodaballos de aproximadamente 100 gramos de peso que se distribuyeron en 8 tanques stock. A fin de definir adecuadamente la situación basal, un grupo de peces fue anestesiado mediante fenoxietanol a la dosis de 0.25 cm<sup>3</sup>.L<sup>-1</sup>

En los demás grupos de peces no se utilizó anestesia previa ni se realizó ninguna manipulación de los animales en sus respectivos tanques de cultivo, a fin de evitar interacciones debidas al manejo de los animales. Para conseguir la temperatura deseada, se añadieron jarras de hielo a los tanques donde estaban los peces hasta alcanzar dicho valor de temperatura del agua.

Toma de muestras: La captura de los peces se llevó a cabo de la manera menos traumática posible, tras lo cual se procedió a extraer una muestra de sangre que se centrifugó con el fin de obtener el plasma que se dividió en alícuotas para diferentes análisis bioquímicos y hormonales.

Se determinarán los siguientes parámetros:

Sangre total

Hematocrito

Concentración de hemoglobina

Plasma sanguíneo

Niveles de cortisol

Niveles de glucosa

Niveles de lactato

Hígado

Niveles de glucógeno

Niveles de glucosa

Niveles de lactato

### **2.3. OBJETIVO 2: Evaluación del método de aturdimiento eléctrico como alternativa al sacrificio en hielo**

A fin de poder comparar el método de sacrificio en hielo con el método de aturdimiento mediante shock eléctrico, durante el año 2012 se ha comenzado a realizar ensayos preliminares para validar las condiciones de funcionamiento del sistema de shock eléctrico y su adecuación a la especie.

Los resultados obtenidos en dichas pruebas son todavía poco significativos, aunque parecen indicarnos que este método tiene consecuencias más drásticas sobre la fisiología del animal que el enfriado en hielo. Las limitaciones temporales del proyecto, junto con el recorte del presupuesto, han provocado que se hayan suspendido dichas actividades que creemos deben retomarse más adelante para concretar la viabilidad de dicho método como alternativa al aturdimiento en hielo.

## **2.4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

### **2.4. OBJETIVO 1: Evaluación y mejora de las prácticas para el sacrificio de peces en agua muy fría (RODABALLO) y su efecto sobre el estrés y la calidad de la carne.**

#### **2.4.1. Actividad 1. Evaluación del procedimiento actual de sacrificio en hielo**

##### Experimento 1. Efecto de la temperatura sobre el grado de aturdimiento y la recuperación en rodaballo.

La siguiente tabla refleja el efecto de la temperatura sobre el tiempo de aturdimiento de los peces y su nivel de recuperación tras cambiar la mezcla agua:hielo por agua a temperatura normal.

## Efecto de la temperatura sobre el grado de aturdimiento y la recuperación

Temperatura	Tiempo de Aturdimiento (min) en agua / hielo	Tiempo de Recuperación (min) en agua normal
2 °C	8,26 min - 10 min	14 min
0 °C	3,37 min - 4,40 min	15 min
-1 °C	3.30 min - 4.40 min	20 min

### Experimento 2. Efecto del tiempo en hielo sobre el grado de aturdimiento y la recuperación de los rodaballos.

La tabla anexa muestra las respuestas sensoriales y motoras obtenidas en rodaballos mantenidos durante dos horas en situación de agua:hielo a 0 °C. A partir del minuto 30, se procedió a cambiar el agua de los tanques por agua a temperatura normal a fin de evaluar el tiempo de recuperación de los peces. No se produjo muerte alguna durante el experimento.

### Efecto del tiempo en hielo (0°C) sobre el grado de aturdimiento y la recuperación

Tiempo en hielo	Respuesta a estimulación / Actividad motora	Recuperación
5 min	No reacción a la estimulación (pellizco de la cola, pinchazo con aguja) Intentar recuperar la verticalidad	No ensayada
10 min	No respuesta a estímulos No recuperan la verticalidad. Los grandes mueven opérculo lentamente. Los pequeños no mueven el opérculo, uno mueve aleta pectoral	No ensayada
15 min	No respuesta a estímulos No movimiento opercular	No ensayada
25 min	Un pez grande nada unos segundos, mandíbula desencajada	No ensayada
30 min	No respuesta a estímulos No actividad	15 min
45 min	No respuesta a estímulos No actividad	15 min
60 min	No respuesta a estímulos No actividad	15 min
120 min	No respuesta a estímulos No actividad	20 min

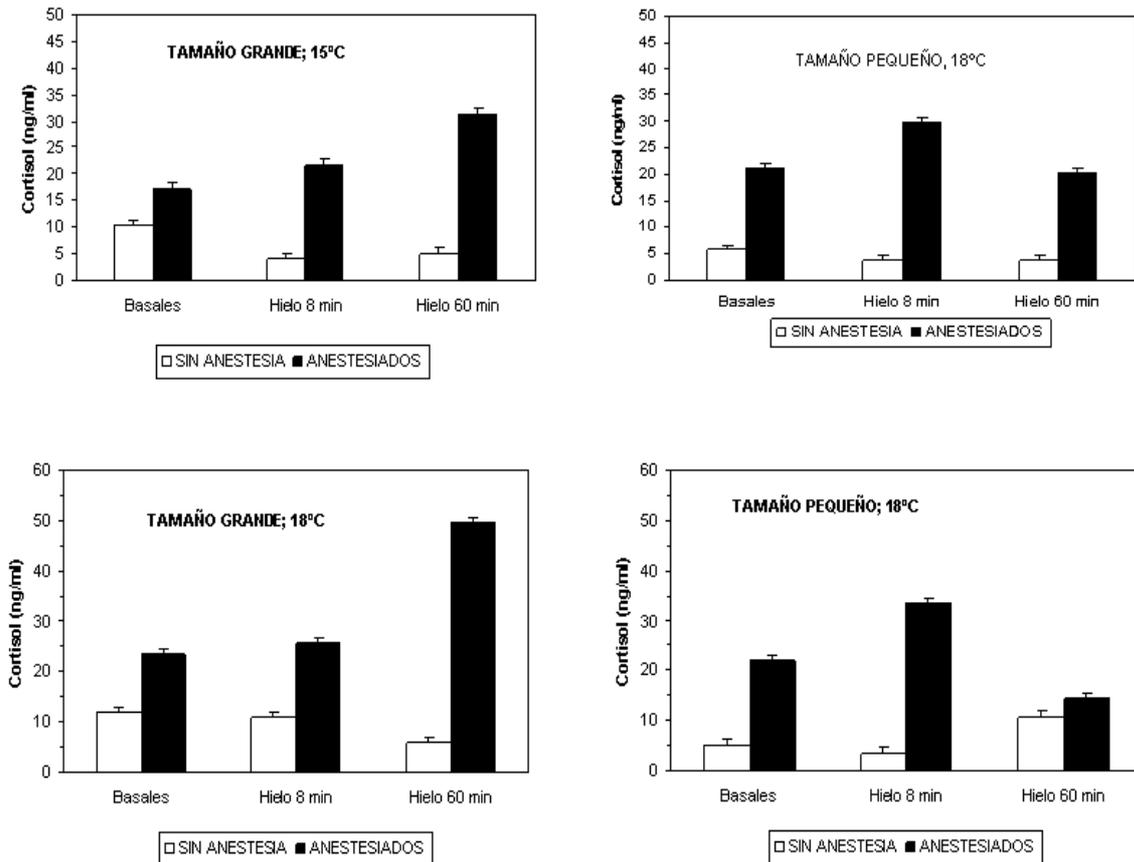
### **Experimento 3. Determinación de niveles basales. Efecto de la captura y de la permanencia en hielo sobre diferentes parámetros de la respuesta a estrés y sobre la calidad de la carne.**

A lo largo de este año se ha llevado a cabo el análisis de los diferentes parámetros bioquímicos y hormonales relacionados con la respuesta de estrés en los peces sometidos a una situación de hielo:agua.

#### A) PARAMETROS HORMONALES

En la Figura 40 se muestran los datos de los niveles de cortisol en plasma de peces de los dos tamaños y temperaturas estudiadas, sometidos a aturdimiento con agua:hielo (temperatura de 0-1 °C) y que permanecieron en esta situación durante 8 y 60 minutos. Se ensayaron dos condiciones de los animales: sin

anestesia previa y tras anestesia de los peces con aceite de clavo. Tal y como se observa en los gráficos, encontramos un fuerte efecto del anestésico sobre los niveles de cortisol, incrementando ya los valores basales (previos al enfriamiento) de la hormona, que se mantuvieron elevados durante todo el tiempo de permanencia de los peces en hielo. Este efecto fue independiente de la talla de los peces y de la temperatura de partida a la que se cultivaron.

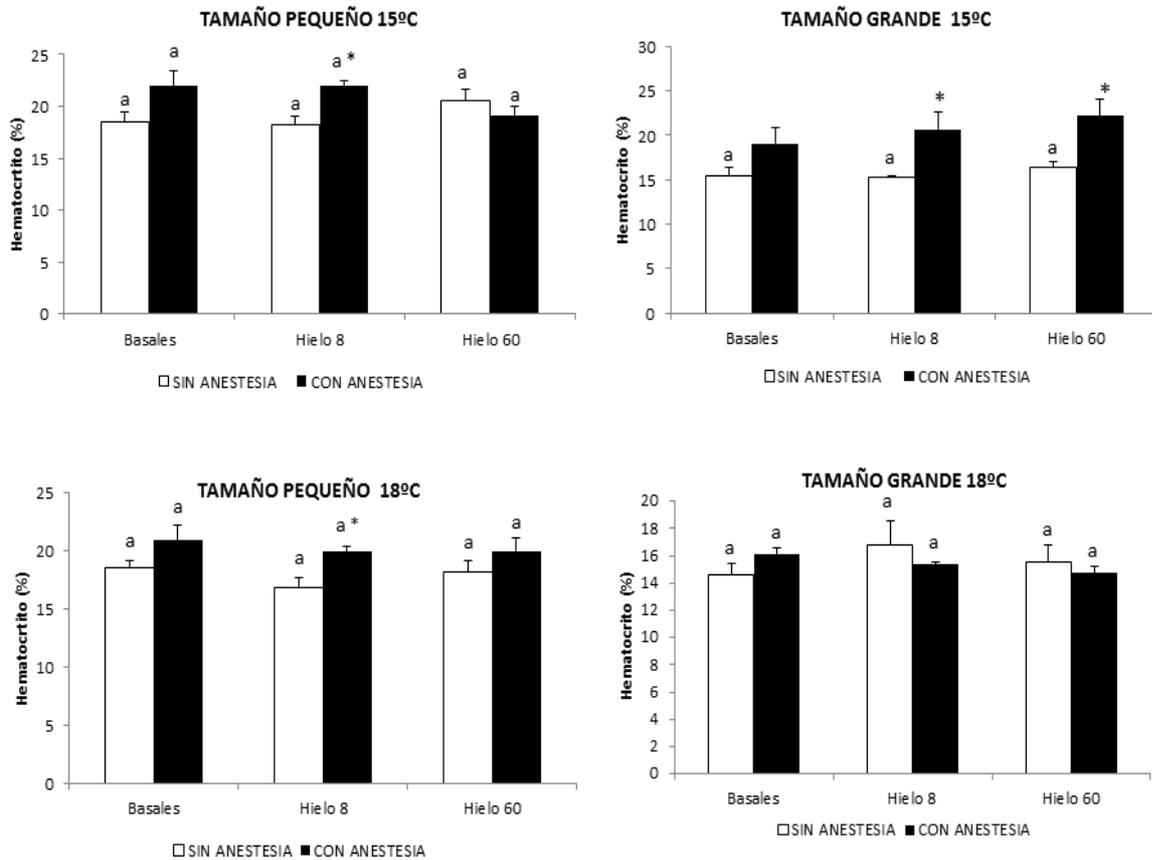


**FIGURA 40. NIVELES DE CORTISOL EN PLASMA.** Los datos corresponden a rodaballos (grupo pequeño: 500 g; grupo grande 1500 g) anestesiados y sin anestesiados sometidos a situación de agua:hielo durante 8 y 60 minutos. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de los grupos sin y con anestesia. Los asteriscos indican diferencias entre los peces anestesiados y no anestesiados en cada uno de los tiempos de muestreo.

Por otro lado, los resultados nos indican claramente que la permanencia de los rodaballos en la situación de agua:hielo no alteró de una manera importante los niveles de cortisol. Los niveles detectados en los animales control (situación basal) fueron bajos, acordes a los publicados para esta especie que parece ser poco sensible al estrés de manipulación. En los peces no anestesiados, solo se observó un ligero aumento de los niveles de cortisol en los peces pequeños que provenían de agua a 18°C y que permanecieron 60 min en hielo. Sin embargo, los valores de cortisol descendieron con el tiempo de permanencia en hielo en los animales de tamaño grande sin anestesiados, mientras que en situación de anestesia se produjo un ligero repunte de los valores de cortisol a los 60 min de permanencia en hielo. Al margen del efecto destacado que provocó el anestésico, en general los datos indican que esta especie posee una baja sensibilidad en la respuesta de estrés ante el cambio térmico y la posible hipoxia que supone mantener al pez sobre hielo durante algún tiempo.

## B) PARAMETROS SANGUÍNEOS

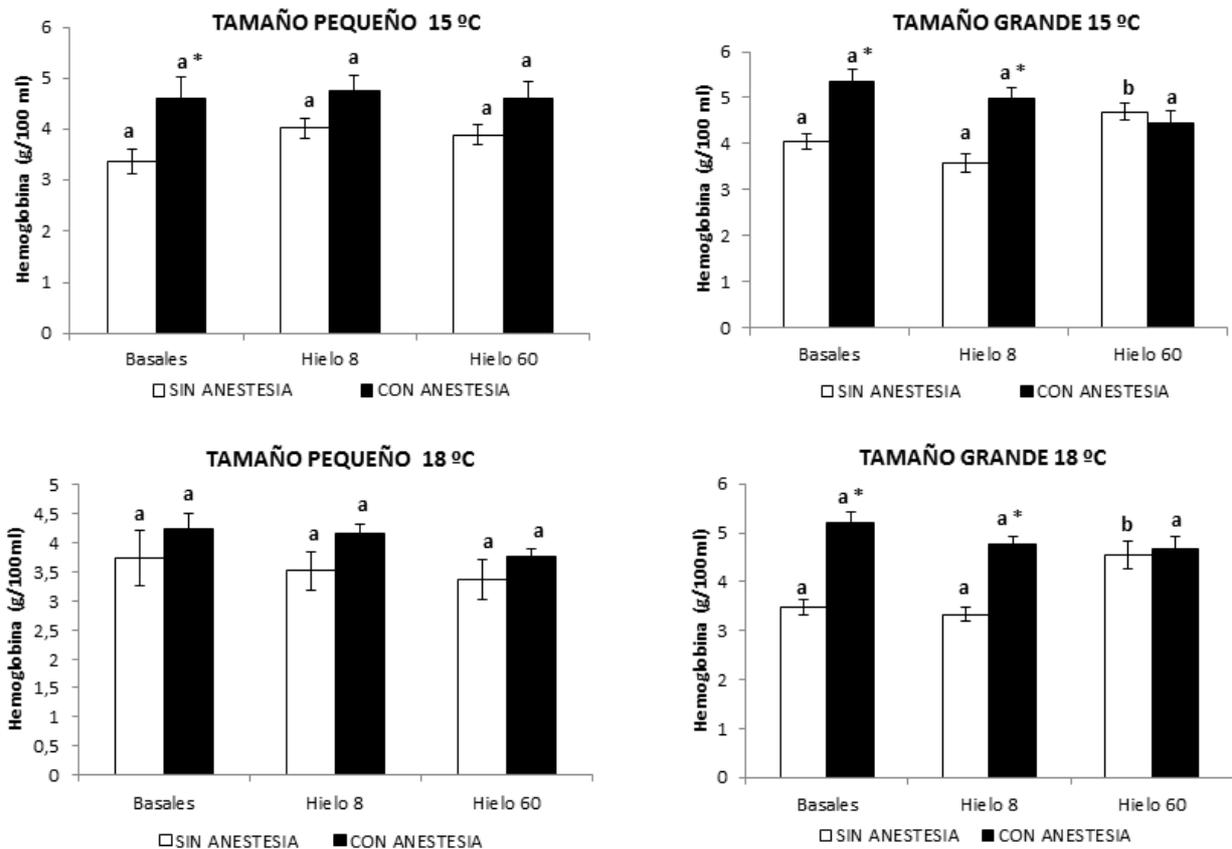
En la Figura 41 se muestran los resultados de hematocrito de los diferentes grupos de rodaballos bajo situación de anestesia y no anestesia.



**FIGURA 41. VALORES DE HEMATOCRITO.** Los datos corresponden a rodaballos (grupo pequeño: 500 g; grupo grande 1500 g) anestesiados y sin anestesiados sometidos a situación de agua:hielo durante 8 y 60 minutos. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de los grupos sin y con anestesia. Los asteriscos indican diferencias entre los peces anestesiados y no anestesiados en cada uno de los tiempos de muestreo.

Tal y como se puede observar, no se produjeron cambios destacables en el hematocrito durante el tiempo en que los peces permanecieron en hielo. No obstante, si se observó un aumento del hematocrito en algunos grupos de animales anestesiados en relación con los no anestesiados, especialmente en los peces que provenían de agua a 15 °C. No se observaron diferencias en el hematocrito debido al tamaño de los peces.

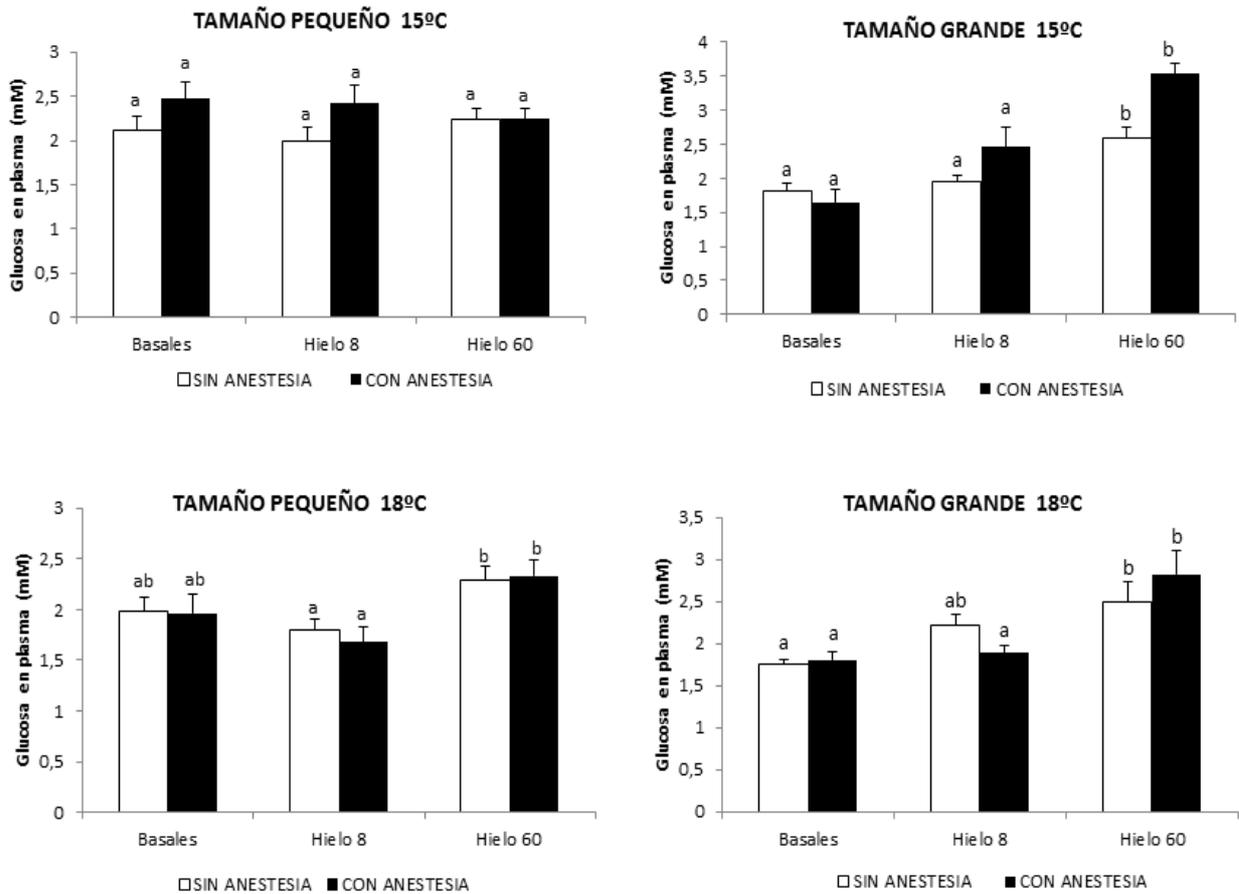
En la Figura 42 se muestran los valores de hemoglobina en los peces sometidos a situación de aturdimiento en hielo. Tal y como se observa, también en este parámetro se detectaron valores más elevados de hemoglobina en los peces que fueron anestesiados en comparación con aquellos que se pasaron a situación de agua:hielo sin anestesia previa, efecto éste que fue más notorio en los peces de tamaño grande. Dentro de estos grupos, los mayores cambios relativos al tiempo de permanencia en hielo se notaron en el grupo de peces de mayor tamaño que no fueron anestesiados, cuyos valores se incrementaron a los 60 minutos en relación a los tiempos previos. Este efecto no fue detectado en los peces de tamaño pequeño.



**FIGURA 42. NIVELES DE HEMOGLOBINA.** Los datos corresponden a rodaballos (grupo pequeño: 500 g; grupo grande 1500 g) anestesiados y sin anestesiarse sometidos a situación de agua:hielo durante 8 y 60 minutos. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de los grupos sin y con anestesia. Los asteriscos indican diferencias entre los peces anestesiados y no anestesiados en cada uno de los tiempos de muestreo.

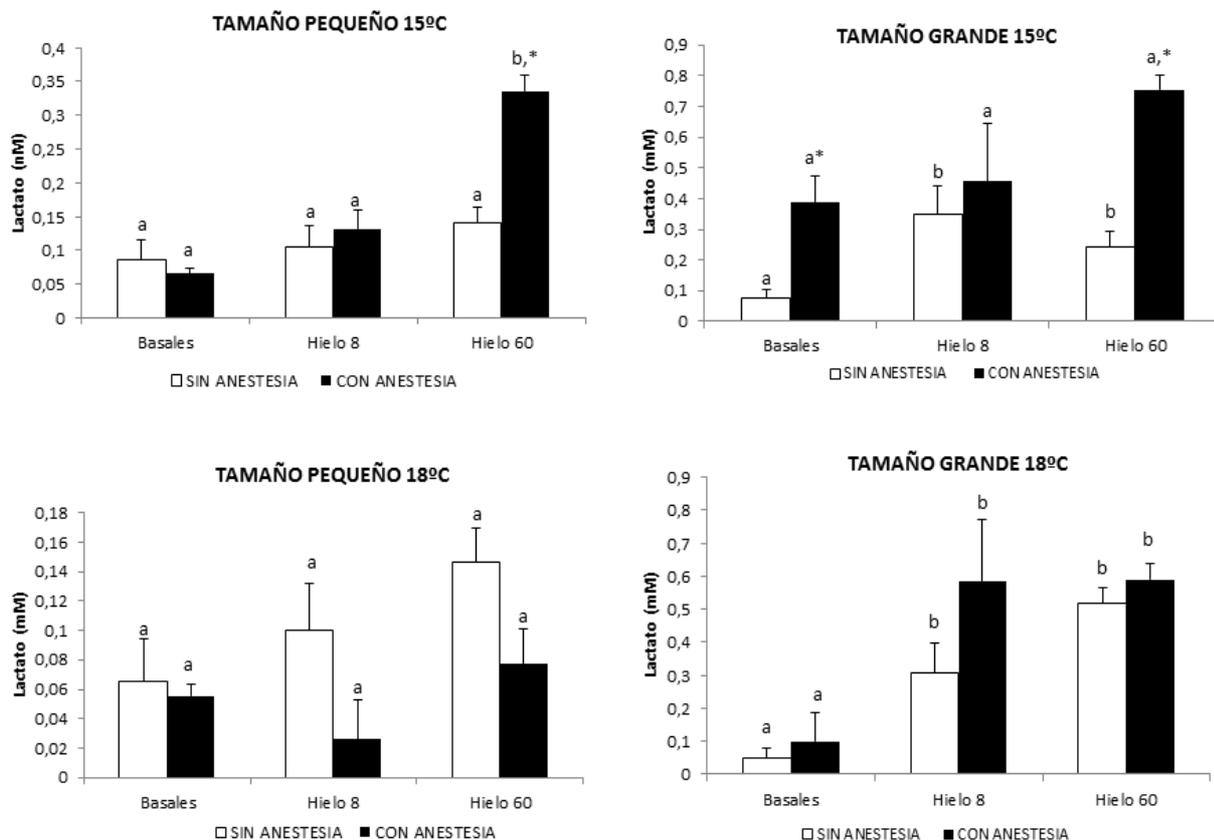
### C) PARAMETROS METABÓLICOS

En la Figura 43 se muestran los valores de glucosa plasmática. Se puede observar que en los peces de menor tamaño los efectos del tiempo de permanencia en hielo fueron reducidos y únicamente se halló un incremento significativo en los animales mantenidos a 18 °C y que permanecieron 60 min en hielo. En los peces de mayor tamaño, el efecto del hielo se observó tanto en los provenientes de agua a 15 °C (60 min) como de agua a 18°C. De manera similar que para el cortisol, los animales anestesiados presentaron una tendencia a niveles de glucosa en plasma más elevados que los no anestesiados, aunque este efecto solo fue significativo en algunos grupos de peces de tamaño grande.



**FIGURA 43. NIVELES DE GLUCOSA EN PLASMA.** Los datos corresponden a rodaballos (grupo pequeño: 500 g; grupo grande 1500 g) anestesiados y sin anestesiados sometidos a situación de agua:hielo durante 8 y 60 minutos. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de los grupos sin y con anestesia. Los asteriscos indican diferencias entre los peces anestesiados y no anestesiados en cada uno de los tiempos de muestreo

Con respecto a los valores de lactato en plasma (Figura 44), se observó un claro efecto estimulador del anestésico, especialmente en los peces de ambos tamaños provenientes de agua a 15 °C. Con respecto al método de aturdimiento en hielo, se produjo un aumento significativo en los niveles de lactato de los peces de tamaño grande, tanto a los 8 min como a los 60 min de permanencia en hielo. En los peces de tamaño menor, se puede observar una clara tendencia en el mismo sentido, pero no se detectaron cambios significativos en los animales no anestesiados y solo un incremento a los 60 min en los peces previamente anestesiados.



**FIGURA 44. NIVELES DE LACTATO EN PLASMA.** Los datos corresponden a rodaballos (grupo pequeño: 500 g; grupo grande 1500 g) anestesiados y sin anestesiar sometidos a situación de agua:hielo durante 8 y 60 minutos. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de los grupos sin y con anestesia. Los asteriscos indican diferencias entre los peces anestesiados y no anestesiados en cada uno de los tiempos de muestreo.

#### D) CALIDAD DE LA CARNE

Tal y como se mencionó previamente, se enviaron muestras a la empresa ANFACO (Vigo) a fin de realizar los análisis correspondientes, incluyendo la determinación de nitrógeno básico volátil total (NBVT), análisis sensorial, análisis colorimétrico y análisis de la textura del producto. Estos análisis ya han sido completados, aunque los datos todavía no han podido ser ordenados debidamente por lo que no se incluyen en el presente informe.

#### COMENTARIOS GENERALES Y CONCLUSIONES ACTIVIDAD 1

En los experimentos incluidos en la actividad 2.3.1.1 hemos utilizado rodaballos de 2 tamaños diferentes, que se relacionan con los tipos que frecuentemente se usan a nivel comercial en esta especie. Además, hemos evaluado el sacrificio en peces aclimatados a dos temperaturas del agua diferentes (15 y 18 °C), que se relacionarían con la temperatura del agua en dos momentos estacionales (invierno y verano), a fin de comprobar como este factor puede afectar a parámetros de sacrificio y de calidad de la carne

### Efecto de la temperatura de la mezcla agua:hielo y del tiempo de permanencia en el grado de aturdimiento y en la recuperación de los rodaballos.

A lo largo de un primer experimento se ha procedido a evaluar las condiciones actuales de sacrificio, consistentes en aturdir los peces mediante mantenimiento en una mezcla agua:hielo a baja temperatura. Por ello se han desarrollado 3 experimentos diferentes que han aportado información valiosa de la influencia de la temperatura del agua en el tiempo de aturdimiento de los animales y, adicionalmente, del tiempo de permanencia del hielo sobre el grado de aturdimiento de los peces y su capacidad de recuperación. En relación con la temperatura de la mezcla agua:hielo, se ha constatado que existe una relación entre el valor de esta variable y el tiempo de aturdimiento de los animales, de forma que aquellos mantenidos en agua:hielo a 2°C tardan más del doble de tiempo en aturdirse que los que permanecen en hielo a 0°C ó -1°C. Como esperábamos, el tiempo de recuperación de los animales mantenidos en esta situación se correlaciona inversamente con la temperatura de la mezcla agua:hielo.

Por otro lado, los resultados relativos al efecto de tiempo de permanencia en la mezcla agua:hielo nos indican el cese de la actividad motora y de la respuesta a estímulos entre los 15 y 25 minutos de situar los peces en esta situación. Por tanto, podemos considerar que a partir de este tiempo los peces están en una situación de aturdimiento similar a la de la inconsciencia, aunque pueden recuperar su plena actividad si son devueltos a agua normal. Sin embargo, resultó llamativo el hecho de que incluso pasado un largo tiempo (120 min) en la mezcla agua:hielo, los peces son capaces a recuperarse si se trasladan a agua de temperatura normal, es decir que mantienen intacta su capacidad vital. Este hecho nos hace sospechar que el método actual de sacrificio en hielo es eficaz para aturdir los peces, pero carece de rigurosidad a la hora de estimar la muerte del pez. Por tanto, creemos que este punto debe ser evaluado más detalladamente en experimentos posteriores.

### Determinación de niveles basales. Efecto de la captura y de la permanencia en hielo sobre diferentes parámetros de la respuesta a estrés y sobre la calidad de la carne.

A lo largo del año 2012 se han llevado a cabo los análisis del último experimento realizado en el año anterior, cuyo objetivo era definir si el método de aturdimiento en hielo (incluyendo la captura de los animales y el posterior tiempo de permanencia en la mezcla agua:hielo) tenía repercusiones graves desde el punto de vista del bienestar animal. Para ello se incluyeron en el experimento rodaballos de dos tamaños comerciales (500 g y 1500 g) aclimatados a dos temperatura diferentes del agua (15 °C y 18 °C) y se monitorizaron parámetros bioquímicos y hormonales relacionados con la respuesta a estrés. El experimento se realizó en paralelo sobre grupos de peces anestesiados y no anestesiados, a fin de descartar posibles interacciones del estrés de manipulación y captura de los ejemplares con el estrés que pudiese inducir la permanencia en hielo.

Los resultados obtenidos en rodaballos no anestesiados nos indicaron que el método seguido de aturdimiento en agua:hielo (aprox. 0°C) no conlleva una activación fuerte de la respuesta fisiológica de estrés, que incluye la secreción de cortisol desde el tejido interrenal. La ausencia de aumento de esta hormona en plasma, junto con los mínimos cambios detectados en parámetros sanguíneos tales como el hematocrito y el contenido de hemoglobina y la concentración de glucosa, nos permiten descartar tal activación. Incluso cabe destacar que en situación de permanencia en hielo los niveles de cortisol tendieron a descender lo que podría deberse a una ralentización de la esteroidogénesis interrenal o una menor activación del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal debido al bajo nivel metabólico que inducen esas temperaturas del agua en los peces. Por otro lado, se detectó un aumento de los niveles de lactato en plasma que podría ser originado por una activación de rutas metabólicas anaerobias derivadas de una situación de hipoxia. Dicha situación es probable que ocurra en el método de aturdimiento en hielo y probablemente sea la principal causante de alteraciones del metabolismo del pez.

Bajo situación de anestesia previa al aturdimiento en hielo se detectaron en todos los peces elevados niveles de cortisol, hematocrito, concentración de hemoglobina en plasma y, en menor medida, de la concentración de glucosa y lactato en plasma. Este hecho nos hace pensar que el anestésico indujo un efecto de estrés en los rodaballos con incremento de la secreción de cortisol y presumiblemente de catecolaminas, como principales mediadores de dicha respuesta de estrés. Por tanto, bajo esta situación de anestesia no parece ser adecuado hacer estimas del método de aturdimiento en hielo debido a la interferencia probable que tiene el anestésico con la respuesta de estrés.

En resumen, estos resultados apoyan que el método del aturdimiento en hielo no parece comprometer gravemente el bienestar de los rodaballos, al menos durante el periodo de tiempo ensayado (primeros 60 minutos) de permanencia en hielo. Teniendo en cuenta que previamente habíamos estimado que los rodaballos mantenidos sobre hielo tardan entre 15-25 minutos en entrar en un periodo de inconsciencia (ausencia de respuesta sensorial a estímulos), es previsible que en esta fase inicial se produzca una cierta activación de la respuesta de estrés, pero ello no parece tener consecuencias importantes sobre los principales indicadores fisiológicos de dicha respuesta.

El análisis de los diferentes parámetros bioquímicos y hormonales relacionados con la respuesta de estrés se está llevando a cabo en estos momentos. A modo preliminar se muestran a continuación los resultados obtenidos para los niveles de cortisol en plasma de peces de los dos tamaños y temperaturas, sometidos a aturdimiento con agua:hielo. Se ensayaron dos condiciones de los animales: sin anestesia previa y tras anestesia de los peces con aceite de clavo. Tal y como se observa en las figuras, encontramos un fuerte efecto del anestésico sobre los niveles de cortisol, incrementando ya los valores basales (previos al enfriamiento) de la hormona e incluso incrementándolos a medida que el pez permaneció en hielo. Este efecto fue independiente de la talla de los peces y de la temperatura de partida.

Por otro lado, los resultados nos indican claramente que la permanencia de los rodaballos en la situación de agua:hielo no altera los niveles de cortisol. Además, los bajos niveles que se observaron en los animales control (situación basal) nos indica que estamos ante una especie muy poco sensible al estrés de manipulación, lo que concuerda con una baja sensibilidad en la respuesta de estrés ante el cambio térmico que supone mantener al pez a 0°C durante algún tiempo.

#### ***2.4.1. ACTIVIDAD 2. Optimización del método de aturdimiento en hielo. Comparación del efecto del cambio brusco de temperatura del agua (mezcla agua:hielo) con el que produce un cambio gradual de temperatura del agua sobre la respuesta al estrés y el bienestar en rodaballo.***

Dado que el objetivo prioritario es optimizar el método de sacrificio en hielo y teniendo en cuenta la baja respuesta de estrés del rodaballo al tiempo de permanencia en hielo, hemos considerado que debíamos centrarnos en este aspecto a la hora de hacer los planteamientos experimentales. Para ello se estudió si el tiempo de bajada de temperatura puede afectar a la respuesta fisiológica del rodaballo, a fin de tratar de optimizar la situación de permanencia en agua:hielo y ver cómo se puede reducir el efecto del shock térmico sobre el bienestar del pez.

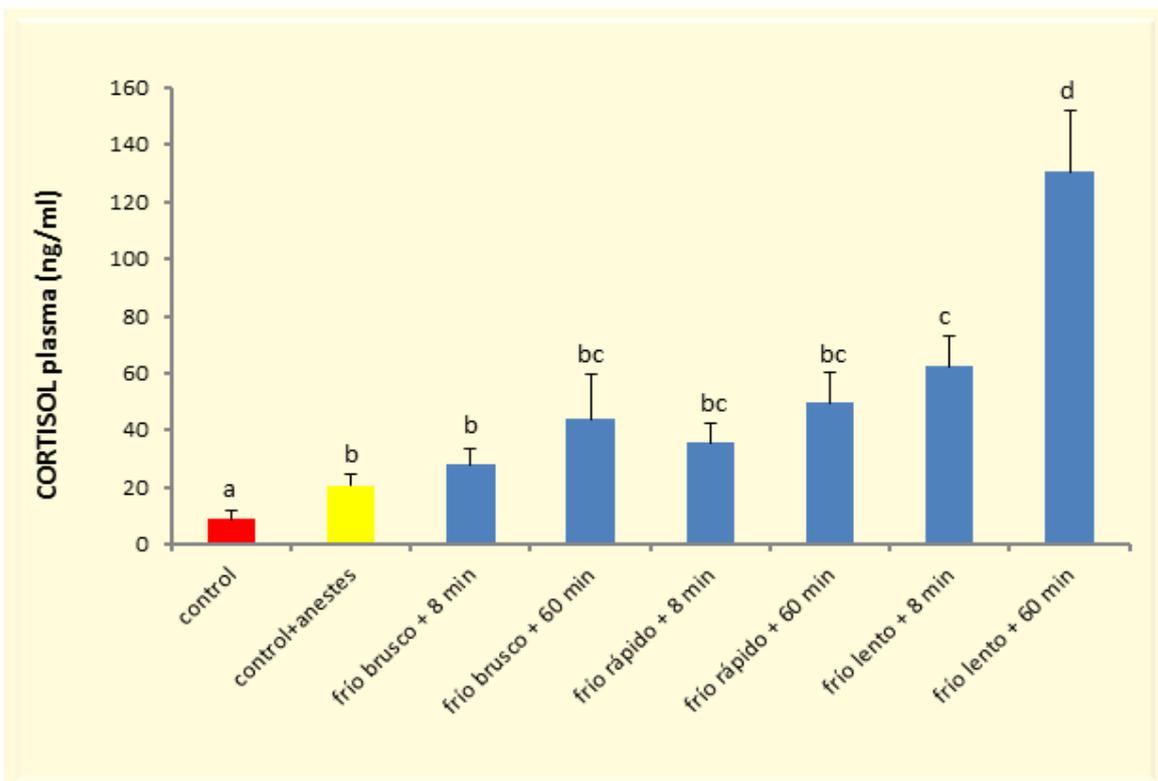
No se detectaron diferencias en los parámetros de hematocrito y concentración de hemoglobina en sangre entre los tres procedimientos de enfriado del agua, por lo que dichos datos no se muestran en gráficas.

En la Figura 45 se muestran los valores plasmáticos de cortisol en todos los grupos de peces de este experimento. Con respecto a los niveles basales, se observa que el anestésico indujo un ligero aumento en los valores de esta hormona, lo que concuerda con los datos de experimentos anteriores. No obstante dicho aumento fue de menor entidad que el observado previamente, lo que podría ser debido al uso de un anestésico diferente (2-fenoxietanol) y al hecho de extremar las precauciones a la hora de llevar a cabo el

proceso de manejo de los peces, evitando en todo momento la captura de los mismos y/o su trasvase otros tanques para su anestesia.

En relación con el efecto de los diferentes tipos de enfriamiento (brusco, gradual-rápido y gradual-lento) a los que se sometieron los peces, se observa que tanto el enfriado brusco (10 minutos hasta alcanzar la temperatura final) como el rápido (30 minutos hasta alcanzar la temperatura final) produjeron efectos estimulatorios similares de los niveles de cortisol en plasma. Sin embargo, en los peces que se enfriaron de forma lenta (120 minutos hasta temperatura final), el incremento de los niveles de cortisol fue mucho mayor alcanzándose valores 10 veces superiores a los de los peces utilizados como control.

En los grupos de enfriamiento lento resultan especialmente llamativos los datos de los peces muestreados pasados 60 minutos tras alcanzarse la temperatura de cero grados en la mezcla agua:hielo, dado que éstos mostraron niveles de cortisol que doblaron a los que permanecieron solo 8 minutos en hielo.



**FIGURA 45. NIVELES DE CORTISOL EN PLASMA.** Los datos corresponden a rodaballos (~100 g) sometidos a diferentes condiciones de enfriamiento en agua:hielo y muestreados a los 8 y 60 minutos tras alcanzarse la situación de temperatura final (0 °C). Los niveles basales se establecieron mediante el uso de dos grupos de peces: sin anestesia y con anestesia. Estadística: letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de peces.

En la Figura 46 se muestran los niveles de glucosa y lactato en plasma sanguíneo. Con respecto a la glucosa circulante, se hallaron cambios muy similares en los tres procedimientos de enfriado. Así, tanto en el caso del enfriado brusco como en los de enfriado rápido y lento, se halló un aumento de los niveles de este metabolito a los 8 minutos tras alcanzarse la temperatura final (0-1 °C) en la mezcla agua:hielo. A los 60 minutos este efecto de incremento en los niveles de glucosa sanguínea fue todavía mayor.

Con respecto al lactato los resultados fueron más dispares que para la glucosa. Así, en los grupos muestreados a los 8 minutos de permanencia en hielo (en cualquiera de las condiciones de enfriado) los niveles de este metabolito fueron menores que en el grupo control, mientras que a los 60 minutos se halló un aumento en el grupo de enfriado brusco y no hubo cambios en los de enfriado gradual rápido y lento.

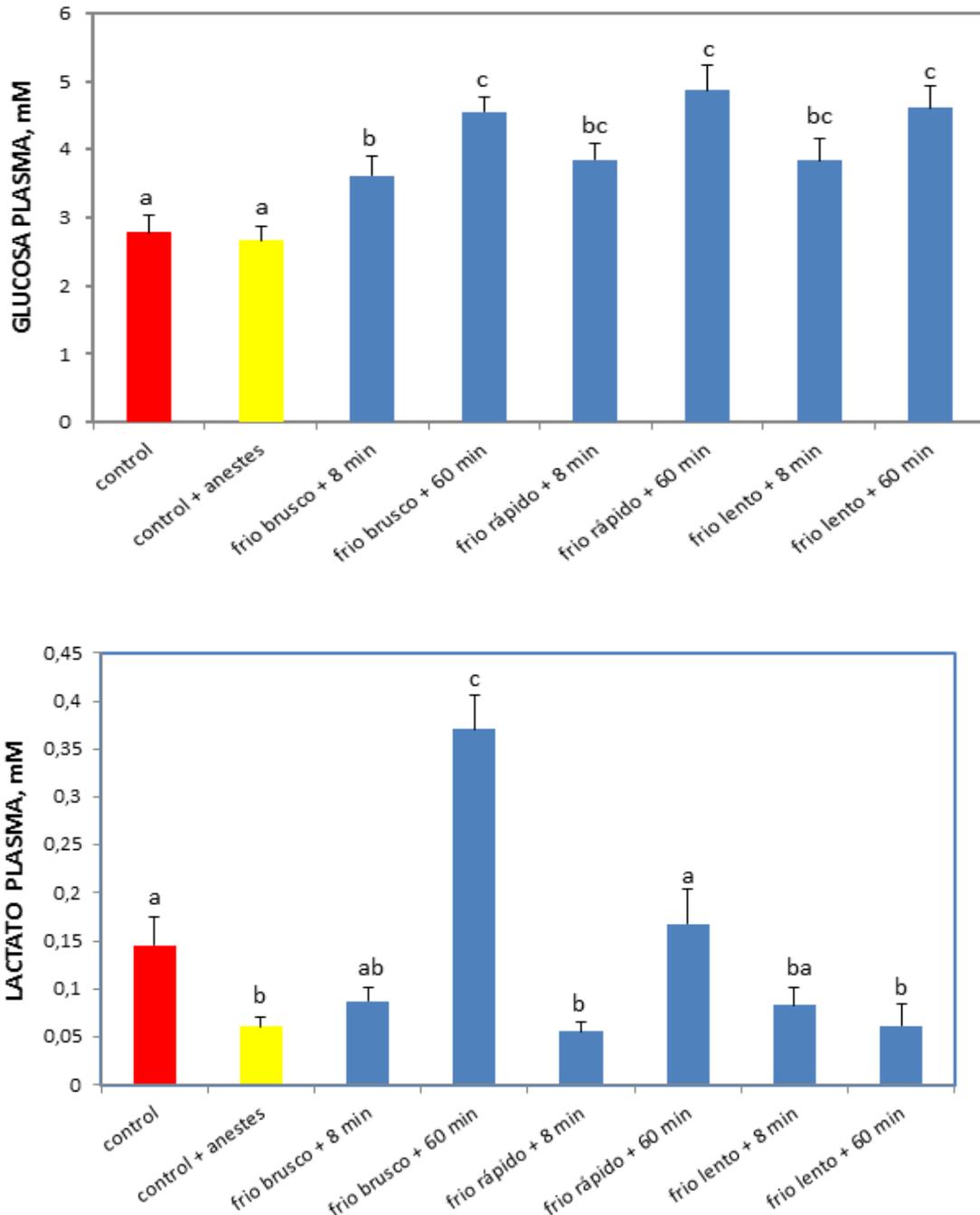
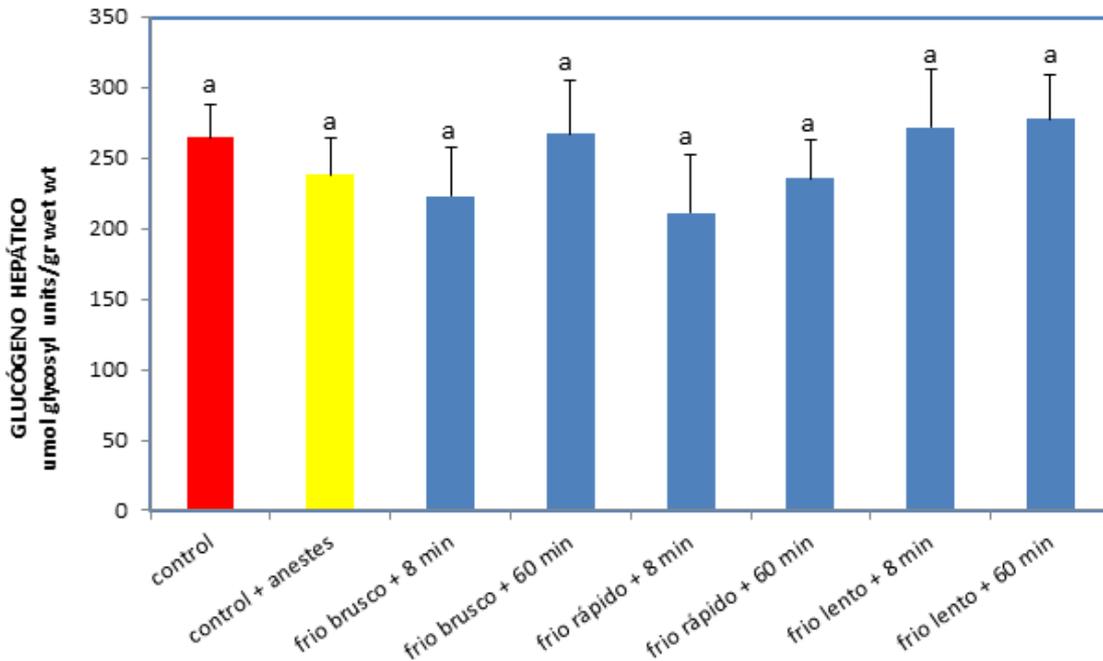


FIGURA 46. NIVELES DE GLUCOSA Y DE LACTATO EN PLASMA. Los datos corresponden a rodaballos (~100 g) sometidos a diferentes condiciones de enfriamiento en agua:hielo y muestreados a los 8 y 60 minutos tras alcanzarse la situación de temperatura final (0 °C). Los niveles basales se

establecieron mediante el uso de dos grupos de peces: sin anestesia y con anestesia. Estadística: letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de peces.

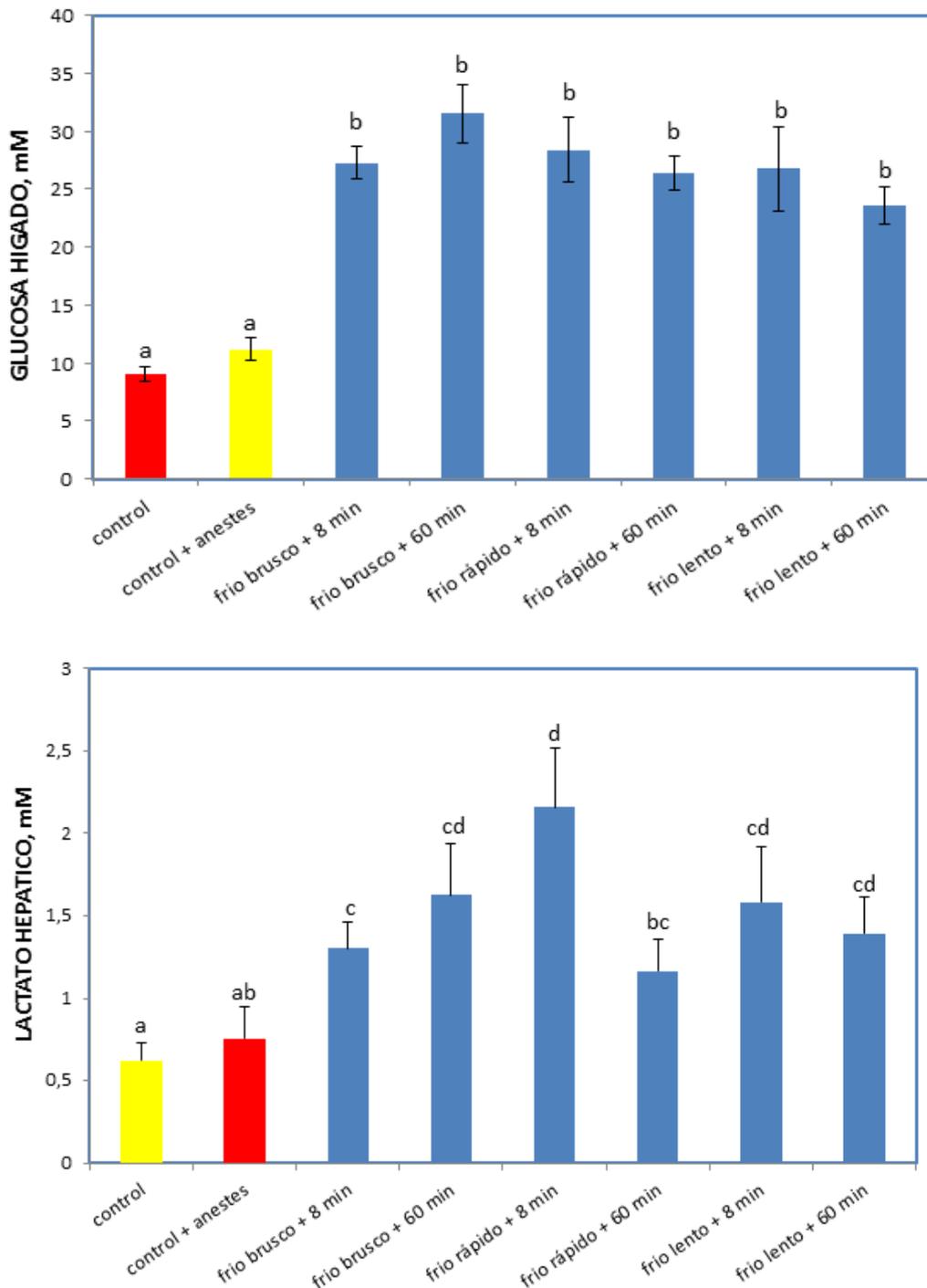
A nivel hepático se cuantificaron los niveles de glucógeno, glucosa y lactato. En lo que respecta al glucógeno, en la Figura 47 se puede observar que ninguno de los tratamientos aplicados afectó significativamente a los niveles de este metabolito.



**FIGURA 47. CONTENIDO DE GLUCÓGENO EN HÍGADO.** Los datos corresponden a rodaballos (~100 g) sometidos a diferentes condiciones de enfriamiento en agua:hielo y muestreados a los 8 y 60 minutos tras alcanzarse la situación de temperatura final (0 °C). Los niveles basales se establecieron mediante el uso de dos grupos de peces: sin anestesia y con anestesia. Estadística: letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de peces.

Por otro lado, en la Figura 48 se muestran los contenidos de glucosa y lactato a nivel hepático. En el caso de la glucosa, todos los tipos de enfriamiento aplicados (brusco, gradual-rápido y gradual-lento) resultaron en aumentos significativos de este metabolito a nivel hepático, sin diferencias entre los tratamientos.

Algo similar ocurrió con los niveles de lactato hepático que fueron más elevados en todos los grupos de peces mantenidos en frío que en los peces de los grupos control y control anestesiado. En ambos metabolitos (glucosa y lactato) destacan los elevados niveles detectados a los 8 minutos de permanencia en hielo, que ya fueron similares a los medidos tras 60 minutos de permanencia de los peces en dicha situación.



**FIGURA 48. CONTENIDO DE GLUCOSA Y LACTATO EN HÍGADO.** Los datos corresponden a rodaballos (~100 g) sometidos a diferentes condiciones de enfriamiento en agua:hielo y muestreados a los 8 y 60 minutos tras alcanzarse la situación de temperatura final (agua:hielo a 0-1 °C). Los niveles basales se establecieron mediante el uso de dos grupos de peces: sin anestesia y con anestesia. Estadística: letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de peces.

## COMENTARIOS GENERALES Y CONCLUSIONES ACTIVIDAD 2

En los experimentos incluidos en la actividad 2 hemos evaluado si el procedimiento de bajada de temperatura en el agua podría condicionar el bienestar de los peces y, en ese caso, elegir aquel que menos afectase a los diversos parámetros que nos permiten definir el grado de respuesta del animal ante una situación estresante. Por ello, se han comparado los cambios en parámetros relativos a la respuesta de estrés en tres situaciones de enfriado:

- tras una inmersión brusca de los rodaballos en la mezcla agua:hielo (bajada brusca de la temperatura del agua).
- tras un enfriamiento gradual de la temperatura del agua, de forma que se alcanzó la temperatura final deseada (0 °C) a los 30 minutos (grupo de descenso gradual rápido)
- tras un enfriamiento gradual en el que se alcanzó la temperatura final deseada (0 °C) a los 120 minutos (grupo de descenso gradual lento).

En todos los métodos de enfriamiento estudiados se observaron cambios hormonales y metabólicos indicativos de la existencia de estrés. Así, tanto los niveles de cortisol, glucosa y lactato en plasma, como el contenido de glucosa y lactato en hígado, aumentaron claramente en todos los sistemas de enfriado estudiados. Estos parámetros se asocian a la activación rápida del sistema simpático-tejido cromafín (liberación de catecolaminas) del ejes endocrino hipotálamo-hipófisis-tejido interrenal (liberación de cortisol). En relación con la posibilidad de estimar que procedimiento de los estudiados podría ser el menos perjudicial desde un punto de vista del bienestar, se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones:

-Niveles de cortisol. El aumento de los niveles hormonales fue mayor en el método de enfriado gradual lento en el cual la temperatura final se alcanzó añadiendo progresivamente hielo al agua durante dos horas. Bajo estas circunstancias la activación del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal parece ser más pronunciada, probablemente porque el animal es capaz a detectar más fácilmente los estímulos estresantes (descenso térmico progresivo, hipoxia, etc) y responder con una mayor secreción de cortisol. Dado que esta hormona es un buen marcador de estrés, los resultados sugieren que éste no parece ser el mejor método de aturdimiento. Por el contrario, el método de enfriado brusco puede ser más adecuado para reducir la capacidad del pez de activar la respuesta de estrés.

-Niveles de metabolitos. Los cambios en los niveles de glucosa fueron muy similares con cualquiera de los métodos de enfriamiento estudiados. Sin embargo, con el enfriado rápido los niveles de lactato circulantes aumentaron fuertemente, sobre todo cuando el animal permaneció 60 minutos sobre el hielo. Este efecto parece responder a un mayor grado de hipoxia en estos peces frente a lo que ocurre en un descenso gradual de la temperatura. No obstante, estos cambios a nivel metabólico deben ser considerados como de importancia secundaria a los observados en los niveles de cortisol.

En conclusión, los experimentos desarrollados hasta el presente momento avalan la eficacia del método de aturdimiento en hielo para esta especie dado que no parece tener grandes repercusiones desde el punto de vista del estrés y del bienestar animal. El hecho de que el enfriado rápido parezca ser menos gravoso en términos fisiológicos debe ser tenido en cuenta en los procedimientos de aturdimiento y sacrificio, dado que aunque los parámetros medidos no permitan excluir la existencia de un proceso de sufrimiento del pez ante estas situaciones, si nos ayudan a verificar el grado de alteración fisiológica producido en el animal. Además, desde un punto de vista de aplicabilidad en piscifactoría los resultados apoyan el uso de procedimientos de enfriado rápido, lo que también permite ahorrar costes en hielo y tiempo del proceso. No obstante, ha de tenerse en cuenta lo ya comentado en el informe del año anterior, cuando se señalaba que, aunque los peces mantenidos sobre hielo permanecen aturdidos largo tiempo, todavía pueden recuperar su actividad normal si se vuelven al agua de temperatura ambiente. Ello indica que deben realizarse estudios más precisos que permitan estimar el tiempo de muerte del pez, dado que un método eficaz sería aquel que minimice la situación de agonía del pez sin inducir fuertemente una respuesta de estrés.

## 2.5. CONCLUSIONES

**Se dedicará especial atención a la utilidad de los resultados para el sector acuícola.**

**NO se considera prudente traer conclusiones debidos a los cortes de fondos para llevar a cabo el proyecto a demás de su final abrupto. Se cree sin embargo que los resultados eran alentadores y de haber el proyecto llegado al final se hubiera valorado bién algunos de los métodos propuestos.**

## 2.6. VALORACIÓN

Los resultados que se obtuvieron indican que para dorada y lubina la tarea de optimización del sacrificio en agua muy fría no mejora significativamente el método y que la investigación debe ser orientada al uso de métodos alternativos. El uso de una mezcla de gases como N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> puede ser prometedor pero necesita un recorrido mas largo de experimentación y verificación en condiciones industriales. Sin embargo lo que se pudo apreciar en la tarea 1 indica que el trabajo que se lleva a cabo en condiciones comerciales en las granjas españolas está hecho con una excelente optimización del tiempo y permite que el pescado llegue al consumidor en condiciones óptimas.

En el caso del rodaballo, se ha constatado que el método de aturdimiento en hielo no induce una fuerte respuesta fuerte de estrés, por lo que puede ser un método adecuado. El traslado rápido de los peces a la situación de hielo parece ofrecer ventajas sobre un cambio gradual de temperatura, lo que debe ser tenido en cuenta para optimizar el método. Sin embargo, en esta especie este método no debe ser tomado como método de punto final, dado que los animales que permanecen en aturdimiento largo tiempo en hielo son susceptibles de recuperación si se vuelven a condiciones de agua normal. Por tanto, es necesario buscar una alternativa técnica para terminar con la vida de los animales una vez aturdidos por la bajada de temperatura.

## 2.7. DIFUSIÓN

A Roque, M Manchado, D Hernandez, R Gines, C Berbel, E Fatsini, M Aparicio, I Gairin and N Duncan 2013. STUNNING OF SEABREAM-PRELIMINARY RESULTS. A presentar en UFAW International Animal Welfare Science Symposium. Universitat Autònoma de Barcelona Barcelona, Spain 4-5th July 2013

JM Míguez, M. Conde-Sieira, M. López-Patiño, M. Gesto, M. Librán, J. Hernández, JL Soengas. Physiological responses during thermal shock in pre-slaughter procedures in turbot. International Congress of Comparative Endocrinology (ICCE). Barcelona, Spain 15-19th, 2013

## 2.8. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

### Tareas y objetivos que no se han podido llevar a cabo debido al recorte presupuestario de 2012 y a la no existencia de financiación en 2013.

#### Andalucía, Canarias, Cataluña y Murcia

- 1) Actividad a realizar: Análisis de parámetros bioquímicos y moleculares en cada tratamiento experimental de los objetivos 1, 2 y 3: No se hicieron los análisis de marcadores moleculares y bioquímicos para lubina en ningún experimento.
- 2) Actividad a realizar: Objetivo 3: Aplicación en condiciones reales de producción No se llevó a cabo este objetivo.
- 3) Los resultados del objetivo 2 son preliminares y necesitarían ser repetidos con mayor número de peces
- 4) Actividad a realizar: Análisis sensorial con un panel de jueces entrenado. No se llevó a cabo este análisis
- 5) Actividad a realizar: Análisis del deterioro durante el almacenamiento en hielo. No se llevó a cabo este análisis.
- 6) Actividad a realizar: Análisis financiero del sacrificio No se llevó a cabo este análisis.

#### Galicia

OBJETIVO 1 – ACTIVIDAD 1. Evaluación del método actual de aturdimiento y sacrificio en hielo en rodaballo. Tarea a realizar: Evolución del rigor mortis y definición de tiempo de muerte de los peces mantenidos en la mezcla agua:hielo.

En los experimentos realizados dentro de este objetivo, se ha constatado que los rodaballos sumergidos durante 2 horas en la mezcla agua:hielo recuperan sus constantes vitales si se trasladan a agua de temperatura normal. Por tanto, aunque el uso del método de hielo parece adecuado desde un punto de vista de bienestar para el aturdimiento de los peces, podría no ser adecuado como método de sacrificio.

Con el fin de clarificar esta situación, se han experimentos de análisis sensorial que den información sobre la evolución del rigor mortis y poder definir una situación de muerte del animal.

OBJETIVO 1 - ACTIVIDAD 2. Optimización del método de aturdimiento en hielo. Efecto del cambio gradual de temperatura sobre la respuesta de estrés y parámetros de bienestar Tarea a realizar: Análisis de parámetros nerviosos y moleculares ligados a los experimentos de la actividad 2.

Inicialmente se había previsto realizar el análisis de los niveles de neurotransmisores cerebrales (serotonina y catecolaminas) que se sabe que están implicados en el inicio de la respuesta de estrés. Asimismo, se había incluido el análisis de marcadores moleculares ligados a la situación de estrés por cambio térmico (CRF y proteínas de shock térmico).

De los experimentos llevados a cabo se han tomado las muestras necesarias (cerebro, hígado), restando por realizar los análisis de los parámetros antes indicados.

OBJETIVO 2. ACTIVIDAD. Evaluación del método de shock eléctrico como alternativa al de agua:hielo para aturdimiento y sacrificio de los rodaballos. Tarea a realizar: Estudio preliminar de las condiciones del sistema de shock eléctrico y evaluación inicial en la especie.

Se trataría de establecer las condiciones técnicas de electrocución según el sistema HUMAN Stunner Mark 2 (HS2) con aplicabilidad para esta especie. A lo largo de este año se había previsto realizar una validación del método con experimentos iniciales en rodaballo. Los parámetros a monitorizar implicarían:

- Parámetros indicativos de daño físico tras el shock eléctrico.
- Parámetros del comportamiento y respuesta sensorial tras el shock eléctrico.

- Parámetros relativos al grado de recuperación de los peces tras transferencia al agua normal.
- Evaluación del rigor mortis tras el traspaso de los peces electrocutados a hielo.

## 2.9. BIBLIOGRAFÍA

1. Bito M., Yamada K., Mikumo Y., Amano K. 1983. Studies on rigor mortis in fish: differences in the mode of rigor mortis among some varieties of fish by modified Cutting's methods. Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory 109, 89-96.
2. Ortuño J, Esteban MA, Meseguer J. Effects of phenoxyethanol on the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) exposed to crowding stress. Veterinary immunology and immunopathology. 2002;89(1-2):29-36. PubMed PMID: 12208048.
3. Ortuño J, Esteban MA, Meseguer J. Effects of four anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish & shellfish immunology. 2002; 12(1):49-59.