

MEJORA DEL PROCESO DE SACRIFICIO DE LOS
PECES DE CULTIVO: INDICADORES DE BIENESTAR
Y CALIDAD DEL PRODUCTO (WELLSTUN)

CONVOCATORIA 2021

INFORME FINAL
CIENTÍFICO-TÉCNICO Y ECONOMICO

AÑO 2023

/2023

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. DATOS ADMINISTRATIVOS.....	3
1.1. Título del proyecto	3
1.2. Entidades participantes.....	3
1.3. Coordinador técnico del proyecto	3
1.4. Periodo de ejecución.....	3
1.5. Ayuda concedida	3
2. DATOS ECONÓMICOS	3
3. MODIFICACIONES DEL PROYECTO	4
3.1. Modificación de las actividades	4
3.2. Cambios en el equipo de trabajo	4
3.3. Cambios en el presupuesto	4
3.4. Cambios en el cronograma de trabajo	5
4. SEGUIMIENTO TÉCNICO	5
4.1. Objetivos	5
4.2. Actividades	6
4.3. Adecuación al cronograma de trabajo	110
4.4. Seguimiento de indicadores de ejecución y evaluación del proyecto	110
4.5. Transferencia de resultados al sector	112
4.6. Actuaciones de difusión y publicidad de las ayudas	112
4.7. Valoración del coordinador sobre la ejecución del proyecto	113
4.8. Conclusiones.....	113

1. DATOS ADMINISTRATIVOS

1.1. Título del proyecto

MEJORA DEL PROCESO DE SACRIFICIO DE LOS PECES DE CULTIVO: INDICADORES DE BIENESTAR Y CALIDAD DEL PRODUCTO (WELLSTUN)

1.2. Entidades participantes

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)

Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas, M.P. (CSIC) - Institut Mediterràni d'Estudis Avançats (IMEDEA)

Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA)

Universidad Complutense de Madrid (UCM)

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC)

1.3. Coordinador técnico del proyecto

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)

Ana Roque

1.4. Periodo de ejecución

30 de Diciembre 2021 a 15 de Octubre 2023

1.5. Ayuda concedida

586.972,30 €

Quinientos ochenta seis mil novecientos setenta dos euros y treinta céntimos.

2. DATOS ECONÓMICOS

Indicar el presupuesto concedido en la resolución y el ejecutado hasta la fecha:

	2021	2022	2023
Presupuesto concedido	255.205,34 €	178.643,75 €	153.123,21€
Presupuesto ejecutado			

3. MODIFICACIONES DEL PROYECTO¹

3.1. Modificación de las actividades

Indicar, en su caso, los cambios producidos en las actividades contempladas en la memoria científico-técnica y la justificación de estas modificaciones.

3.2. Cambios en el equipo de trabajo

El coordinador por parte del IMEDEA cambió. En lugar del Dr Miquel Palmer coordina actualmente el Dr Pablo Arechavala. El IMEDEA adjunta también a su equipo de trabajo a la Sra. Ester Hoyo Alvarez

En el Grupo de investigación de la Universidad Complutense de Madrid se van a incorporar en el grupo a una profesora nueva que se incorporó a la Universidad en Febrero de 2022 como Profesora Ayudante Doctor y alumnos de doctorado que en la actualidad están trabajando en el grupo de investigación y que colaborarán en la toma de datos y análisis laboratoriales:

- Prof^a. Dra: Almudena Cabezas Albeniz

Alumnos doctorando:

- Montserrat Fernández-Muela Garrote (Licenciada en Veterinaria)

- Andrea Martínez Villabal (Graduada en Veterinaria)

- Álvaro de la Llave Propín (Graduado en Ingeniería y Ciencia Agronómica)

- Roberto González Garoz (Graduado en Veterinaria)

3.3. Cambios en el presupuesto

Indicar, en su caso, los cambios realizados y aprobados por el Órgano Instructor, respecto a la Resolución de aprobación. Se adjuntará el nuevo presupuesto aprobado.

ENTIDAD PARTICIPANTE	2021		2022		2023		TOTAL
	SUB	C.I.	SUB	C.I.	SUB	C.I.	
IRTA	50.454,10 €	0,00 €	35.317,87 €	0,00 €	30.272,46 €	0,00 €	116.044,43 €
CSIC-IMEDEA	42.568,25 €	0,00 €	29.797,78 €	0,00 €	25.540,95 €	0,00 €	97.906,98 €
FCPCT-ULPGC	51.679,08 €	0,00 €	36.175,36 €	0,00 €	31.007,45 €	0,00 €	118.861,89 €
IMIDA	55.035,91 €	3.355,07 €	37.518,62 €	3.355,07 €	32.797,94 €	2.236,65 €	134.299,26 €
UCM	52.112,93 €	0,00 €	36.479,05 €	0,00 €	31.267,76 €	0,00 €	119.859,74 €
TOTALES	251.850,27 €	3.355,07 €	175.288,68 €	3.355,07 €	150.886,56 €	2.236,65 €	586.972,30 €
RESOLUCIÓN	255.205,34 €		178.643,75 €		153.123,21 €		586.972,30 €

ENTIDADES PARTICIPANTES	2021			2022			2023			TOTAL		
	INICIAL	RESOLUCIÓN	AJUSTE	INICIAL	RESOLUCIÓN	AJUSTE	INICIAL	RESOLUCIÓN	AJUSTE	INICIAL	RESOLUCIÓN	AJUSTE
IRTA	2.000,00	50.454,10	48.454,10	70.775,50	35.317,87	-35.457,63	43.575,50	30.272,46	-13.303,04	116.351,00	116.044,43	-306,57
CSIC-IMEDEA	0,00	42.568,25	42.568,25	82.111,46	29.797,78	-52.313,68	16.000,00	25.540,95	9.540,95	98.111,46	97.906,98	-204,48
FCPCT-ULPGC	2.500,00	51.679,08	49.179,08	55.343,66	36.175,36	-19.168,30	55.343,66	31.007,45	-24.336,21	113.187,32	118.861,89	5.674,57
IMIDA	1.500,00	58.390,98	56.890,98	79.933,40	40.873,69	-39.059,71	29.764,65	35.034,59	5.269,94	111.198,05	134.299,26	23.101,21
UCM	2.200,00	52.112,93	49.912,93	91.100,95	36.479,05	-54.621,90	36.069,95	31.267,76	-4.802,19	129.370,90	119.859,74	-9.511,16
TOTAL	8.200,00	255.205,34	247.005,34	379.264,97	178.643,75	-200.621,22	180.753,76	153.123,21	-27.630,55	586.218,73	586.972,30	18.753,57
		255.205,34		178.643,75			153.123,21			586.972,30		

¹ Las modificaciones técnicas o económicas del proyecto deberán haber sido aprobadas por el órgano instructor (punto 6 del apartado décimo tercero de la orden de convocatoria).

En el grupo de investigación de la Universidad Complutense de Madrid no ha habido ninguna modificación en relación con el presupuesto concedido.

3.4. Cambios en el cronograma de trabajo

Indicar, en su caso, las prórrogas del proyecto autorizadas por el órgano instructor y/o los cambios producidos en la distribución temporal de las actividades que no supongan una ampliación del periodo de ejecución.

Aunque el plano de trabajo no se alteró se empezó las actividades con los experimentos de verano (**WP1**) ya que con la fecha de aprobación del proyecto no fue posible iniciar el proyecto con experimentos de invierno como estaba previsto.

En relación con al cronograma de trabajo en el grupo de la Universidad Complutense se ha modificado el orden de las pruebas. Se iba a comenzar con la prueba de invierno en el año 2022, como consecuencia de los problemas de gestión económica del proyecto la pruebas de invierno previstas para el comienzo del año 2022 se han pospuesto para comienzos del año 2023, lo que se han desarrollado son las pruebas de verano de 2022, realizando la **Tarea 1.3**, Determinación de la respuesta de estrés y calidad de la carne de truchas arcoíris sometidas a dos tipos de agrupamiento para el despesque, reducción del volumen de agua o reducción de espacio en el estanque de engorde y dos duraciones de hacinamiento en verano, y la **Tarea 1.4**, Determinación de la respuesta de estrés y calidad de la carne de truchas arcoíris sometidas a tres tiempos de ayuno pre-sacrificio (24 horas, 5 días o 10 días) en verano. Las tareas 1.3 y 1.4 de temperatura del agua baja de invierno, se realizarán en diciembre-enero donde se llevará a cabo también la Tarea 3.4 : Determinación de la respuesta de estrés y calidad de la carne de truchas arcoíris sometidas a dos tipos de aturdimiento, eléctrico o hielo en invierno, de esa forma se completarán las tareas 1.3 y 1.4. A partir de esta información procederemos a realizar pruebas en piscifactorías de trucha arcoíris, para validar y verificar los resultados a nivel de explotaciones acuícolas y comprobar que los resultados obtenidos son aplicables a nivel de explotación y permite una mejora del bienestar de las truchas.

4. SEGUIMIENTO TÉCNICO

4.1. Objetivos

Indicar el grado de consecución, de cada uno de los objetivos (generales y específicos) contemplados en la memoria científico técnica presentada, mediante la siguiente tabla resumen:

OBJETIVOS	% CONSECUCIÓN OBJETIVOS
Objetivo 1 Evaluar el efecto de los procedimientos pre-cosecha que son importantes a nivel comercial en el bienestar y calidad del pescado.	100%

Objetivo 2 Proponer y validar indicadores del estado de consciencia y muerte para desarrollar un buen protocolo de aturdimiento y una confirmación robusta de la muerte.	100%
Objetivo 3 Llevar a cabo una evaluación a escala piloto de un proceso de sacrificio donde se comprueben las mejores condiciones de pre-sacrificio y se evalúen los indicadores de consciencia y confirmación de la muerte.	100%
Objetivo 4 Promover la formación, capacitación, disseminación y transferencia de conocimientos de las conclusiones y aspectos aplicados del proyecto, en especial para jóvenes investigadores y personal técnico de la industria acuícola española.	100%
TOTAL	

4.2. Actividades

Indicar el estado de ejecución de cada una de las actividades contempladas en el proyecto a través de la siguiente tabla resumen:

ACTIVIDADES	ESTADO DE EJECUCIÓN			% EJECUCIÓN
	NO INICIADA	EN DESARROLLO	FINALIZADA	
Actividad 1.1 Período de hacinamiento pre-sacrificio			x	100
Actividad 1.2 Período de ayuno pre-sacrificio			x	100
Actividad 1.3 Determinación de la respuesta de estrés y calidad de la carne de truchas arcoíris sometidas a dos tipos de agrupamiento para el despesque, reducción del volumen de agua o reducción de espacio en el estanque de engorde y dos duraciones de hacinamiento, comparando invierno y verano.			x	100
Actividad 1.4 Determinación de la respuesta de estrés y calidad de la carne de truchas arcoíris sometidas a tres tiempos de ayuno pre-sacrificio (24 horas, 5 días o 10 días), comparando invierno y verano.			x	100

Actividad 2.1 Validación de parámetros comportamentales			x	100
Actividad 2.2 Caracterización del perfil electroencefalográfico de peces conscientes/inconscientes y muertos con el fin de validar los indicadores comportamentales.			x	100
Actividad 3.1 Aturdimiento de lubina en fases combinando bajas temperaturas con concentraciones creciente de CO ₂ .			x	100
Actividad 3.2 Aturdimiento de lubina mediante electrocución			x	100
Actividad 3.3 Validación a escala comercial				100
Actividad 3.4 Determinación de la respuesta de estrés y calidad de la carne de truchas arcoíris sometidas a dos tipos de aturdimiento, eléctrico o hielo, comparando invierno y verano			X	100
Actividad 4.1 Comunicación			X	100
Actividad 4.2 Formación y transferencia de tecnología			x	100
Actividad 4.3 Diseminación de resultados dentro del sector científico			x	100
Actividad 5.1 Coordinación, reuniones de proyectos e informes			x	100
Actividad 5.2 Organización de la reunión inicial de lanzamiento (Kick-off), de las reuniones periódicas y de la reunión final			X	100
Actividad 5.3 Seguimiento de los protocolos de ética en			X	100

experimentación con animales vivos.				
Actividad 5.4 Plan de contingencia			x	100
TOTAL				100

Actividad 1.1 Período de hacinamiento pre-sacrificio

- *Entidades participantes:* IRTA, IMIDA, IMEDEA, ULPCG
- *Presupuesto inicial y Presupuesto ejecutado*
 - Se ha ejecutado el 100% del presupuesto asignado a esa actividad ya que se ha adquirido todo lo requerido para completar esta actividad, aunque parte de ella, la correspondiente a los experimentos de invierno, todavía no se ha desarrollado.
- *Descripción de las tareas y trabajos realizados:*

En esta tarea se llevó a cabo el experimento propuesto para verano siguiendo el diseño experimental del proyecto. El hacinamiento se hizo a una densidad de 118 kg m⁻³. En este experimento se han considerado cinco periodos diferentes de hacinamiento, a 0, 30, 60, 120 y 180 minutos, sacrificándose en cada uno 12 lubinas, 6 con el método “iki-jime” y otras 6 por inmersión en agua más hielo. Se tomaron muestras de sangre, actividad muscular y cardiaca, tejidos para expresión genética asociada al estrés del sacrificio y para calidad de la carne y tiempo de vida útil. Estas muestras están en proceso de ser analizadas. También se han determinado los efectos sobre el metabolismo del músculo según cada uno de los tratamientos combinados de hacinamiento y sacrificio a las 24 horas de llevarse éste a cabo.

En el segundo experimento se han considerado sólo tres periodos de hacinamiento, a 0, 30 y 60 minutos, sacrificándose 32 lubinas por cada hacinamiento, 16 mediante exceso de anestésico y otras 16 por inmersión en agua más hielo. En este experimento, reduciendo los periodos de hacinamiento, se han determinado los efectos durante la conservación en hielo, tomando muestras a las 0, 12, 24 y 48 horas tras el sacrificio.

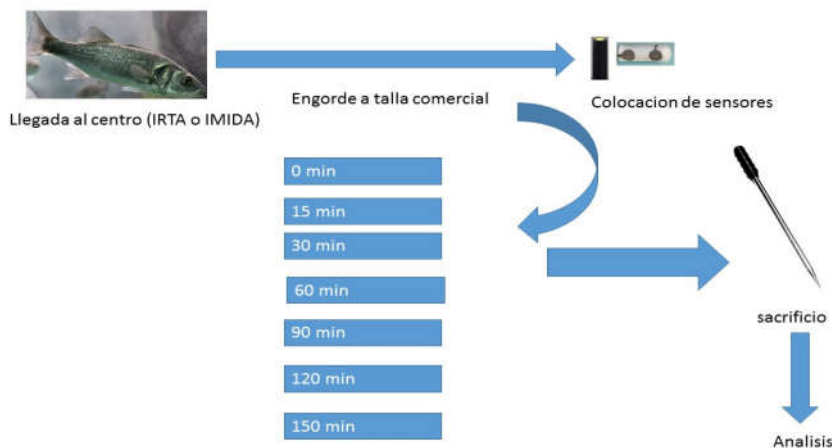


Figura 1.1

A cada uno de los 60 peces del primer experimento y los 96 del segundo se les han tomado dos muestras de tejido muscular, una destinada a realizar el análisis ultraestructural de los miocitos y morfología de las mitocondrias mediante barrido de microscopía electrónica, y la otra para dos abordajes diferentes: por un lado histología convencional con hematoxilina eosina e histoquímica mediante Periodic acid shiff (PAS) para determinar el grado de agotamiento muscular de las reservas energéticas, y por otro mediante técnicas de inmunohistoquímica para evaluar la presencia de proteínas indicadoras de estrés que tienen que ver con los procesos de deterioro post-mortem y la vida útil durante el almacenamiento en hielo.

También se ha procesado una pieza de músculo de cada lubina para determinar el valor-K, analizando el contenido en ATP del músculo así como la acumulación de los metabolitos de su degradación.

- *Subcontrataciones*

En esta tarea se subcontrató, pero tal como aparece en la memoria, la UAB para análisis de biología molecular

- *Resultados obtenidos*

Los individuos utilizados para este experimento presentaron una longitud estándar media (SL \pm SD) de $32,48 \pm 3,25$ cm, longitud total media (TL \pm SD) de $36,73 \pm 3,25$ cm y un peso húmedo medio (WW \pm SD) de $555,20 \pm 141,97$ g en verano y una longitud estándar media (SL \pm SD) de $26,47 \pm 2,24$ cm, longitud total media (TL \pm SD) de $29,65 \pm 2,45$ cm y un peso húmedo medio (WW \pm SD) de $360,81 \pm 90,73$ g en invierno. . La temperatura media del agua durante el periodo de experimentación fue de 28°C en verano y $9,5^{\circ}\text{C}$ en invierno.

En la Figura 1.2 se presentan los resultados de la frecuencia cardíaca media a lo largo de 180 minutos de hacinamiento. La

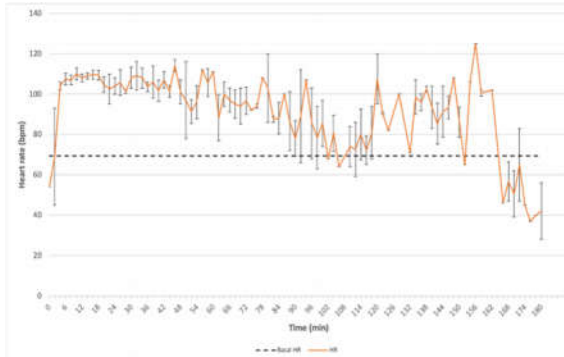
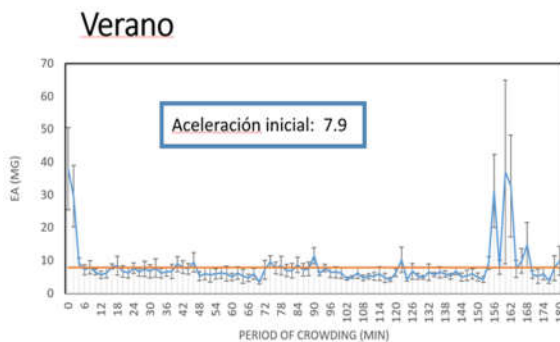


Figura 1.2

línea discontinua corresponde a la frecuencia cardíaca basal media de individuos control ($HR_{24h} = 69,89 \pm 1,60$ bpm; batidas por minuto). Se observan aumentos puntuales de la frecuencia cardíaca media que corresponden con las maniobras de hacinamiento. En el último tramo del experimento se observa una disminución de la frecuencia cardíaca

media, probablemente debida a la retirada de individuos para muestreo y, por lo tanto, a una disminución de la densidad de peces en el tanque y a una adaptación a la nueva situación.

Figura 1.3



Verano

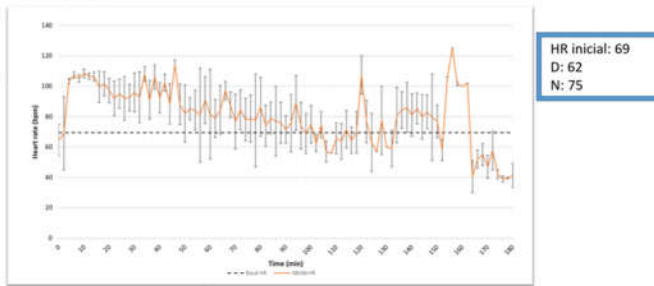


Figura 1.4

Invierno

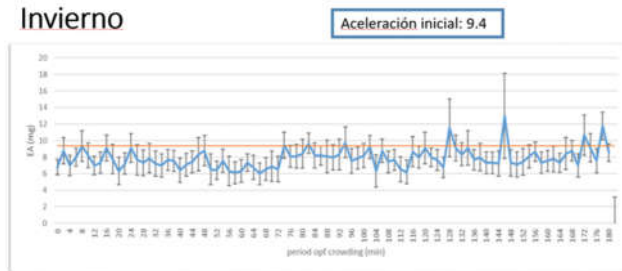


Figura 1.5

Verano

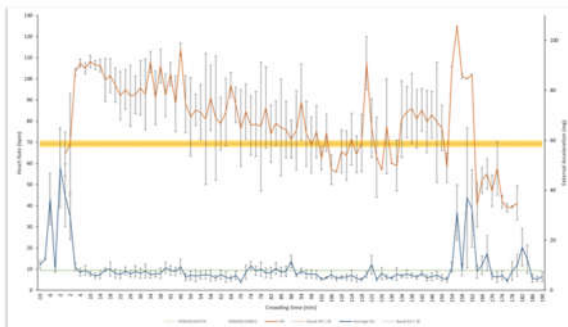


Figura 1.6

Invierno

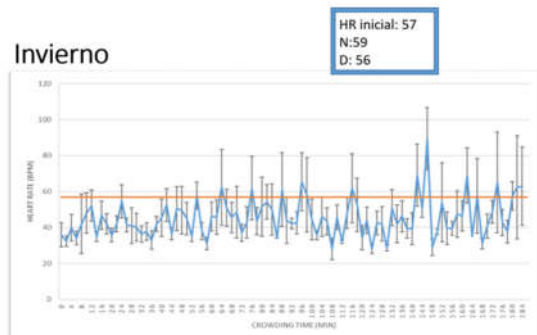


Figura 1.7

Invierno

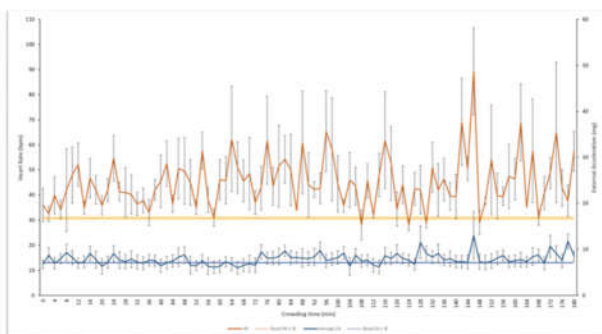


Figura 1.8

En la siguiente tabla (Figura 1.9) se muestran los resultados obtenidos para el valor K en función del tipo de sacrificio en los diferentes periodos de hacinamiento. No se encontraron diferencias significativas achacables al tipo de sacrificio. Si que las hubo entre tiempos de hacinamiento, alcanzándose los mayores valores a los 0 y 30 minutos, comparados con el resto, entre los que tampoco se detectaron diferencias significativas. Este indicador de textura parece verse únicamente afectado por un estrés agudo cercano al sacrificio, periodo durante el cual no se llegan a metabolizar los nucleótidos que contribuyen a aumentar su valor, la inosina y la hipoxantina. Figura 1.9. Valor K en función del tipo de sacrificio en los diferentes periodos de hacinamiento.

Periodo de hacinamiento	Sacrificio	Valor K
0min	Hielo	12,60±4,98 ^a
	Ikejime	13,57±4,14 ^a
30min	Hielo	11,76±2,21 ^a
	Ikejime	12,07±3,64 ^a
60min	Hielo	7,87±2,37 ^b
	Ikejime	8,26±3,64 ^b
120min	Hielo	5,85±1,20 ^b
	Ikejime	7,68±0,94 ^b
180min	Hielo	6,66±1,41 ^b
	Ikejime	4,70±0,81 ^b
<i>P-value</i>	Hacinamiento	0,000
	Sacrificio	0,684
	Hacina. x sacrif.	0,593

Diferentes letras denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$)

Figura 1.9

Los resultados a nivel muscular se presentan según las técnicas histoquímicas para evaluar integridad de las fibras (hematoxilina y eosina, H&E; hematoxilina ácida fosfotúngstica, PTAH; Gómori modificado); el contenido en glucógeno la técnica del PAS (Periodic Acid Schiff); cantidad y distribución de las proteínas contráctiles mediante

inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-actina y un marcador de daño o stress (HSP70).

Con la H&E, las fibras tipo II (músculo blanco) no se observaron diferencias morfológicas entre sacrificios en el tiempo de hacinamiento de 0 minutos, presentando una mayor separación de las fibras en el endomisio tras 180 minutos. En las fibras tipo I (músculo rojo) hubo un diferente patrón de fragmentación, con una mayor separación de las fibras en el endomisio en sacrificio mediante ikejime. Para los dos tipos de fibras y en ambos tiempos de hacinamiento, hubo una mayor presencia de eritrocitos perifibrilares en el sacrificio de ikejime (Figura 1.10).

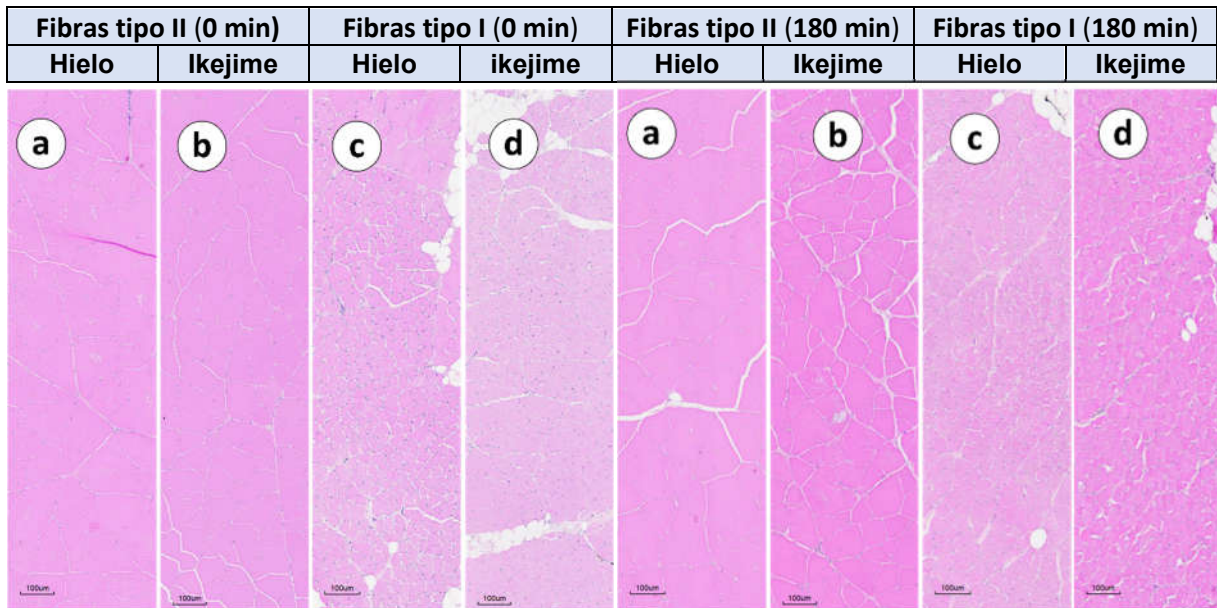


Figura 1.10. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) a las 0 y 180 horas de hacinamiento según el tipo de sacrificio, hielo o ikejime, con la técnica de H&E.

Con la técnica de PTAH, tanto en las fibras de tipo II como tipo I hubo una mayor fragmentación y separación interfibrilar en el músculo de los peces sacrificados con ikejime, imagen observada tanto a tiempo 0 como a 180 minutos de hacinamiento (Figura 1.11).

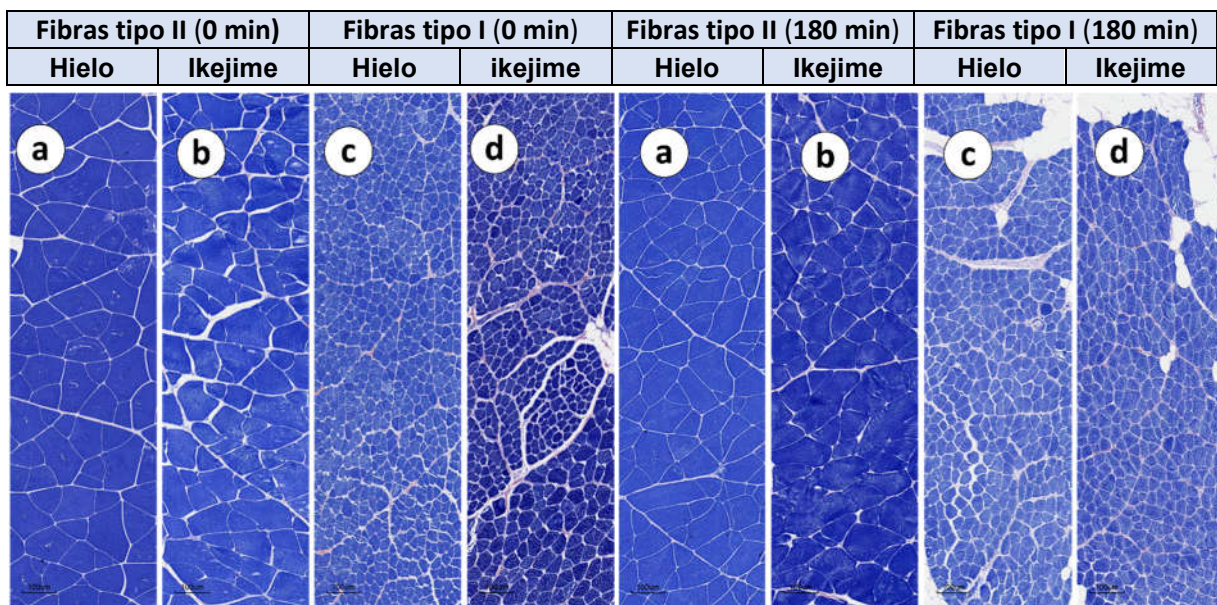


Figura 1.11. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) a las 0 y 180 horas de hacinamiento según el tipo de sacrificio, hielo o ikejime, con la técnica de PTAH.

La técnica de Gomori evidencia en las fibras tipo II presencia de extravasaciones plasmáticas en los peces sacrificados con ikejime, más claras a los 180 minutos de hacinamiento. Tanto en las fibras tipo II como tipo I, con el ikejime hay una mayor conservación del tejido conectivo (Figura 1.12).

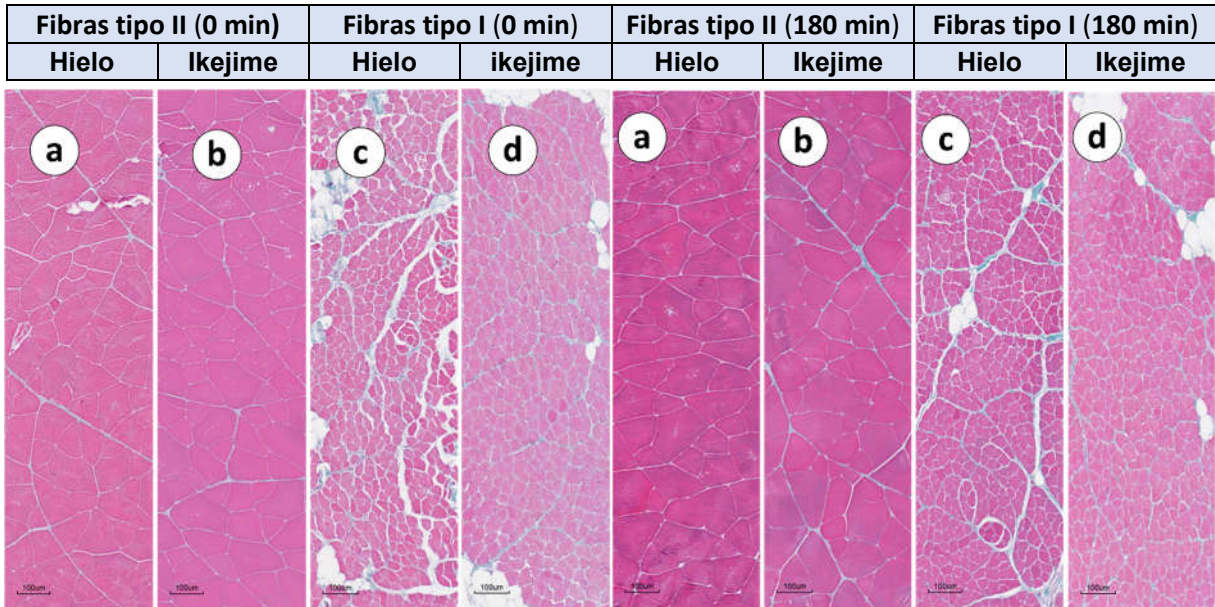


Figura 1.12. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) a las 0 y 180 horas de hacinamiento según el tipo de sacrificio, hielo o ikejime, con la técnica de Gomori.

Se detectó una mayor reserva de glucógeno en el sacrificio mediante ikejime en ambos tipos de fibras y a los dos periodos de hacinamiento considerados (Figura 1.13).

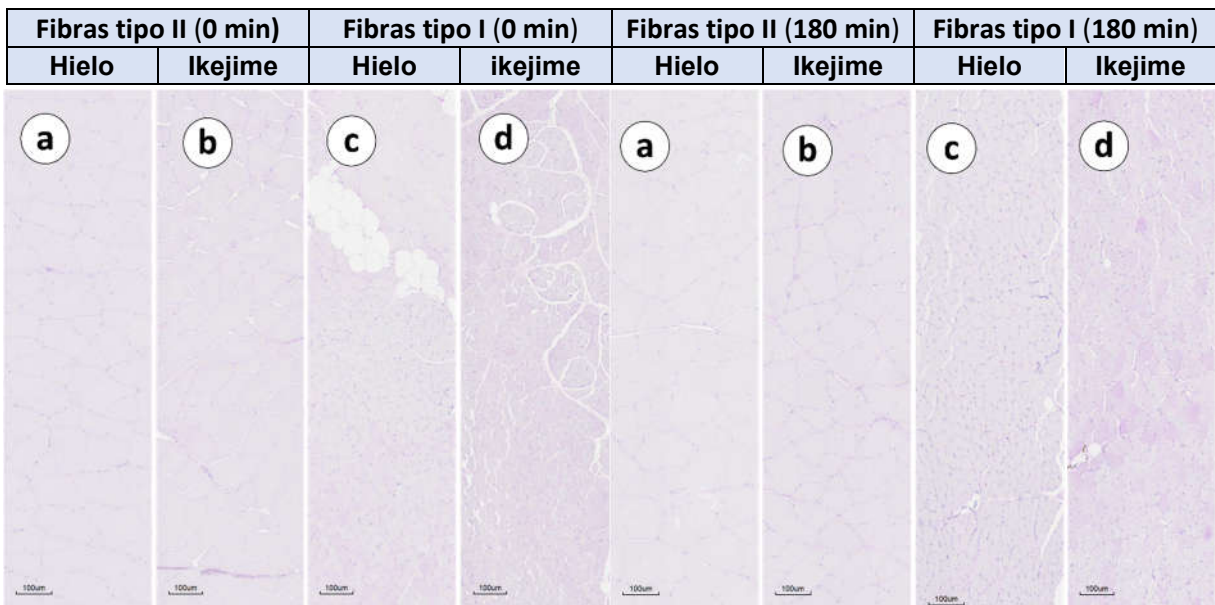


Figura 1.13. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) a las 0 y 180 horas de hacinamiento según el tipo de sacrificio, hielo o ikejime, con la técnica de PAS.

El patrón de huella dactilar al determinar la distribución de la actina fue más marcado en el sacrificio con hielo en las fibras tipo II, tanto a 0 como 180 horas de hacinamiento. En cambio, en las de tipo I hubo una mayor expresión anti-actina con el de ikejime, proporcionando además un patrón granular (Figura 1.14).

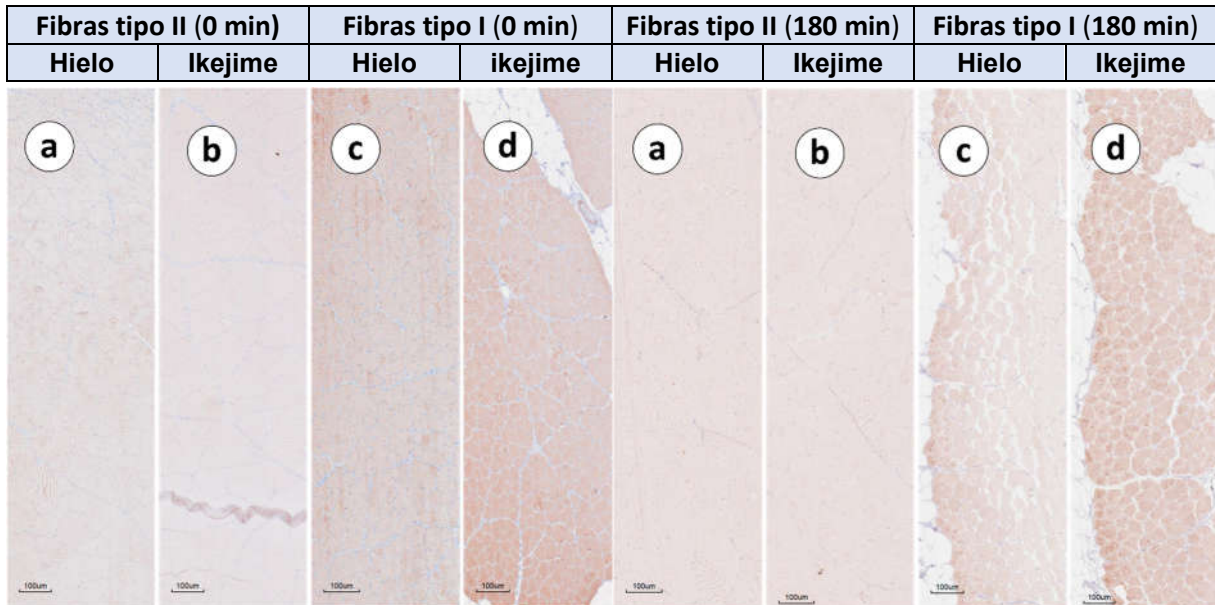


Figura 1.14. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) a las 0 y 180 horas de hacinamiento según el tipo de sacrificio, hielo o ikejime, con anticuerpo anti-actina.

No se detectó expresión para el marcador de estrés HSP70 en ninguno de los dos sacrificios a las 0 horas de hacinamiento en las fibras tipo II. Si la hubo pero sin diferencias apreciables en las fibras tipo II a las 0 horas, con leve pérdida tras el hacinamiento a 180 horas (Figura 1.16).

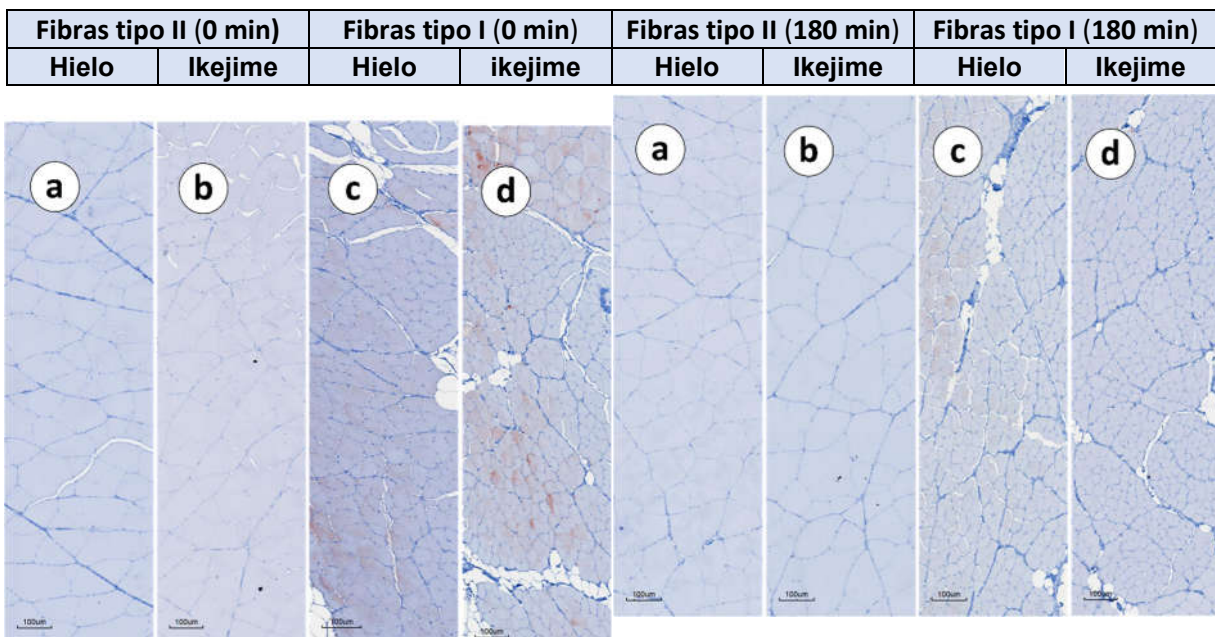


Figura 1.16. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) a las 0 y 180 horas de hacinamiento según el tipo de sacrificio, hielo o ikejime, con anticuerpo HSP70.

Plasma Verano:

Parámetros	Hielo	Ikijime	0 min
Glucosa (mg/dL)	168,67+/-31,53 (85-256)	159+/-11,5 (127-196)	163,83+/-16 (85-256)
Lactato (mmol/L)	9,85+/-2,6 (3,56-21)	7,16+/-0,4 (5,65-8,48)	8,5+/-1,32 (3,56-21)
Na (mmol/L)	167,17+/-5,71 (144-181)	171,5+/-4,3 (157-181)	169,33+/-3,47 (144-181)
pH*	7,07+/-0,09 (6,72-7,34)	7,03+/-0,03 (6,92-7,13)	7,05+/-0,04 (6,73-7,34)
Cortisol (ng/mL)*	681,34+/- 75,44 (338,34-856,3)	935,1+/-129,93 (695,28-1535,87)	808,22+/-81,2 (338,34-1535,87)

Figura 1.17

Parametros	Hielo	Ikijime	180 min
Glucosa (mg/dL)	158,8+/-17,8 (108-197)	133,33+/-10,13 (104-171)	144,91+/-10,08 (104-197)
Lactato (mmol/L)	6,54+/-1,33 (4,45-11,93)	6,1+/-0,5 (4,64-7,86)	6,32+/-0,68 (4,15-11,93)
Na (mmol/L)	166,4+/-5,21 (155-185)	167,33+/- 2,74 (155-174)	166,91+/-2,65(155-185)
pH*	6,76+/-0,03 (6,65-6,85)	6,89+/-0,05 (6,7-7,03)	6,9+/-0,05 (6,65-7,18)
Cortisol (ng/mL)*	485,26 +/- 41,65 (352,13 – 632,6)	746+/-82,12 (560,02-1071,77)	615,63+/-58,92 (352,13-1071,77)

Figura 1.19

Plasma Invierno:

Parámetros	Hielo	Ikijime	0 min
Glucosa (mg/dL)*	136,4+/-9,9 (110-166)	112+/-6,48 (100-141)	123,09+/-6365 (100-166)
Lactato (mmol/L)*	12,93+/-1,59 (7,37-17,83)	5,64+/-0,47 (4,69-7,9)	9,29+/-1,53 (4,69-17,83)
Na (mmol/L)*	134,2+/-5 (118-147)	142,3+/-4,3 (134-160)	138,7+/-3,77 (118-160)
pH	7,67+/-0,03 (7,59-7,79)	7,7+/-0,02 (7,63-7,79)	7,68+/-0,02 (7,59-7,79)
Cortisol (ng/mL)	330+/-90,8 (79,27-620,82)	423,52+/-74,13 (175,8-675,15)	376,79+/-57,63 (79,26-675353)

Figura 1.20

Parámetros	Hielo	Ikijime	180 min
Glucosa (mg/dL)*	186,35+/-16,26 (142-243)	101,02+/-1,11 (97-103)	147,72+/-15,9 (97-243)
Lactato (mmol/L)*	11,57+/-0,54 (10,1-13,31)	7,9+/-1,92 (3,54-13,38)	9,91+/-1,04 (3,54-13,38)
Na (mmol/L)*	160,17+/-3,95 (146-172)	123,2+/-6,42 (99-133)	143,4+/-6,75 (99-172)
pH	7,69+/-0,03 (7,56-7,78)	7,77+/-0,08 (7,64-8,09)	7,73+/-0,04 (7,56-8,08)
Cortisol (ng/mL)	503,2+/-38,42 (402,11-628,1)	393,9+/-44,15 (275,84-531,66)	448,55+/-32,4 (275,84-628,1)

Figura 1.21

PLASMA:

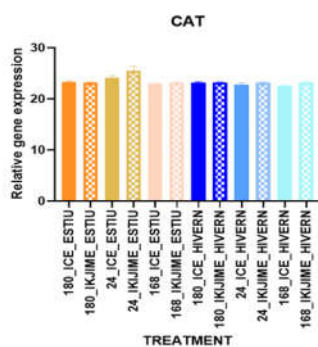
Parámetros	Verano	Invierno
Glucosa	144,91+/-10,08 (104-197)	147,72+/-15,9 (97-243)
Lactato	6,32+/-0,68 (4,15-11,93)	9,91+/-1,04 (3,54-13,38)
pH	6,9+/-0,05 (6,65-7,18)	7,73+/-0,04 (7,56-8,08)
Cortisol	615,63+/-58,92 (352,13-1071,77)	448,55+/-32,4 (275,84-628,1)

Figura 1.22

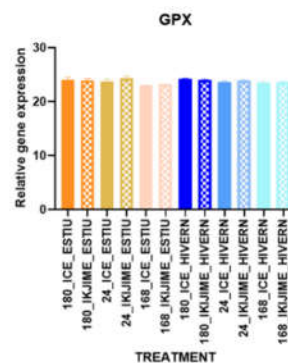
EXPRESIÓN GÉNICA

Se colectaron muestras de piel (representando las mucosas), riñon cefálico (organizador de la respuesta de estrés) y cerebro. Las muestras fueron inmediatamente colocadas en RNA later y guardadas a 4°C hasta el día siguiente, en que fueron congeladas hasta el analisis. Para analizar se extrajo el ARNm y se sintetizó su ADN complementario para llevar a cabo qPCR para gen. Los genes buscados fueron *CAT*, *GPX*, *SOD*, *CFOS*, *MC2R*, *GR1*, *GR2*, *MR*, *HSP70*, *IL10*, *IL1B* para los tres organos y tejidos analisados y además se analizó la expresión del gen *CRH* en cerebro. Los resultados se presentan en las figuras 1.23 a 1.25 con el comentario específico para cada gen.

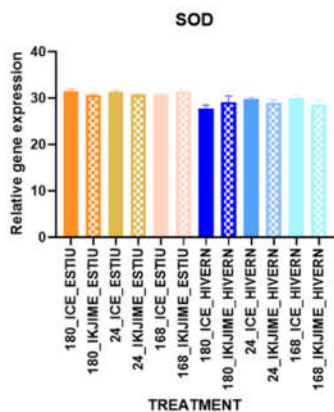
Riñón cefálico:



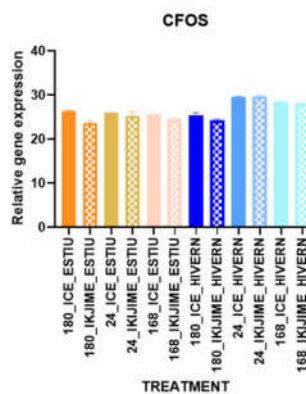
La catalasa es una enzima antioxidante que descompone el peróxido de hidrógeno H₂O₂ originado por las situaciones estresantes. Cuanto más H₂O₂ producido más catalasa se produce. En verano en confinamiento corto se sobreexpresa



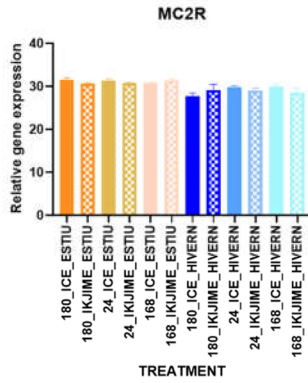
No se registran cambios significativos en el gen GPX, otra de las enzimas antioxidantes que cataliza el paso de glutatión y peróxido de hidrogeno a agua



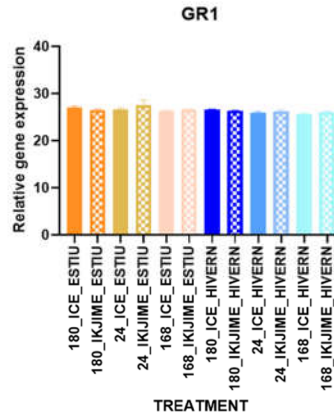
Dos factores influyen significativamente la Superóxido dismutasa, responsable de la respuesta antioxidante. Al igual que otros genes antioxidantes, la época de verano activa la respuesta.



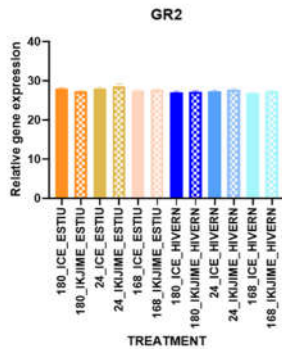
El confinamiento, la época y menos la técnica incrementan la producción de CFOS, un gen que se expresa después de estresores de tipo emocional (los que implican una mayor elaboración del cerebro y no son puramente físicos)



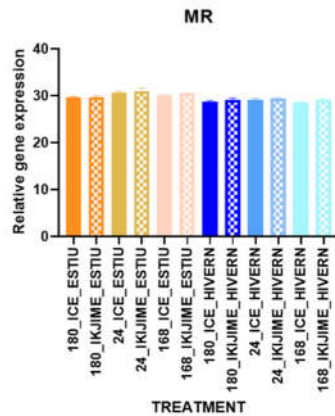
El gen del MC2R, receptor de la hormona ACTH, liberada después de la activación del eje de estrés, se activa significativamente por la época, incrementándose en verano



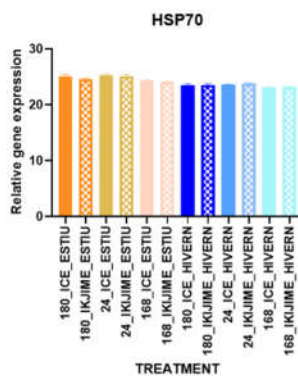
En el caso del receptor de cortisol solamente el factor época es (altamente) significativa. En verano la expresión es más alta



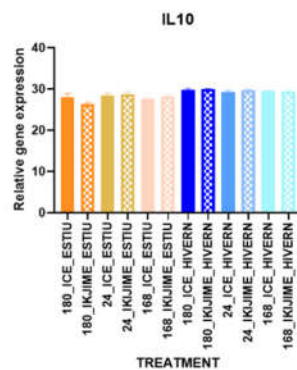
En el caso del receptor 2 del cortisol, tanto la época como el confinamiento resultan significativos.



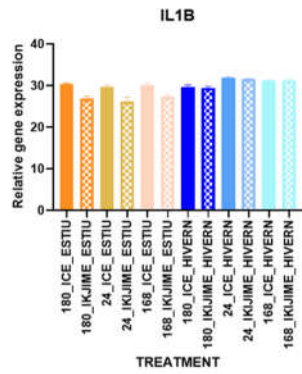
El receptor mineralocorticoide MR que también responde al cortisol resulta sensible a los tres factores, pero especialmente a la estación.



La Heat shock protein 70 (indicador de estrés celular) resulta altamente incrementada en verano y el confinamiento también influye



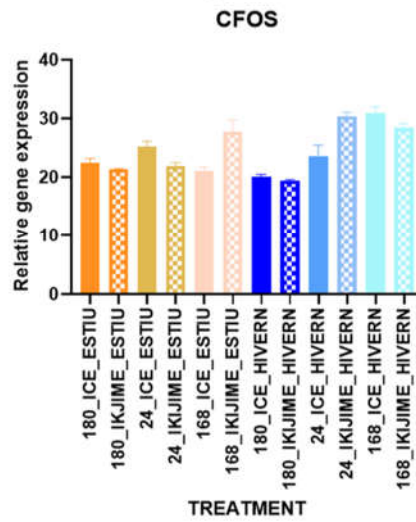
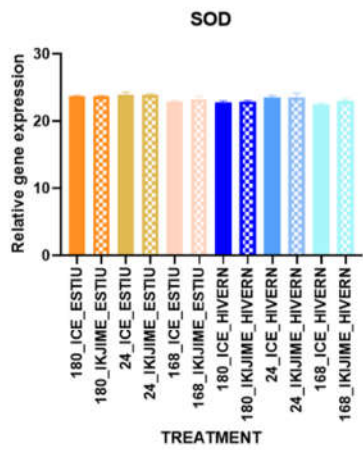
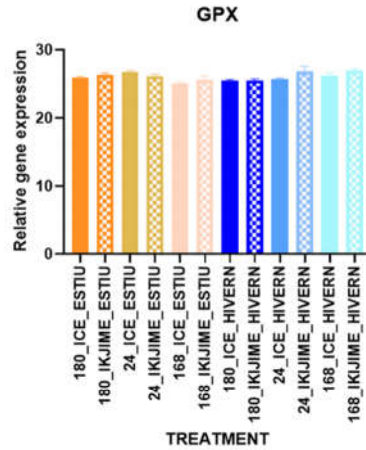
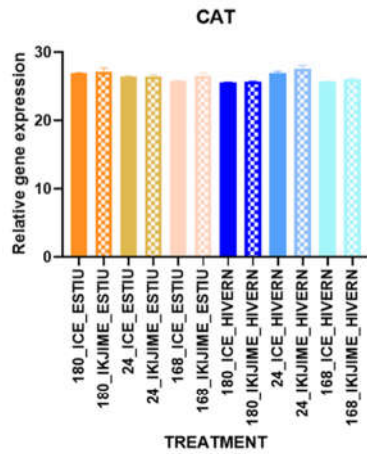
La Interleukina 10 es una citoquina antiinflamatoria que resulta activada en invierno (reducida en verano) sin influencia significativa de otros factores



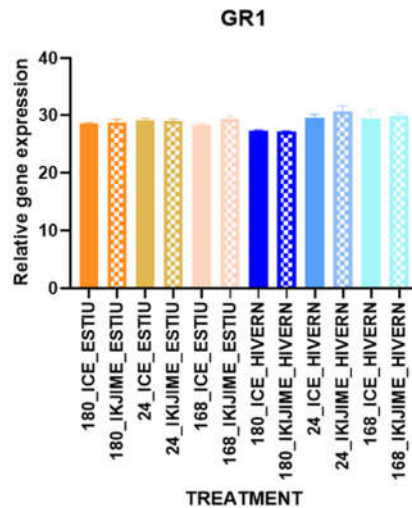
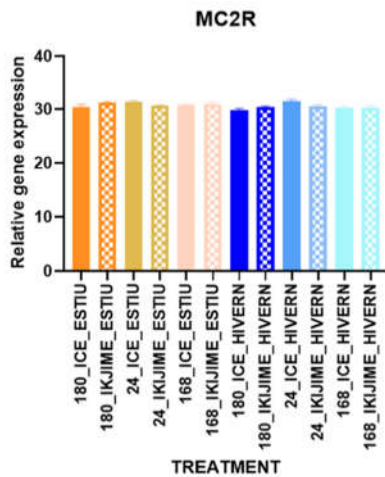
La Interleukina 1b es una proteína proinflamatoria que se sobreexpresa en invierno respecto del verano. La técnica del Ikijime reduce la expresión de esta citoquina

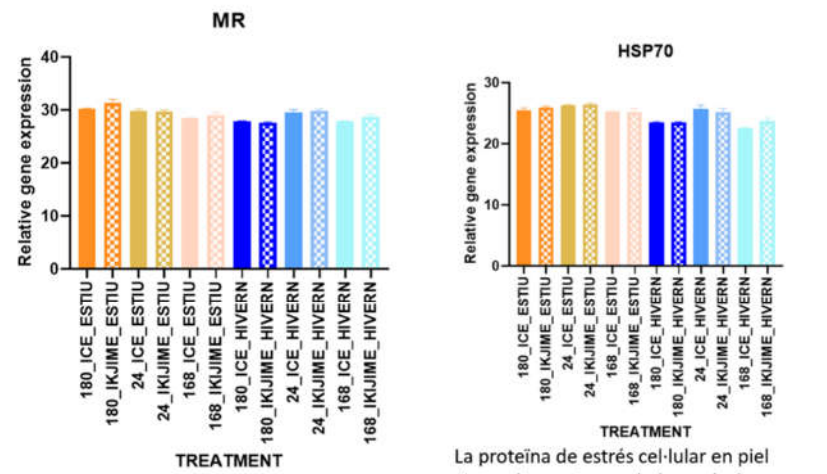
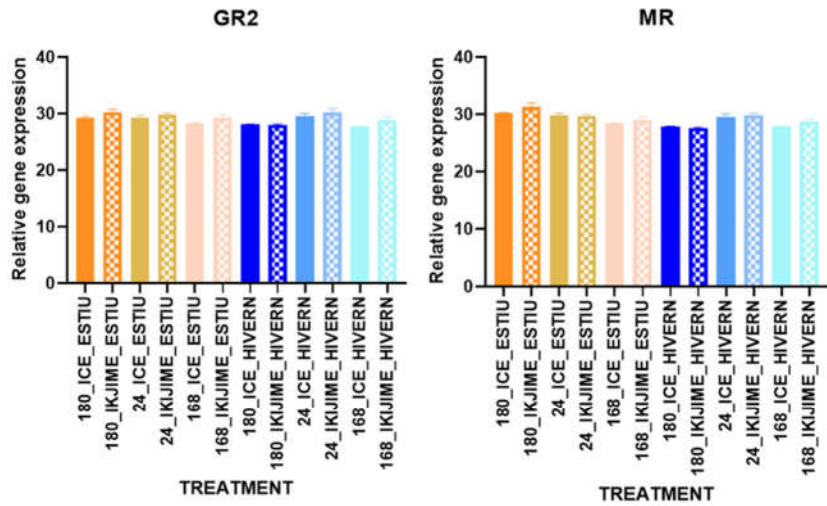
Figuras 1.23

Piel:



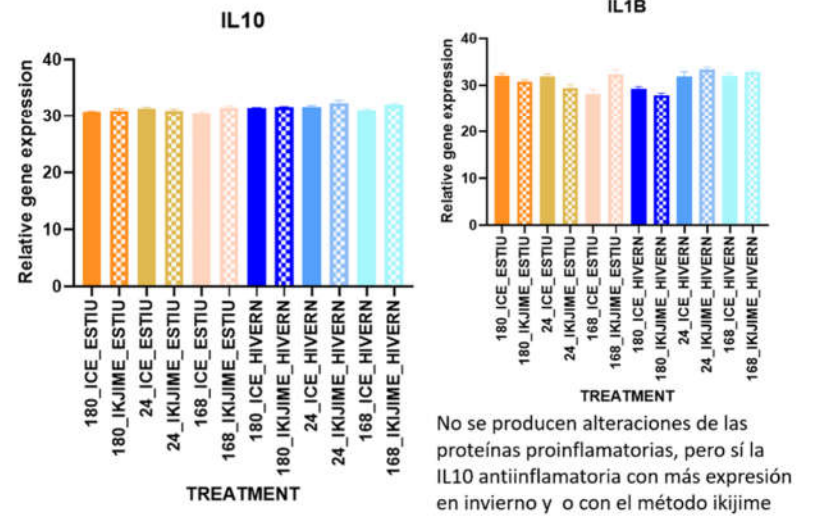
Los genes relacionados con los mecanismos antioxidantes aumentan la expresión en tiempos cortos de confinamiento y bajan a tiempos más largos. Se detectan menos influencias del resto de factores.





Respecto a los receptores de corticosteroides, en todos ellos el confinamiento regula su expresión (más expresión a corto tiempo), y en menor medida la época del muestreo

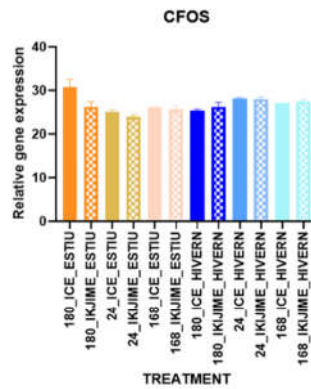
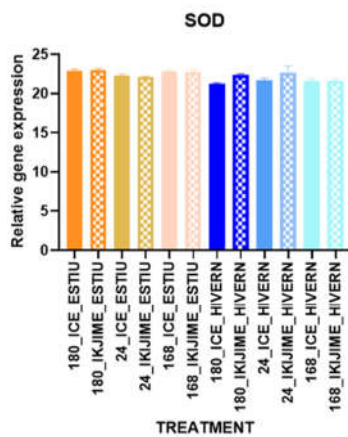
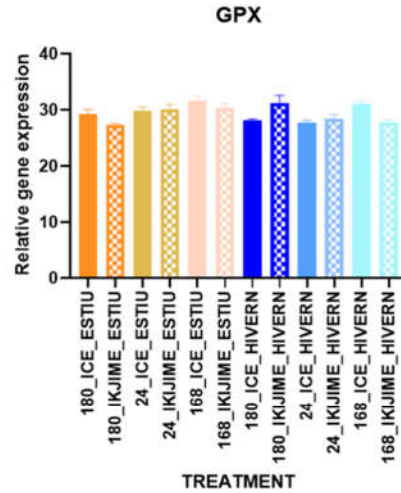
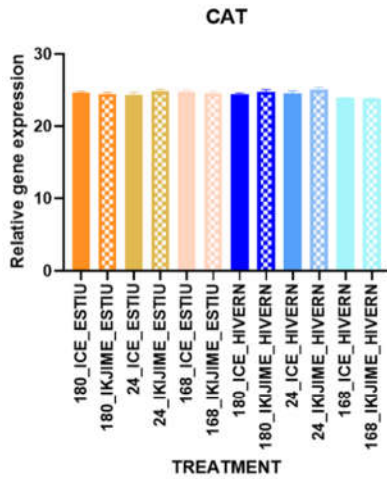
La proteína de estrés celular en piel viene altamente regulada por la época (más expresión en verano) y el confinamiento (más expresión a tiempos cortos)



No se producen alteraciones de las proteínas proinflamatorias, pero sí la IL10 antiinflamatoria con más expresión en invierno y o con el método ikjime

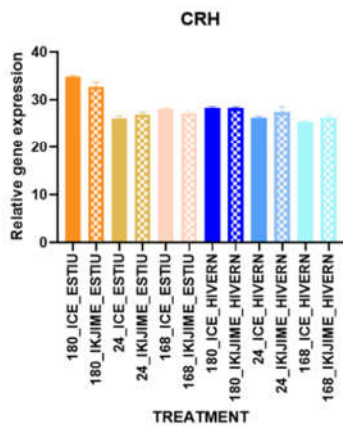
Figuras 1.24

Cerebro:

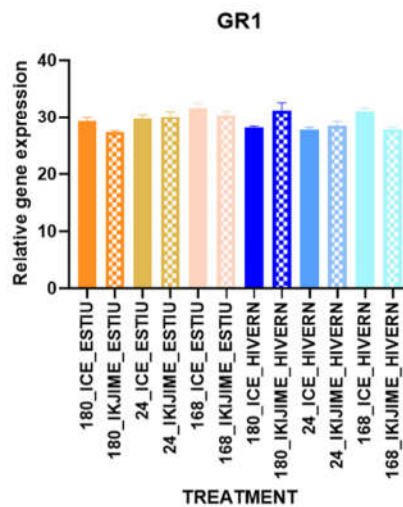


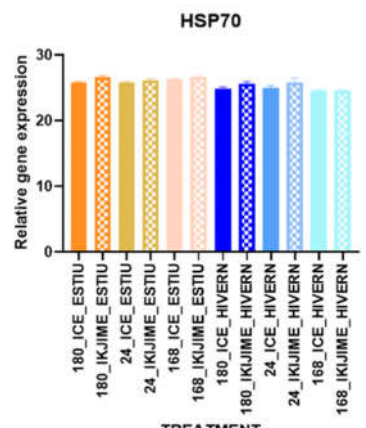
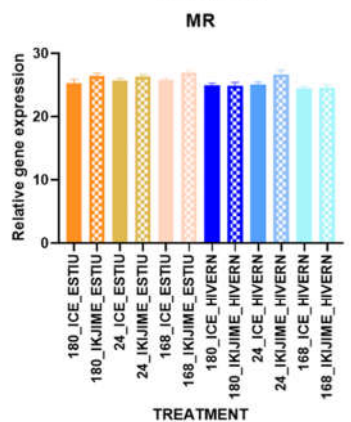
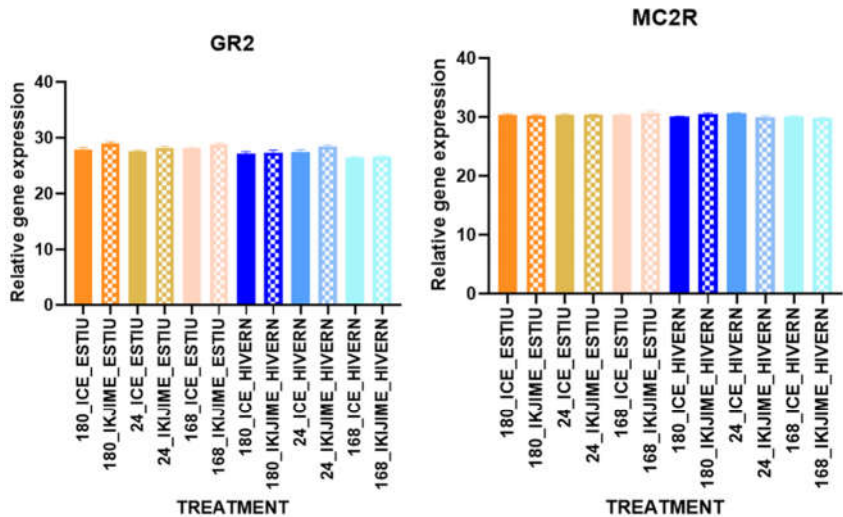
Sin cambios globalmente en los genes antioxidantes del cerebro excepto el superóxido dismutasa con menor expresión en invierno

Se registran cambios del gen CFOS en el cerebro, aunque no resultan significativos por la variabilidad. Siendo un indicador de estrés principalmente emocional (no físico) se esperarían cambios en los confinados, que sí se observan a las 180h por hielo (verano) y 24h por hielo o ikjime en invierno



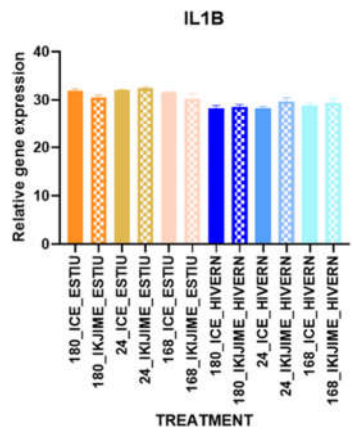
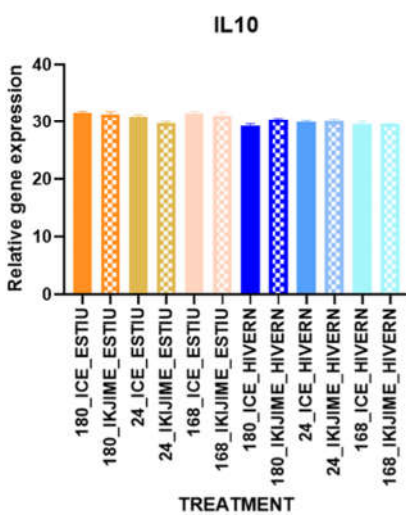
Tanto el confinamiento como la época incrementan la expresión del CRH en cerebro, en especial después de 180h de confinamiento en verano.





Respecto de los receptores del eje de estrés, el factor técnico es el que más influye en los cambios de expresión de los 4 receptores. En particular el receptor de cortisol GR1 después de confinamiento largo (168h, 180h) y después de IkJime en el receptor MR

La proteína de respuesta de fase aguda HSP70 está influida sobre todo por la época (más alta en verano). La técnica del ikjime parece activar más su expresión



Las proteínas inflamatorias son activadas en especial durante los experimentos de verano comparado con la expresión en invierno y poca significación del resto de factores

Figuras 1.25

Los resultados indican una influencia importante de la estación en la que se hicieron los muestreos. En verano en el riñón cefálico suben los genes de estrés oxidativo, receptores de cortisol y proteínas de estrés. En invierno sube el gen *CFOS* de estrés emocional. En la piel suben las proteínas de estrés en verano y baja el *CFOS*. En cerebro suben las proteínas de estrés y las citoquinas inflamatorias en verano.

Respecto a la técnica de sacrificio, los resultados indican que en general el hielo provoca más alteraciones de los genes de estrés comparado con el ikijime. Además, en riñón cefálico suben los genes proinflamatorios y *CFOS*, en piel los genes de estrés oxidativo en los confinados a mayor tiempo y en cerebro influye el confinamiento, con descensos de genes *CFOS* en confinamiento corto y subidas de *CRH* a confinamientos largos.

Incidencias

No se detectaron incidencias en el desarrollo de la actividad.

Actividad 1.2 Período de ayuno pre-sacrificio

Incluir, para cada una de las actividades en desarrollo o finalizadas, la siguiente información:

- *Entidades participantes* IRTA, IMIDA, IMEDEA, ULPCG
-
- *Presupuesto inicial y Presupuesto ejecutado*
 - Se ha ejecutado el 100% del presupuesto asignado a esa actividad ya que se ha adquirido todo lo requerido para completar esta actividad, aunque parte de ella, la correspondiente a los experimentos de invierno, todavía no se ha desarrollado.
- *Descripción de las tareas y trabajos realizados*
 - El objetivo de esta actividad fue determinar la relación entre los periodos de ayuno al que los peces son sometidos durante el pre-sacrificio, y una batería de parámetros fisiológicos, comportamentales y externos relacionados con el estrés. Para desarrollar este objetivo se hizo un experimento con diferentes tratamientos donde la variable fue el periodo de ayuno antes del sacrificio. Para ello se sacrificarán grupos de peces ayunados durante 0, 24, 48, 72, 96 y 168 horas.
 - De cada tratamiento, un total de 8 individuos fueron sacrificados en agua –hielo y otros 8 peces con ikijime. Una vez están sacrificados, la evaluación de los peces fue la misma que en el experimento anterior, midiendo se parámetros bioquímicos y moleculares de estrés, calidad de producto in situ y parámetros de bienestar.
 -
 - De igual modo, dos semanas antes de llevar a cabo el experimento se implantaron 12 marcas para registro de frecuencia cardiaca (Modelo: DST-milli-

HRT logger, StarOddi®), y de actividad motora para poder relacionar con el resto de parámetros (fisiológicos, externos y comportamentales) medidos a lo largo de todo el periodo de ayuno.

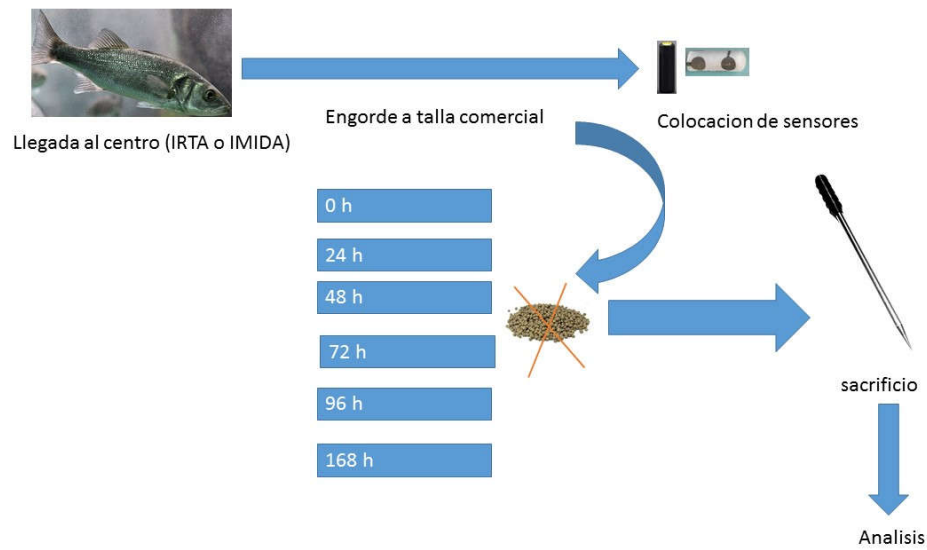


Figura 1.26

- *Resultados obtenidos*

Los individuos utilizados para este experimento presentaron una longitud estándar media (SL ± SD) de $32,59 \pm 2,99$ cm, longitud total media (TL ± SD) de $36,45 \pm 3,05$ cm y un peso húmedo medio (WW ± SD) de $563,25 \pm 137,17$ g en verano y una longitud estándar media (SL ± SD) de $26,03 \pm 2,2$ cm, longitud total media (TL ± SD) de $29,45 \pm 2,4$ cm y un peso húmedo medio (WW ± SD) de $351,46 \pm 84,06$ g en invierno. La temperatura media del agua durante el periodo de experimentación fue de 28°C en verano y $9,5^{\circ}\text{C}$ en invierno.

En la Figura 1.27 se presentan los resultados de la frecuencia cardíaca media a lo largo de los 7 días de ayuno. No se observan cambios en el ritmo cardíaco a lo largo del tiempo. La línea roja continua corresponde a la frecuencia cardíaca basal media de individuos control (HR_{24h} = $69,89 \pm 1,60$ bpm). Las líneas discontinuas indican la frecuencia cardíaca basal media durante el día y durante la noche (HR_{día} = $76,39 \pm 2,19$ bpm y HR_{noche} = $63,03 \pm 1,77$ bpm). A priori, un período de ayuno de 7 días

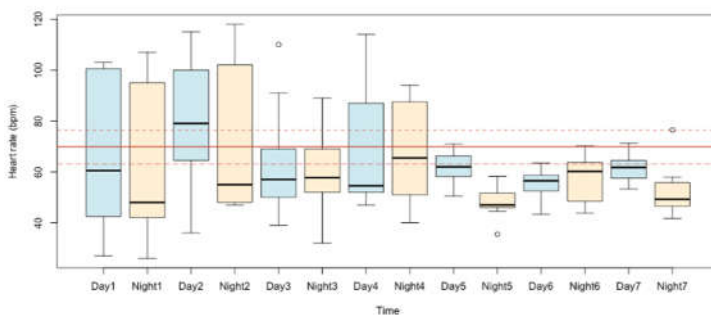
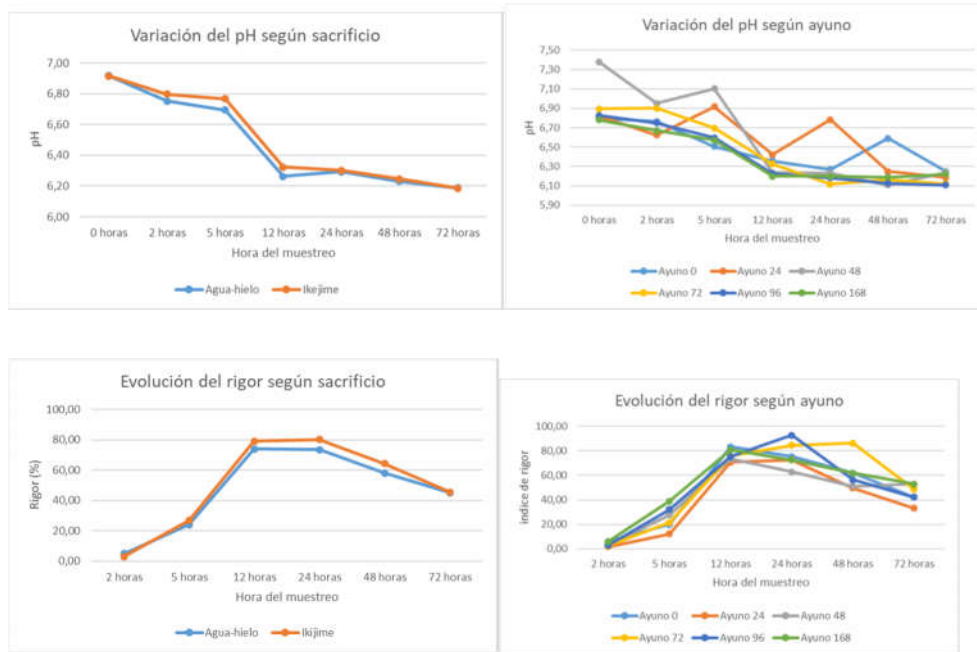


Fig.1.27 – Frecuencia cardíaca media vs. Tiempo de ayuno

no tiene efectos significativos en la frecuencia cardíaca de los individuos, independientemente de la época del año en la que se realice el ayuno.

Los análisis de carne in situ incluyeron medición del pH, desarrollo del rigor mortis e índice de refractancia del ojo. Los resultados se presentan en la figura 1.28



En la Figura 1.28 se presentan los resultados obtenidos para el valor K en función del tipo de sacrificio en los diferentes periodos de ayuno. Sólo hubo efecto debido al periodo de ayuno, no siendo significativo el efecto del tipo de sacrificio.

Tabla II. Valor K en función del tipo de sacrificio en los diferentes periodos de ayuno.

Ayuno	Sacrificio	Valor K
0 h	Hielo	4,53±1,34 ^{YZ}
	Ikejime	3,31±0,88 ^{YZ}
24 h	Hielo	4,50±1,34 ^Z
	Ikejime	2,97±1,46 ^Z
48 h	Hielo	5,14±0,75 ^X
	Ikejime	6,18±1,47 ^X
72 h	Hielo	4,99±0,73 ^{XY}
	Ikejime	4,84±1,79 ^{XY}
	Ayuno	0,004
<i>P-value</i>	Sacrificio	0,236
	Ayuno x sacrificio	0,102

Diferentes letras denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$)

Figura 1.28

Comparando conjuntamente los valores de ambos sacrificios en cada periodo de ayuno, se aprecia claramente una diferencia entre los tiempos cortos de ayuno, 0 y 24 horas previas al sacrificio, frente a los más prolongados (Figura 1.29).

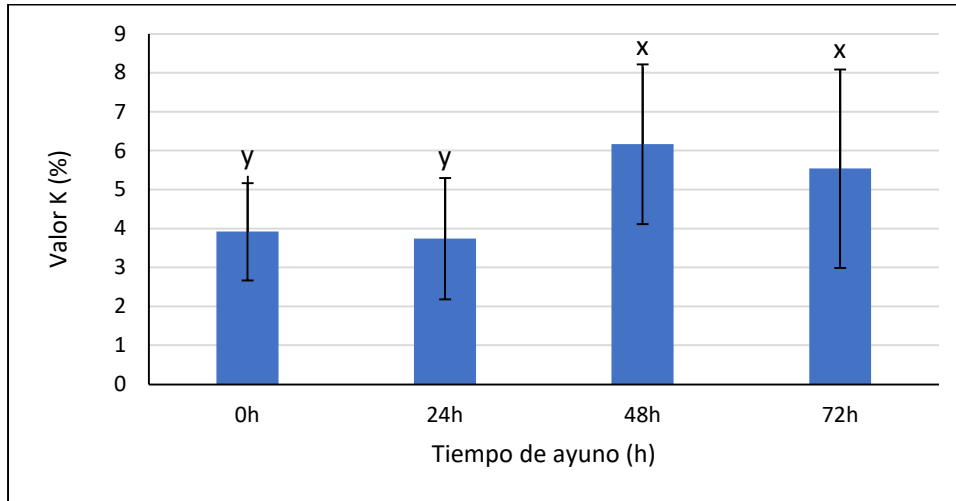


Figura 1.29. Valor K en función del tiempo de ayuno.

Plasma invierno

Parámetros	Hielo	Ikijime	0 horas
Glucosa (mg/dL)	87,3333+/-33,0202 (55-121)	103,5+/-10,60660172 (96-111)	93,8+/-25,52842 (55-121)
Lactato (mmol/L)	4,15+/-0,760329 (3,03-5,04)	4,136667+/-1,680079 (2,74-6,36)	4,142727+/-1,281648 (2,74-6,36)
Na (mmol/L)	125,6667+/-31,89566 (99-161)	143+/-1,414214 (142-144)	132,6+/-24,4806 (99-161)
pH	7,4482+/-0,1157 (7,36-7,642)	7,426+/-0,07479 (7,351-7,543)	7,4371+/-0,092596 (7,351-7,642)
Cortisol (ng/mL)	52,67752778+/-53,96958258 (7,69-151,78)	67,88547222+/-73,3337365 (7,3163333-175,725)	60,2815+/-61,89919 (7,3163333-175,725)
Parámetros	Hielo	Ikijime	168 horas
Glucosa (mg/dL)	163,3333+/-38,98547 (111-205)	93,4+/-18,56879102 (70-117)	131,5455+/-47,24058 (70-205)
Lactato (mmol/L)	12,81167+/-6,669148 (7,4-26)	5,636667+/-2,51895 (2,61-9,17)	9,224167+/-6,094372 (2,61-26)
Na (mmol/L)	162,5+/-7,503333 (149-169)	139,4+/-16,62227 (119-160)	152+/-16,85823 (119-169)
pH	7,315+/-0,03637 (7,271-7,367)	7,4028+/-0,025864 (7,318-7,486)	7,3589+/-0,067303 (7,271-7,486)
Cortisol (ng/mL)	111,9741944+/-79,57728354 (23,35266667-249,7225)	271,09875+/-120,8776089 (64,33833-387,45)	191,5365+/-128,1624 (23,35267-387,45)

Figura 1.30

Plasma verano

Parámetros	Hielo	Ikijime	0 horas
Glucosa (mg/dL)	129+/-19,1729 (105-156)	102,1667+/-21,47013 (84-131)	115,5833+/-23,93726(84-156)
Lactato (mmol/L)	7,971667+/-2,41175 (4,03-11,08)	6,14+/-3,621558 (3,16-13,13)	7,055833+/-3,085539 (3,16-13,13)
Na (mmol/L)	169,6667+/-5,988879 (164-180)	158,5+/-6,090977 (149-168)	164,0833+/-8,195989 (149-180)
pH	7,0905+/-0,082396 (7,026-7,255)	7,2435+/-0,190513 (7,035-7,496)	7,167+/-0,161146 (7,026-7,496)
Cortisol (ng/mL)	525,6567+/-104,1168 (365,82-663,1833)	553,4639+/-140,7837 (369,46-784,2333)	539,5603+/-118,9429 (365,82-784,2333)

Parámetros	Hielo	Ikijime	168 horas
Glucosa (mg/dL)	147,1667+/-36,97251(105-203)	171,5+/-57,35068(101-247)	159,3333+/-47,72713(101-247)
Lactato (mmol/L)	6,593333+/-2,902872 (3,64-11,62)	10,885+/-6,73061 (5,08-21)	8,739167+/-5,426317 (3,64-21)
Na (mmol/L)	161+/-14,50517 (140-177)	173,3333+/-8,824209 (157-181)	167,1667+/-13,1345 (140-181)
pH	6,9255+/-0,179496 (6,677-7,179)	6,834833+/-0,051344 (6,772-6,905)	6,880167+/-0,038821 (6,677-7,179)
Cortisol (ng/mL)	516,2046+/-156,4378 (258,665-709,75)	731,4296+/-304,4656 (389,3775-1144,75)	623,8171+/-256,6968 (258,665-1144,75)

Figura 1.31

Plasma

Parámetros	Verano	Invierno
Glucosa	159,3333+/-47,72713(101-247)	131,5455+/-47,24058 (70-205)
Lactato	8,739167+/-5,426317 (3,64-21)	9,224167+/-6,094372 (2,61-26)
pH	6,880167+/-0,038821 (6,677-7,179)	7,3589+/-0,067303 (7,271-7,486)
Cortisol	623,8171+/-256,6968 (258,665-1144,75)	191,5365+/-128,1624 (23,35267-387,45)

Figura 1.32

No se detectaron incidencias en el desarrollo de la actividad.

Actividad 1.3 Determinación de la respuesta de estrés y calidad de la carne de truchas arcoíris sometidas a dos tipos de agrupamiento para el despesque, reducción del volumen de agua o reducción de espacio en el estanque de engorde y dos duraciones de hacinamiento, comparando invierno y verano.

Incluir, para cada una de las actividades en desarrollo o finalizadas, la siguiente información:

- Entidades participantes: UCM
- Presupuesto inicial y Presupuesto ejecutado:

	2021	2022	2023
Presupuesto inicial	31.905,54 €	19.310,55 €	13.204,91€
Presupuesto ejecutado	—	—	—

Figura 1.33

Tal como aparece en la memoria económica - JUSTIFICACIÓN GASTOS PROYECTO WELLSTUN.

- *Descripción de las tareas y trabajos realizados*

Dentro del WP1, Evaluación del efecto de los procedimientos pre-cosecha que son importantes a nivel comercial en el bienestar y calidad del pescado que estaba incluido dentro del primer Objetivo Especifico (OE1) y en relación con la Tarea 1.3. el objetivo marcado fue evaluar dos técnicas de confinamiento de truchas previas al despesque, reducción del volumen de agua del tanque o reducir el volumen y además disminuir el espacio con movimiento de separadores dentro del estanque, debido a la gran repercusión que tiene en la trucha la temperatura del agua se realizarán en dos épocas muy diferentes donde la temperatura del agua será muy diferente como son verano e invierno.

El objetivo marcado en esta tarea se ha cumplido al 100 % y se han desarrollado de todas las actividades planteado en el proyecto. Para ello se adquirieron 700 truchas a una piscifactoría comercial de trucha arcoíris localizada en Guadalajara, que suministró truchas de tamaño ración de 300 a 400 g y se transportaron a las instalaciones del piscifactoría de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Montes, Forestal y del Medio Natural.

En la piscifactoría de la Escuela los peces mantuvieron durante una semana en los tanques o "raceways" y transcurrido ese tiempo se hicieron lotes con biomasa similar en cada lote en 6 grupos (120 x 70 cm) para realizar tres réplicas por tipo de agrupamiento, cada de lote 55 truchas por réplica para tener aproximadamente una biomasa de 15 kg/m³, similar a un tipo comercial. Las truchas durante está adaptación fueron alimentadas dos veces al día con una tasa del 1,7 % de su peso vivo (nivel recomendado en trucha arcoíris con una temperatura del agua de 12-17 °C; NRC, 1981).

Se llevaron a cabo dos pruebas idénticas en dos estaciones diferentes, invierno y verano, para poder observar el efecto de la temperatura del agua como principal factor medioambiental, junto con otros factores como son el fotoperiodo, la intensidad lumínica, etc. sobre los parámetros determinados. Se procedió a agrupar a los peces en los dos sistemas planteados reducción del volumen de agua o reducción de espacio en el estanque de engorde, en dos épocas del año, se comenzó a realizar la primera prueba en época estival con una temperatura de agua de 20 °C. En invierno se realizó la segunda prueba donde la temperatura media del agua fue de de 10 °C. Para el agrupamiento por la reducción del nivel agua, las truchas desde el comienzo de la prueba se mantuvieron en unas jaulas que permitieron subirlas hasta que tuviera un nivel de agua de 15 cm para alcanzar una densidad de 50 kg/m³ de esta forma intentábamos alcanzar las densidades comerciales en piscifactorías. Para la realización de la prueba de reducción horizontal de espacios, se colocaron unos separadores ajustados al tamaño de la jaula de engorde y se fue desplazando horizontalmente hasta alcanzar un espacio de 15 cm y tener a las truchas una densidad de 50 kg/m³

En estos sistemas de agrupamiento se mantuvieron a las truchas durante 20 minutos, tras los cuales se sacaron 12 truchas de cada uno de los sistemas de agrupamiento y en menos de 3 minutos se procedió al sacrificio de los mismos de forma individual mediante el sistema "ikijime" consistente en la introducción de un émbolo penetrante en el cerebro del pez para provocar la destrucción de la masa cerebral y de esa forma provocar la inconsciencia del mismo y su muerte. Con este sistema de aturdimiento nos acogemos a la necesidad de que el aturdimiento debe de ser inferior a 1 segundo y que no produzca percepción del dolor durante la muerte del animal. Tras esta sacrificio de los peces se les pesó, se les midió y se les extrajo una muestra de sangre a partir de la vena caudal.

La sangre se trasvasó a dos tubos uno con anticoagulante, EDTA para obtener plasma y otro con FNa para evitar el uso de glucosa por parte de los eritrocitos y obtener suero. Inmediatamente se centrifugaron a 6.000 rpm durante 5 minutos y el plasma y el suero alicuotaron en otros botes de 1,5 ml para su congelación a -32 °C y poder realizar posteriormente los análisis sanguíneos de cortisol, glucosa, lactato, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados y actividades enzimáticas como la lactato deshidrogenasa (LDH) y la creatinina fosfoquinasa (CPK).

Para la toma de muestras de hígado y músculo se congelaron en nitrógeno líquido para la determinación de la concentración de glucógeno hepático y muscular. Se midió el color de la piel de estos animales, en hígado se cuantificó el color hepático y el color muscular, además se tomó el pH del músculo y en otros 10 peces se valoró el establecimiento del rigor mortis. Además se tomaron muestras para valorar parámetros de expresión génica en las truchas relacionadas con las funciones básicas de respuesta de estrés, pero como la última toma de muestras fue en verano están todavía procesándose para la obtención de resultados, ya que para evitar distorsiones en la evaluación se remitieron todas las muestras en congelación en dos tandas separadas 1 mes en el junio y julio tal como aparece en la memoria económica del proyecto.

- *Subcontrataciones:*

En esta tarea se ha realizado la subcontratación de la UAB, para la realización de los análisis de expresión génica en las truchas relacionadas con las funciones básicas de respuesta de estrés y de funciones metabólicas y energéticas.

- *Resultados obtenidos:*

Los resultados obtenidos en esta prueba comparando ambos sistemas de despesque como son la reducción de volumen de agua y la reducción de espacio se presentan a continuación:

Bioquímica sanguínea:

En la Figura 1.34 se presentan los resultados de los parámetros bioquímicos analizados en las truchas en función de la época del año, la tipo de agrupamiento y el ayuno.

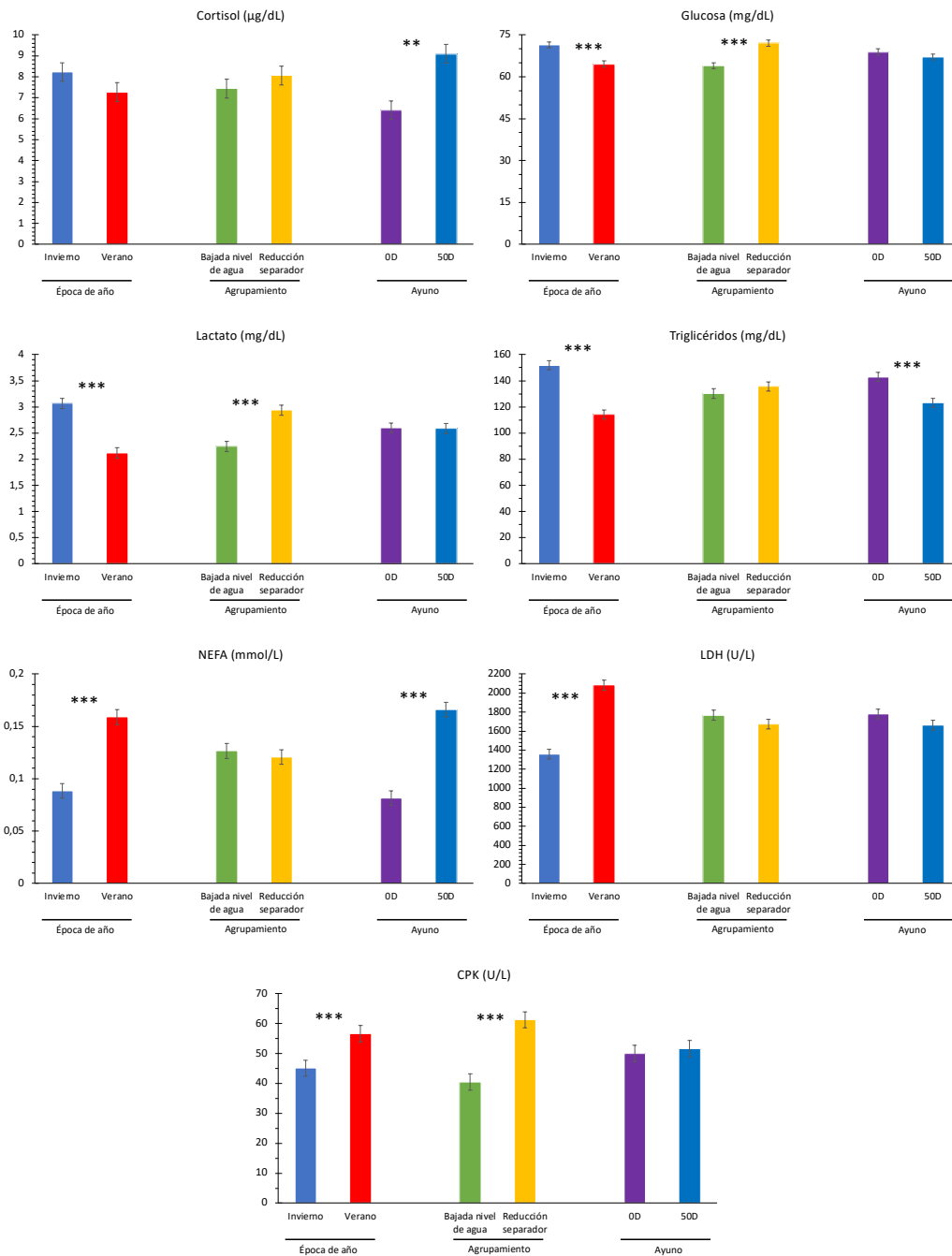


Figura 1.34.- Respuesta fisiológica de las truchas en función de la época del año, del sistema de agrupamiento y del ayuno

En la figura 1.34 se observa como la época del año tiene un efecto sobre los parámetros fisiológicos provocando un aumento de la concentración de glucosa, lactato, triglicéridos sin embargo en verano tenemos un aumento de ácidos grasos libres (NEFAs), y de la actividad de la LDH y de CPK, indicándonos que tienen una mayor actividad muscular en esta época. Con respecto al sistema de agrupamiento, lo observamos un pequeño efecto en cuanto a la concentración plasmática de glucosa y de lactato, así como de CPK en las truchas sometidas a una agrupamiento por reducción con separador. El ayuno provocó una movilización de los triglicéridos reduciéndose en plasma y aumentando los ácidos grasos libres (NEFAs), indicándonos que el animal entra en un estado de actividad metabólica de consumo se reservas grasas y que además ha

provocado un incremento del nivel de cortisol en plasma señalando que el ayuno causa una respuesta de estrés por dejar de comer durante 50°C/día.

Parámetros de respuesta de estrés:

En la Figura 1.35 se presenta los parámetros de color del hígado. Se puede observar como el único factor que afecta al color hepático ha sido la época del año. Donde observamos que los peces sacrificados en invierno muestran un color más claro por tener mayor luminosidad (L^*), mayor índice de amarillo (b^*), mayor tono (h^*) y menor índice de rojo (a^*). En relación con el sistema de agrupamiento solamente encontramos una diferencia en la saturación (C^*), siendo mayor en los peces que han sido sometidos a una reducción de espacio por separadores, mientras que el tipo de ayuno no ha afectado al color hepático.

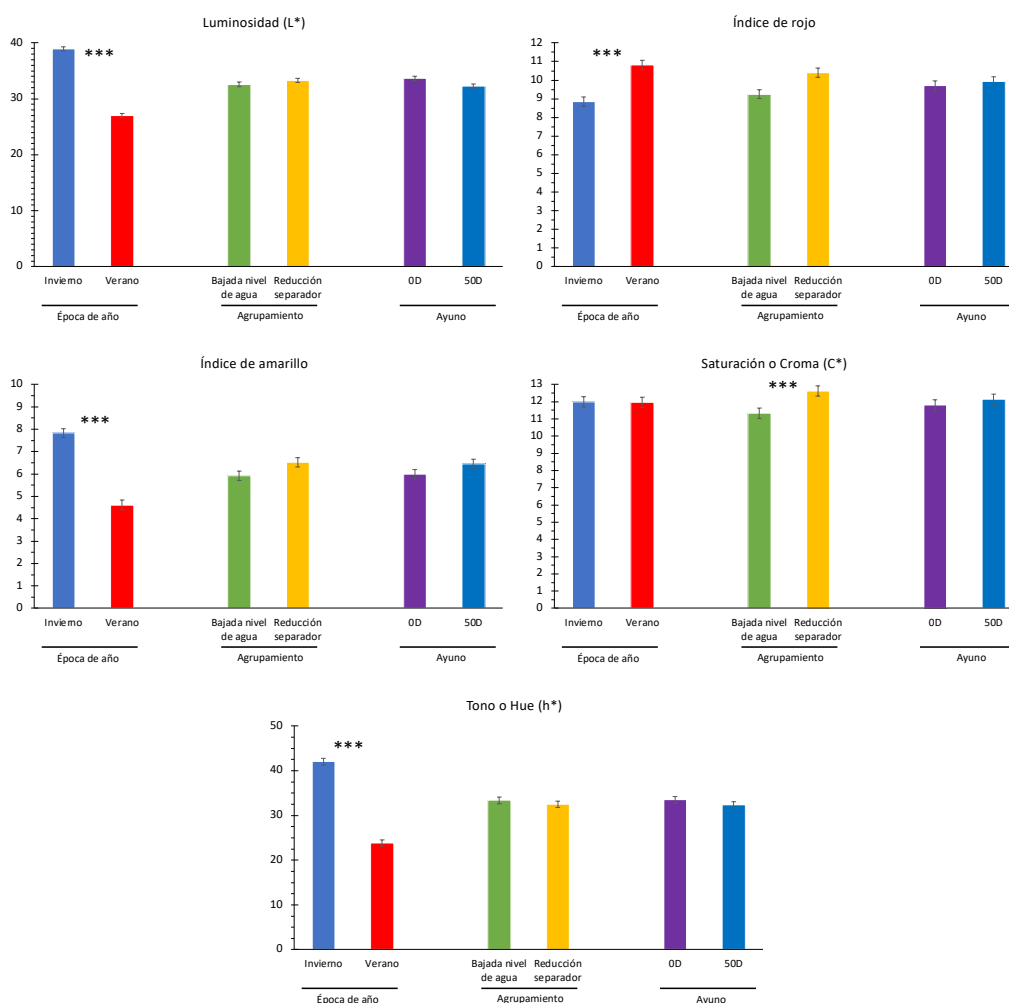


Figura 1.35.- Parámetros de color hepático de las truchas en función de la época del año, del sistema de agrupamiento y del ayuno

La Figura 1.36 muestra el resultado de los parámetros de color de la piel. En la gráfica podemos observar como la época del año provoca una coloración más oscura de la piel en los peces sacrificados que en verano por tener mayor índice de rojo (a^*), mayor índice de amarillo (b^*), mayor saturación (C^*) y mayor tono (h^*). Con respecto al sistema de agrupamiento observamos que los peces son ligeramente más oscuros a los que se les ha sometido a una reducción de espacio por separadores por tener un mayor tono (h^*) y mayor índice de amarillo (b^*) y menor índice de rojo (a^*). Con relación al ayuno

solamente podemos encontrar que los peces son ligeramente más oscuros los sometidos 50°C/día de ayuno por tener mayor luminosidad (L^*) e índice de rojo (a^*).

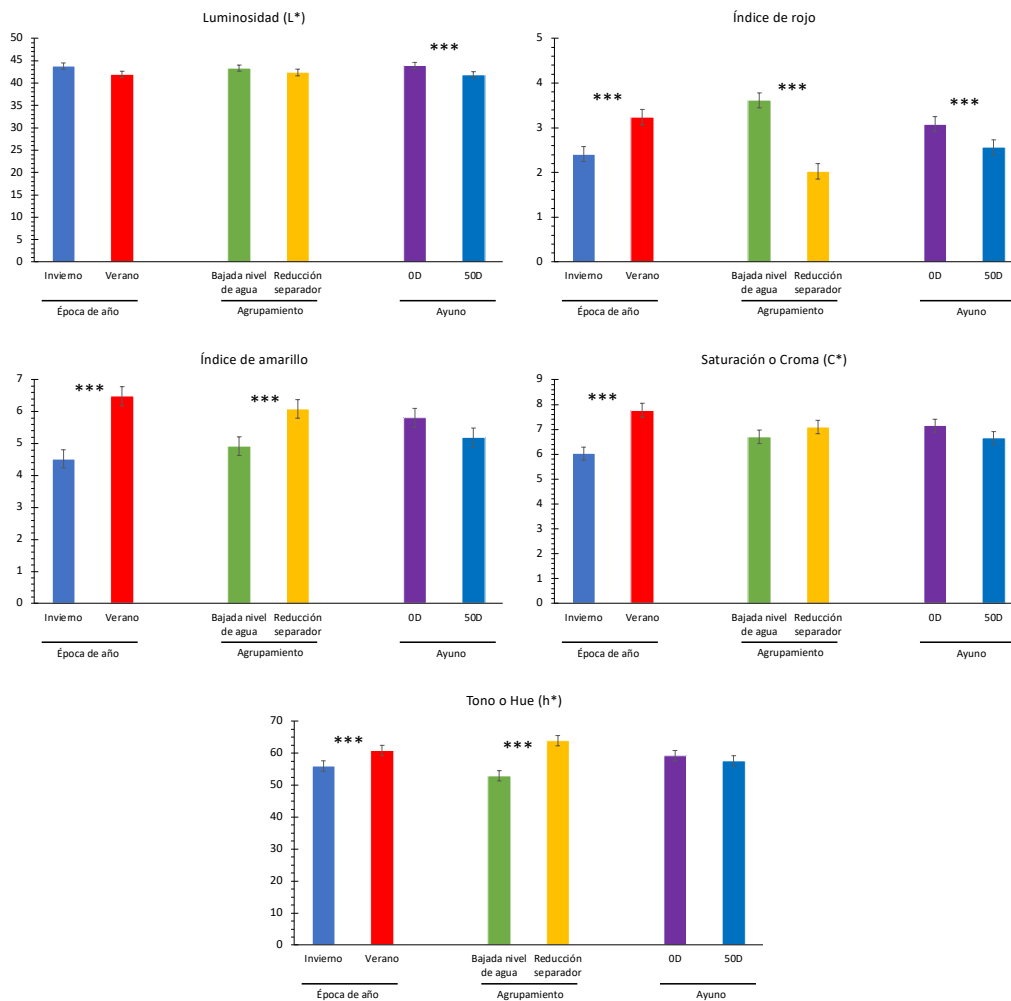


Figura 1.36.- Parámetros de color de la piel de las truchas en función de la época del año, del sistema de agrupamiento y del ayuno

En la figura 1.37 se presentan los resultados de la concentración hepática y muscular de glucógeno.

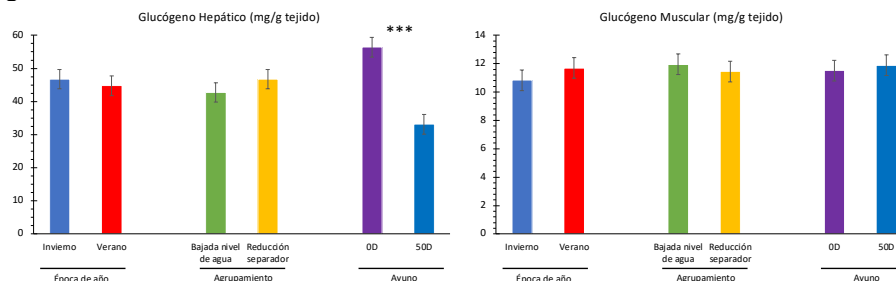


Figura 1.37.- Concentración hepática y muscular de glucógeno en función de la época del año, del sistema de agrupamiento y del ayuno

Se observa cómo solamente el ayuno tiene efecto solamente en el glucógeno hepático siendo superior en los truchas no sometidos a ningún tipo de ayuno, porque con 50°C/día utilizan las reservas hepáticas de glucógeno y comienzan con la actividad de

obtención de energía por la vía grasa, provocando una reducción de triglicéridos como hemos visto en los parámetros de bioquímica sanguínea y una aumento de los ácidos grasos libres en plasma (NEFAs).

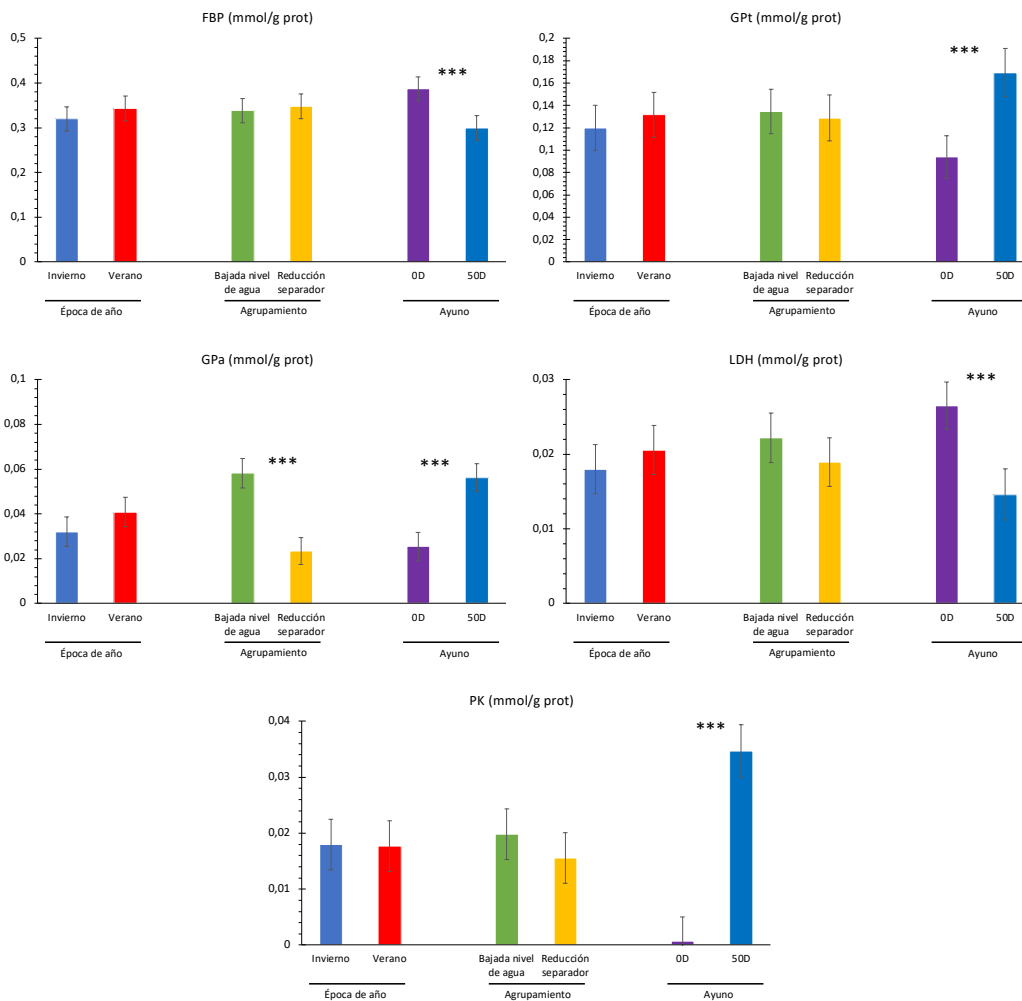


Figura 1.38.- Actividades enzimáticas hepáticas en función de la época del año, del sistema de agrupamiento y del ayuno

En la Figura 1.38 se presentan los resultados de las actividades enzimáticas cuantificadas en el hígado. Se observa en la gráfica que el ayuno es el principal factor que afecta a la respuesta de la actividad de las enzimas hepáticas. Las enzimas relacionadas con la actividad del metabolismo de la energía está más elevada su actividad (GpT, GPa y PK), mientras que las enzimas relacionadas con el metabolismo proteico esta reducidas su actividad con el ayuno 50°C/día (FBP y LDH).

En la Figura 1.39 se presentan los resultados de las actividades enzimáticas cuantificadas en el músculo blanco. Se puede observar cómo solamente ha habido un efecto de ayuno mostrando las truchas ayunadas 50°/día una mayor actividad de la GpT y de la PK enzimas relacionadas con el metabolismo energético, mientras que ha habido un descenso de la FBP con el ayuno.

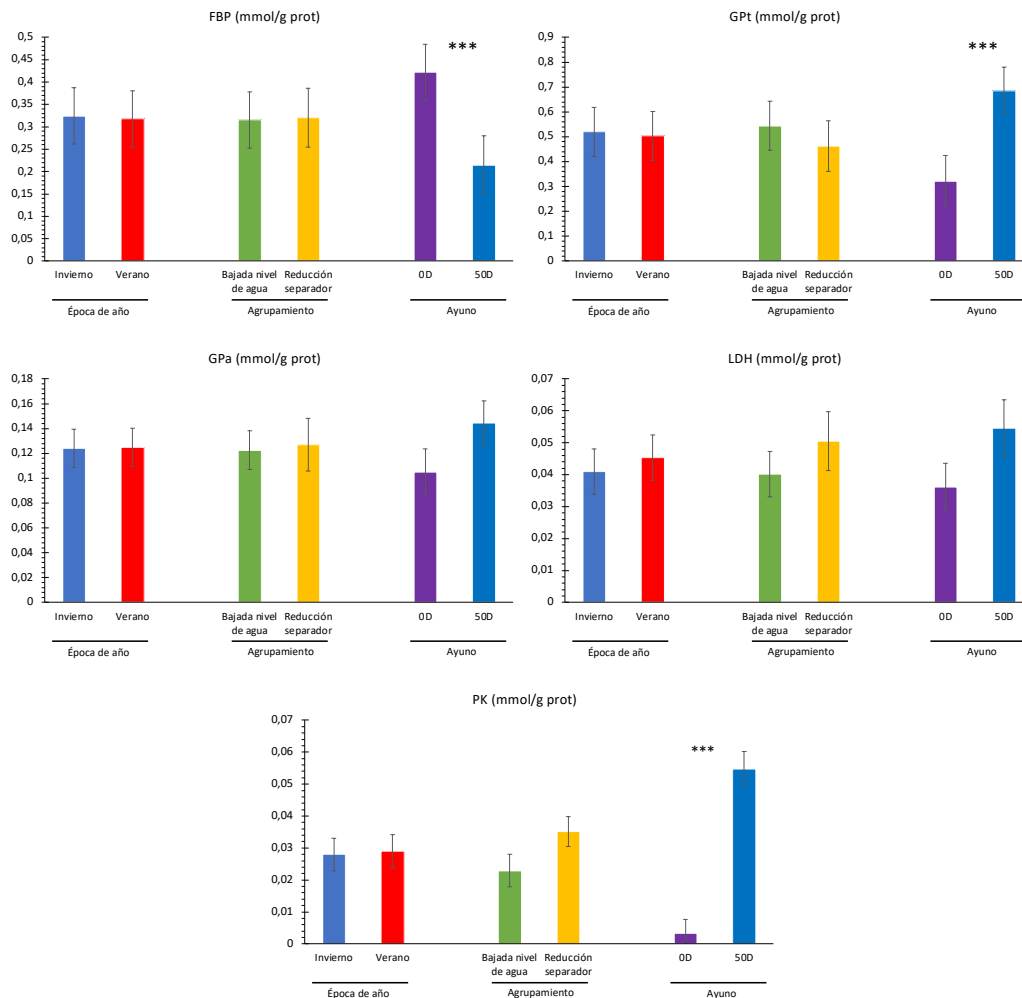


Figura 1.39.- Actividades enzimáticas en el músculo blanco en función de la época del año, del sistema de agrupamiento y del ayuno

Parámetros de calidad de carne:

Se puede observar que aunque en el peso de peces en verano aunque provenían de la misma piscifactoría eran ligeramente menos pesados, unos 15 g menos que los de invierno, sin embargo en cuando al tamaño eran ligeramente más largos. Esto puede ser debido a que en verano los peces dejan de comer por tener una temperatura más alta del agua y provoca un reducción de la condición corporal como se ha observado como en verano el factor de condición es inferior lo mismo que ha sucedido con el hígado. El ayuno se no provocado una reducción de tamaño corporal, pero si ha provocado que el factor de condición y el índice hepato-somático sea inferior.

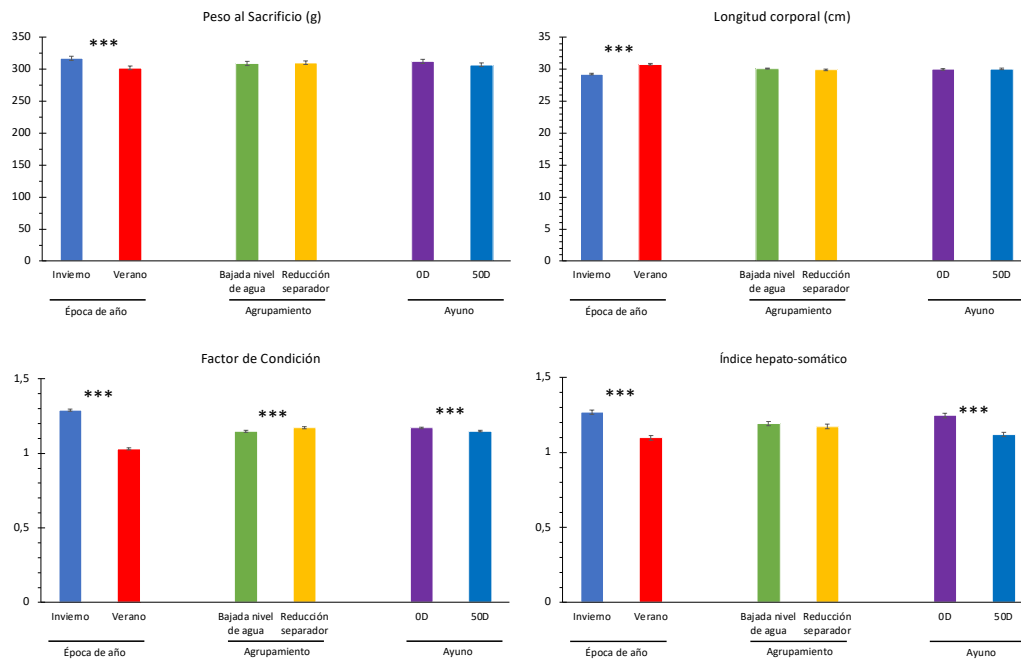


Figura 1.40.- Peso al sacrificio, longitud, factor de condición e índice hepato-somático en función de la época del año, del sistema de agrupamiento y del ayuno

En la Figura 1.41 se muestran los resultados de la época del año, el tipo de agrupamiento y el ayuno sobre el color de músculo a tiempo inicial 0 horas después de sacrificio. Se observa un efecto significativo de la época del año, donde los peces sacrificados en invierno tienen una coloración más clara por tener más luminosidad (L^*), menos índice de amarillo (b^*), croma (C^*) y tono (h^*). Los peces sometidos una reducción del espacio por separadores tuvieron una coloración más clara, y en relación al ayuno el someterles ayuno produjo una carne más oscura.

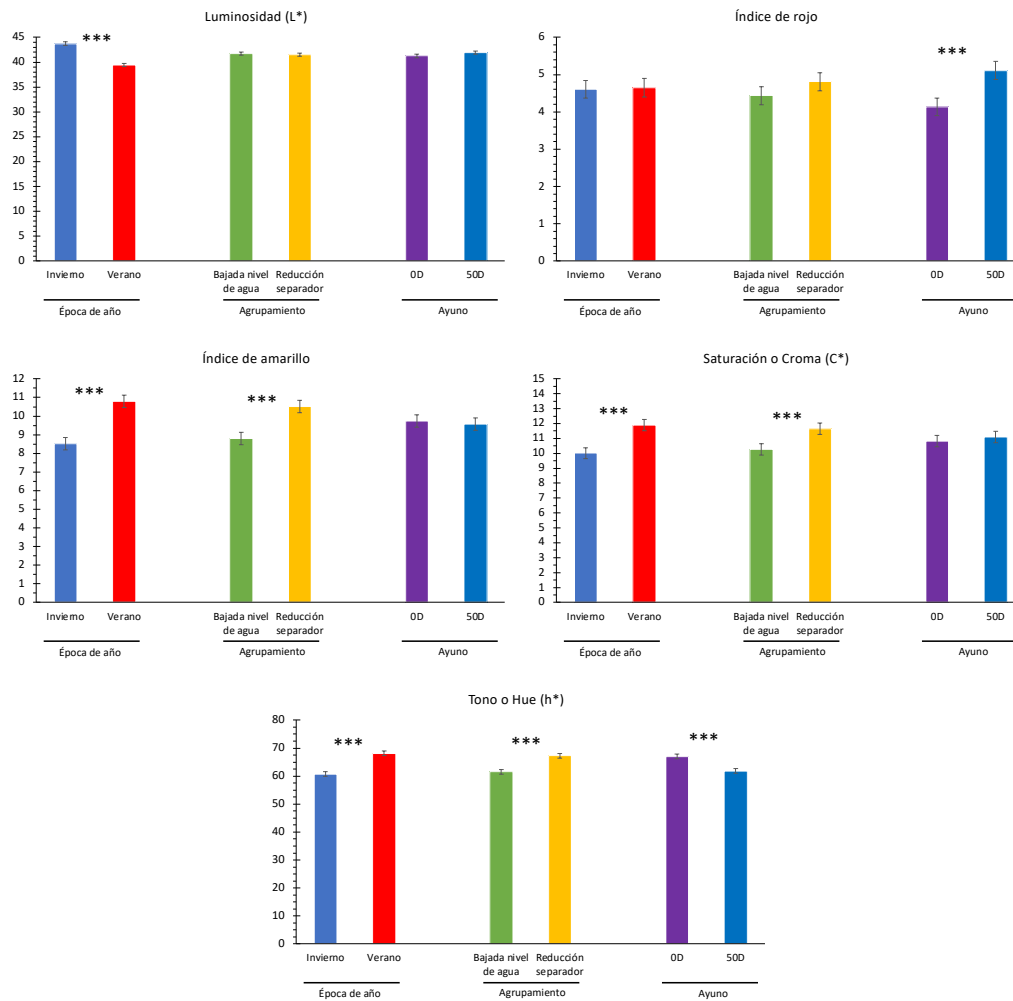


Figura 1.41.- Parámetros de color del músculo inicialmente a 0h *post-mortem* de las truchas en función de la época del año, del sistema de agrupamiento y del ayuno

En la figura 1.42 se presentan los resultados de los parámetros de color del músculo tomamos a las 24 horas *post-mortem*. Observamos cómo hay un cambio del efecto de los factores estudiados, donde se aprecia que los peces sacrificados en invierno cambian a una tonalidad más oscura, por tener una menor luminosidad (L^*), un menor índice de rojo (a^*) y una menor saturación (C^*), mientras que el tono (h^*) se encuentra incrementado.

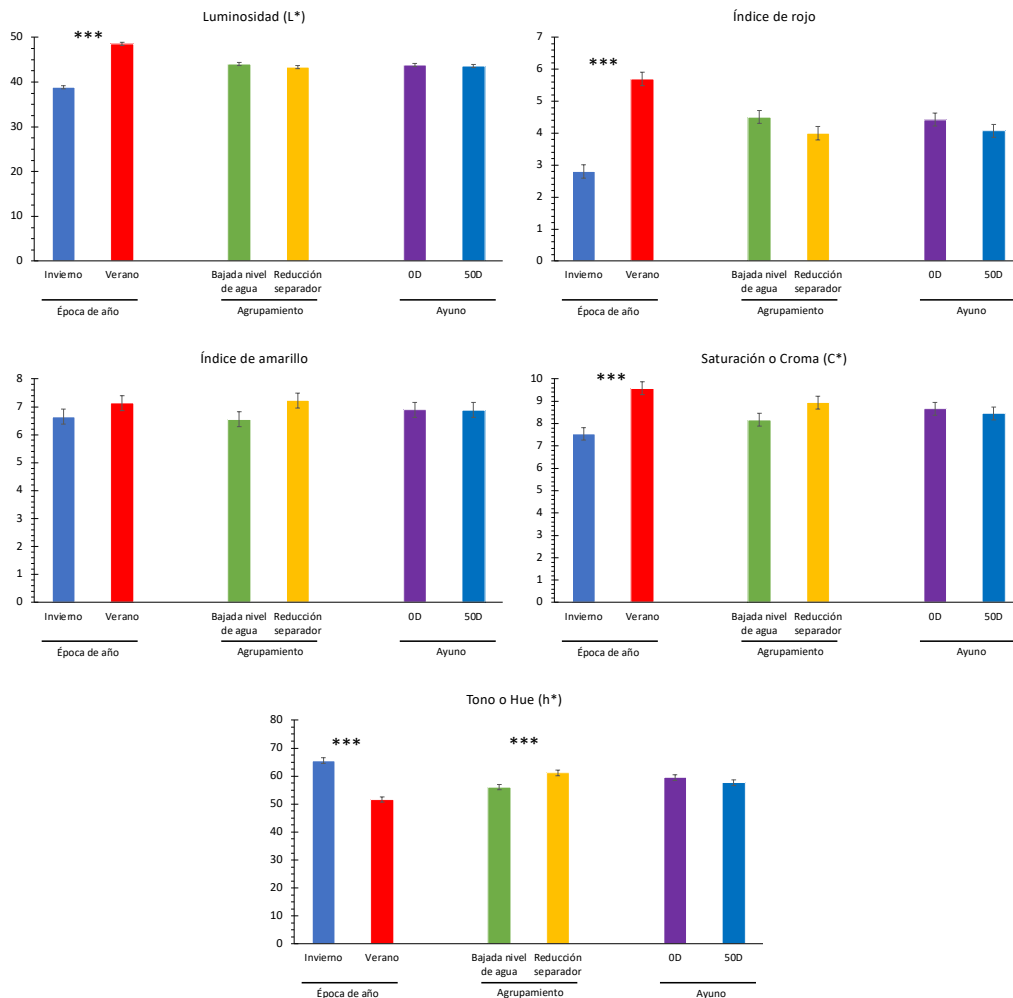


Figura 1.42.- Parámetros de color del músculo a las 24h *post-mortem* de las truchas en función de la época del año, del sistema de agrupamiento y del ayuno

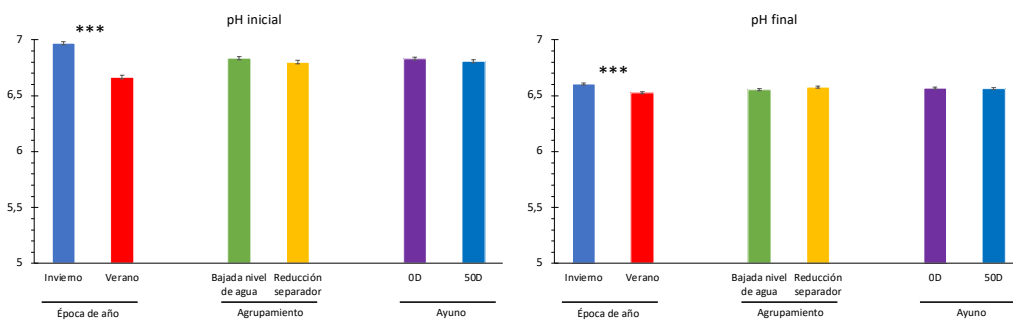


Figura 1.43.- pH muscular inicial 0 horas y final 24 horas *post-mortem* de las truchas en función de la época del año, del sistema de agrupamiento y del ayuno

En la Figura 1.43 se presentan los valores de pH muscular inicial 0 horas y final 24 horas *post-mortem*. Se puede observar cómo solamente encontramos un efecto de la época del año, siendo los peces sacrificados en invierno los que inicialmente mantienen un mayor pH y a las 24 horas *post-mortem* siguen manteniéndolo, pero se ve una reducción con respecto a los peces sacrificados en verano. Estas truchas parten de un pH inicial mucho más bajo y baja pero relativamente muy poco con respecto al inicial.

La Figura 1.44 presentan los resultados del establecimiento y posible resolución de *rigor mortis* en las truchas. Se observa cómo únicamente la época del año tiene un gran efecto sobre el establecimiento del *rigor mortis* donde el invierno se establece mucho más rápido que en verano, sin embargo, tras 24 horas *post mortem* este efecto de la época del año no se observa, mostrando un ángulo similar de *rigor mortis* en todos los peces independientemente de la época del año, el tipo agrupamiento y del ayuno

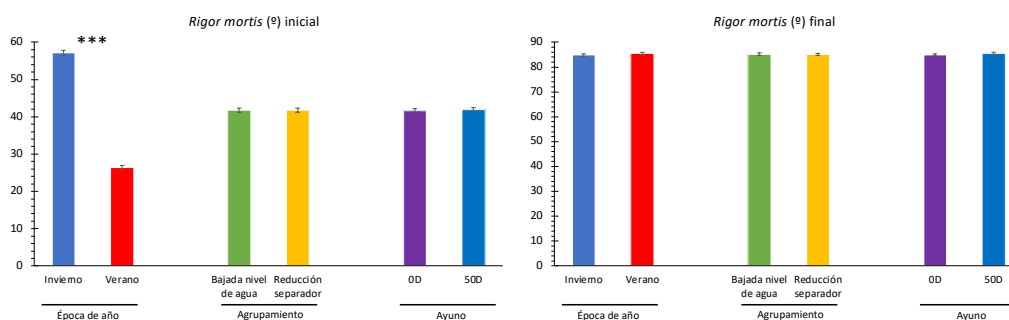


Figura 1.44.- Ángulo de *rigor mortis* inicial 0 horas y final 24 horas *post-mortem* de las truchas en función de la época del año, del sistema de agrupamiento y del ayuno

- *Incidencias:*

No se ha tenido ninguna incidencia respecto al proyecto, excepto que se han cambiado el orden las pruebas primero se ha realizado la experiencia de verano y posteriormente se realizó en diciembre del año 2022, la prueba de temperatura baja del agua en invierno.

Actividad 1.4 Determinación de la respuesta de estrés y calidad de la carne de truchas arcoíris sometidas a tres tiempos de ayuno pre-sacrificio (24 horas, 5 días o 10 días), comparando invierno y verano.

Incluir, para cada una de las actividades en desarrollo o finalizadas, la siguiente información:

- *Entidades participantes:* UCM
- *Presupuesto inicial y Presupuesto ejecutado*

	2021	2022	2023
Presupuesto inicial	31.905,54 €	19.310,55 €	13.204,91€
Presupuesto ejecutado	—	—	—

Figura 1.45

Tal como aparece en la memoria económica - JUSTIFICACIÓN GASTOS PROYECTO WELLSTUN. La Universidad Complutense no ha podido imputar ningún gasto al proyecto de referencia hasta la fecha, debido a que tanto la gestión de adquisición de material fungible e inventariable, como la de subcontratación se encuentran en trámites, estando comprometido el crédito correspondiente, pero en período de aprobación de ejecución y de facturación.

- *Descripción de las tareas y trabajos realizados*

Dentro del WP1, Evaluación del efecto de los procedimientos pre-cosecha que son importantes a nivel comercial en el bienestar y calidad del pescado que estaba incluido dentro del primer Objetivo Especifico (OE1) y en relación con la Tarea 1.4. el objetivo marcado fue evaluar el tiempo de ayuno sobre la respuesta de estrés y la calidad de carne de truchas sometidos a tres tipos de ayuno (24 horas, 5 y 10 días), debido a la gran repercusión que tiene en la trucha la temperatura del agua se realizarán en dos épocas muy diferentes donde la temperatura del agua será muy diferente como son verano e invierno.

El objetivo marcado en esta tarea se ha cumplido al 100 % y se han desarrollado de todas las actividades planteado en el proyecto. Para ello se adquirieron 700 truchas a una piscifactoría comercial de trucha arcoíris localizada en Guadalajara, que suministró truchas de tamaño ración de 300 a 400 g y se transportaron a las instalaciones del piscifactoría de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Montes, Forestal y del Medio Natural.

En la piscifactoría de la Escuela los peces mantuvieron durante una semana en los tanques o "raceways" y transcurrido ese tiempo se hicieron lotes con biomasa similar en cada lote en 6 grupos (120 x 70 cm) para realizar tres réplicas por tiempo de ayuno, cada de lote 55 truchas por réplica para tener aproximadamente una biomasa de 15 kg/m³, similar a un tipo comercial. Las truchas durante esta adaptación fueron alimentadas dos veces al día con una tasa del 1,7 % de su peso vivo (nivel recomendado en trucha arcoíris con una temperatura del agua de 12-17 °C; NRC, 1981).

Se llevaron a cabo dos pruebas idénticas en dos estaciones diferentes, invierno y verano, para poder observar el efecto de la temperatura del agua como principal factor medioambiental, junto con otros factores como son el fotoperiodo, la intensidad lumínica, etc. sobre los parámetros determinados. Se sometió a cada grupo de peces a los tiempos de ayuno y tras lo cual se sacaron 12 truchas de cada uno de los tiempos en menos de 3 minutos se procedió al sacrificio de los mismos de forma individual mediante el sistema "ikijime", consistente en la introducción de un émbolo penetrante en el cerebro del pez para provocar la destrucción de la masa cerebral y de esa forma provocar la inconsciencia del mismo y su muerte. Con este sistema de aturdimiento nos acogemos a la necesidad de que el aturdimiento debe de ser inferior a 1 segundo y que no produzca percepción del dolor durante la muerte del animal. Tras esta sacrificio de los peces se les pesó, se les midió y se les extrajo una muestra de sangre a partir de la vena caudal. La sangre se trasvasó a dos tubos uno con anticoagulante, EDTA para obtener plasma y otro con FNa para evitar el uso de glucosa por parte de los eritrocitos y obtener suero. Inmediatamente se centrifugaron a 6.000 rpm durante 5 minutos y el plasma y el suero alicuotaron en otros botes de 1,5 ml para su congelación a -32 °C y poder realizar posteriormente los análisis sanguíneos de cortisol, glucosa, lactato, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados y actividades enzimáticas como la lactato deshidrogenasa (LDH) y la creatinina fosfoquinasa (CPK).

Para la tomaron muestras de hígado y músculo se congelar en nitrógeno líquido para la determinación de la concentración de glucógeno hepático y muscular. Se midió el color de la piel de estos animales, en hígado se cuantificó el color hepático y el color muscular, además se tomó el pH del músculo y en otros 10 peces de valoró el establecimiento del *rigor mortis*. Además se tomaron muestras para valorar parámetros de expresión génica en las truchas relacionadas con las funciones básicas de respuesta de estrés, pero como la última toma de muestras fue en verano están todavía procesándose para la obtención de resultados, ya que para evitar distorsiones en las evaluación se remitieron todas la muestras en congelación en dos tandas separadas 1 mes en el junio y julio tal como aparece en la memoria económica del proyecto.

- *Subcontrataciones:*

En esta tarea se ha realizado la subcontratación de la UAB, para la realización de los análisis de expresión génica en las truchas relacionadas con las funciones básicas de respuesta de estrés y de funciones metabólicas y energéticas.

- *Resultados obtenidos:*

Los resultados obtenidos en esta prueba comparando los grados días de ayuno se presentan a continuación:

Bioquímica sanguínea:

En la Figura 1.46 se presentan los resultados de los parámetros bioquímicos analizados en las truchas en función de la época del año, la tipo de agrupamiento y el ayuno.

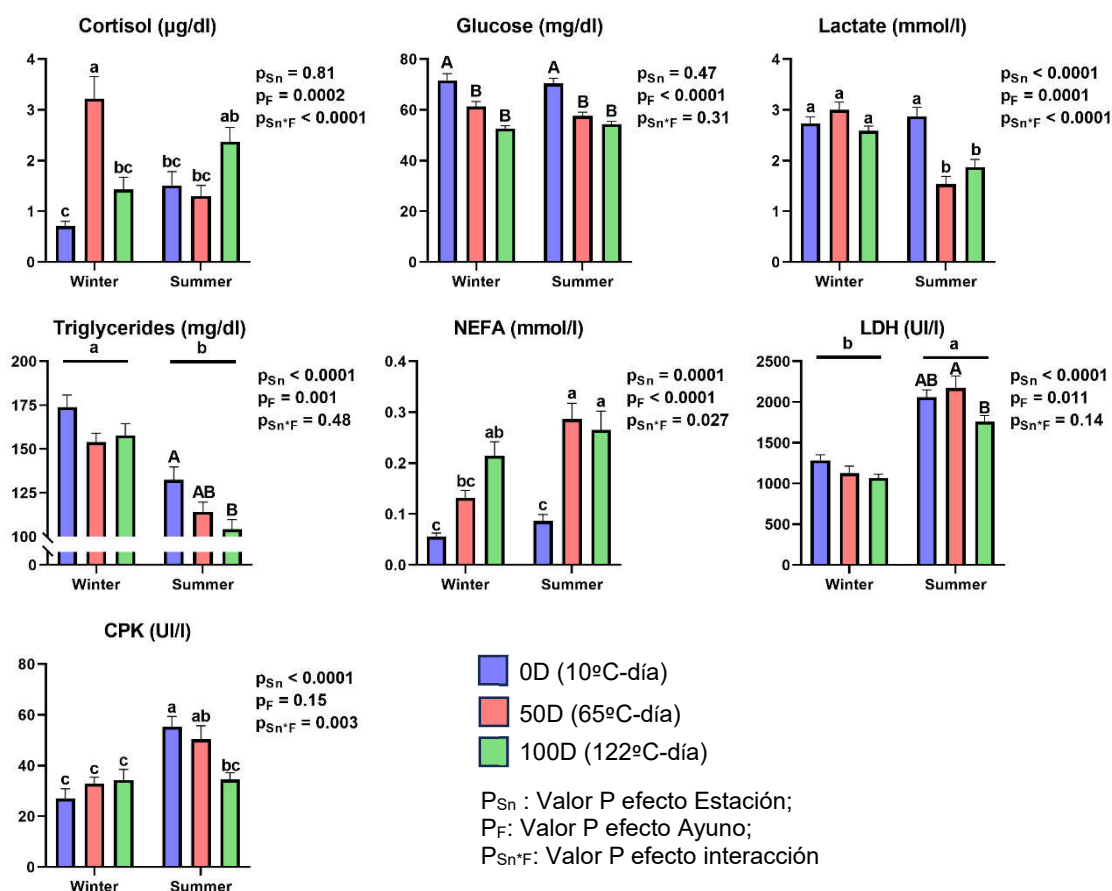


Figura 1.46 .- Respuesta fisiológica de las truchas en función de la época del año y del ayuno

En la figura 1.46 se observa como la época del año tiene un efecto sobre los parámetros fisiológicos provocando un aumento de la concentración de triglicéridos y LDH, pero lo más importante es que la respuesta de estrés depende del tipo de ayuno en relación con la época del año, así los peces en verano independientemente del tipo de ayuno no existen diferencias entre ellos, pero en invierno sin tiempo de ayuno son los que muestran una menor concentración de cortisol. En relación con otros parámetros sanguíneos encontramos que las concentraciones de glucosa se encuentran reducidas al aumentar el tiempo de ayuno, lo mismo que los triglicéridos, sin embargo los ácidos grasos libres

van en sentido contrario, aumentan al aumentar el tiempo de ayuno que está asociado con las necesidades de los peces a emplear los ácidos grasos como fuente de energía ante la falta de alimento. Las dos actividades enzimáticas cuantificadas la LDH y la CPK son mayores en verano que invierno, pero la actividad de las enzimas se reduce al aumentar el tiempo de ayuno en verano pero en invierno es igual para los tres tiempos de ayuno estudiados.

Parámetros de respuesta de estrés:

En la Figura 1.47 se presenta los parámetros de color del hígado. Se puede observar como la época del año afecta al color hepático. Aunque existe una interacción entre ambos factores estudiados para el índice de amarillo (b^*), la saturación (C^*) y el tono (h^*). Observamos que los peces sacrificados en invierno muestran un color más claro por tener mayor luminosidad (L^*), mayor índice de amarillo (b^*), mayor tono (h^*) y menor índice de rojo (a^*). En relación con el ayuno se puede decir que con el aumento del tiempo de ayuno el color de hígado se vuelve más oscuro pero solamente en invierno por tener el grupo 100 D mayor valor b^* , C^* y h^* .

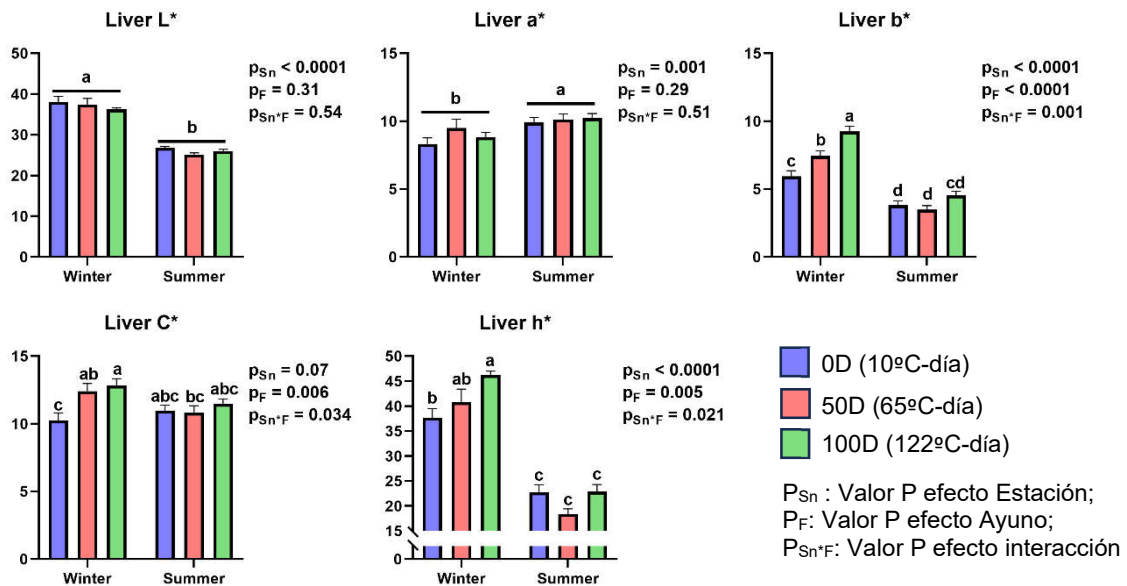


Figura 1.47.- Parámetros de color hepático de las truchas en función de la época del año y del ayuno

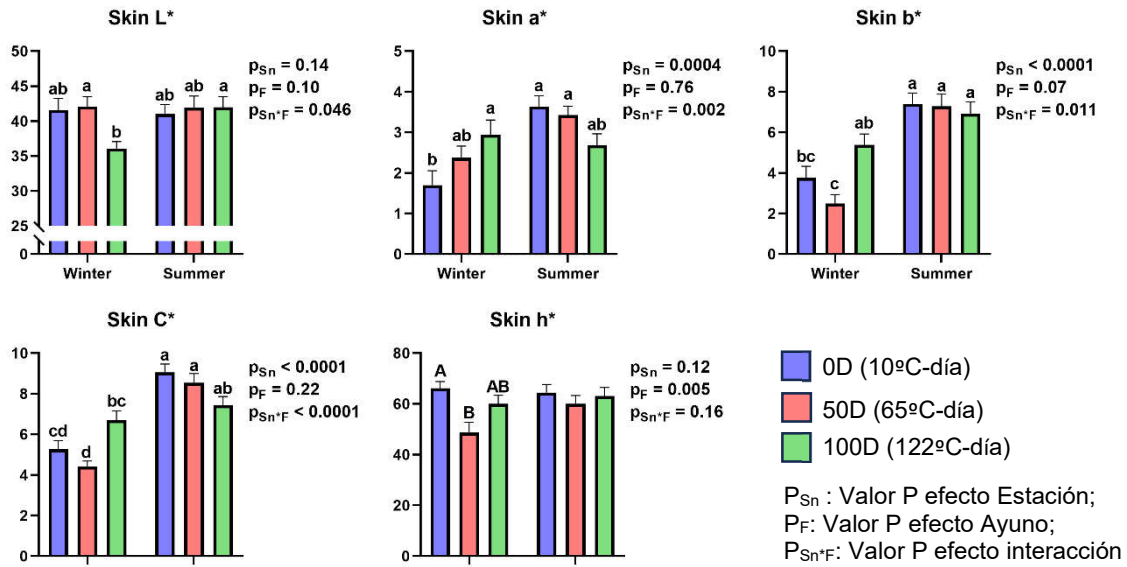


Figura 1.48.- Parámetros de color de la piel de las truchas en función de la época del año y del ayuno

La Figura 1.48 muestra el resultado de los parámetros de color de la piel. En la gráfica podemos observar la respuesta de la coloración de la piel depende en gran medida de la época del año donde se produce el ayuno así en verano al aumentar el tiempo de ayuno los peces se vuelven a tener una tonalidad más clara, mientras que en invierno es al contrario, donde se observa una reducción de la luminosidad (L^*) y un aumento del índice de rojo (a^*), del índice de amarillo (b^*) y de la saturación (C^*). En embargo en verano esto se produce en sentido contrario.

En la figura 1.49 se presentan los resultados de la concentración hepática y muscular de glucógeno.

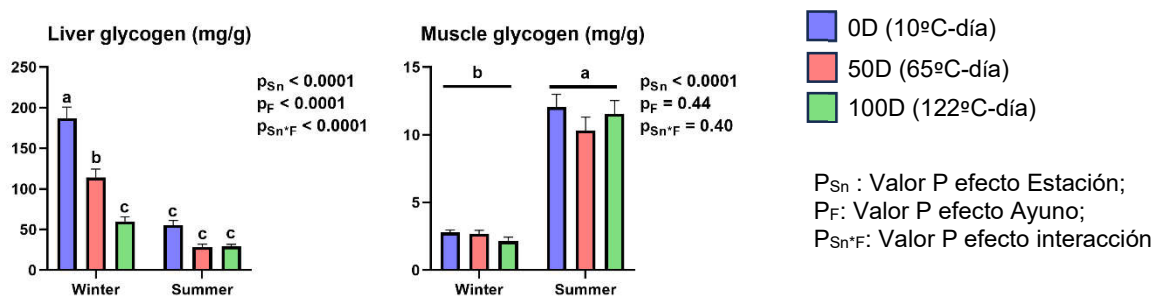


Figura 1.49 .- Concentración hepática y muscular de glucógeno en función de la época del año y del ayuno

Se observa una interacción significativa para la concentración de glucógeno hepático, donde en invierno la reducción con el tiempo de ayuno es significativa, mientras que en verano los peces muestran una muy baja concentración de glucógeno hepático y no hay diferencias por el tiempo de ayuno. En el caso de músculo la mayor concentración de glucógeno se presenta en verano no habiendo un efecto por el tiempo de ayuno.

Parámetros de calidad de carne:

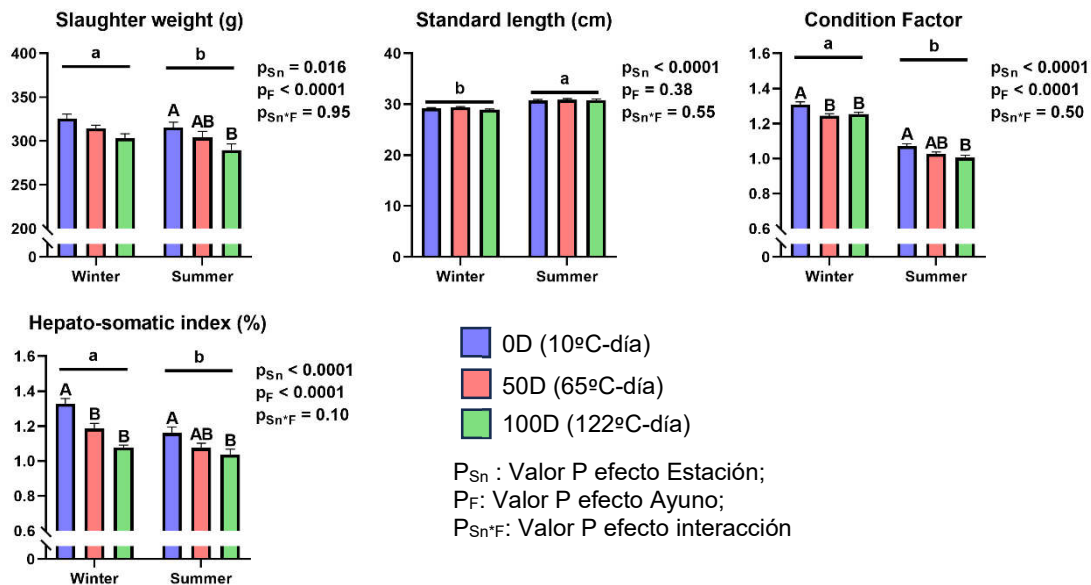


Figura 1.50.- Peso al sacrificio, longitud, factor de condición e índice hepato-somático en función de la época del año y del ayuno

En la figura 1.50 se puede observar que aunque en el peso de peces en verano es ligeramente inferior, aunque provenían de la misma piscifactoría unos 10 g menos que los de invierno, sin embargo en cuando al tamaño eran ligeramente más largos. Esto puede ser debido a que en verano los peces dejan de comer por tener una temperatura más alta del agua y provoca un reducción de la condición corporal como se ha observado como en verano el factor de condición es inferior lo mismo que ha sucedido con el hígado. El ayuno se ha provocado una reducción de tamaño corporal y una reducción del factor de condición y el índice hepato-somático.

En la Figura 1.51 se muestran los resultados de la época del año y el ayuno sobre el color de músculo a tiempo inicial 0 horas después de sacrificio. Se observa un efecto significativo de la época del año, donde los peces sacrificados en invierno tienen una coloración más clara por tener más luminosidad (L^*), menos índice de amarillo (b^*), croma (C^*) y tono (h^*). El ayuno ha provocado que la carne de los peces sea más clara al aumentar el tiempo de ayuno.

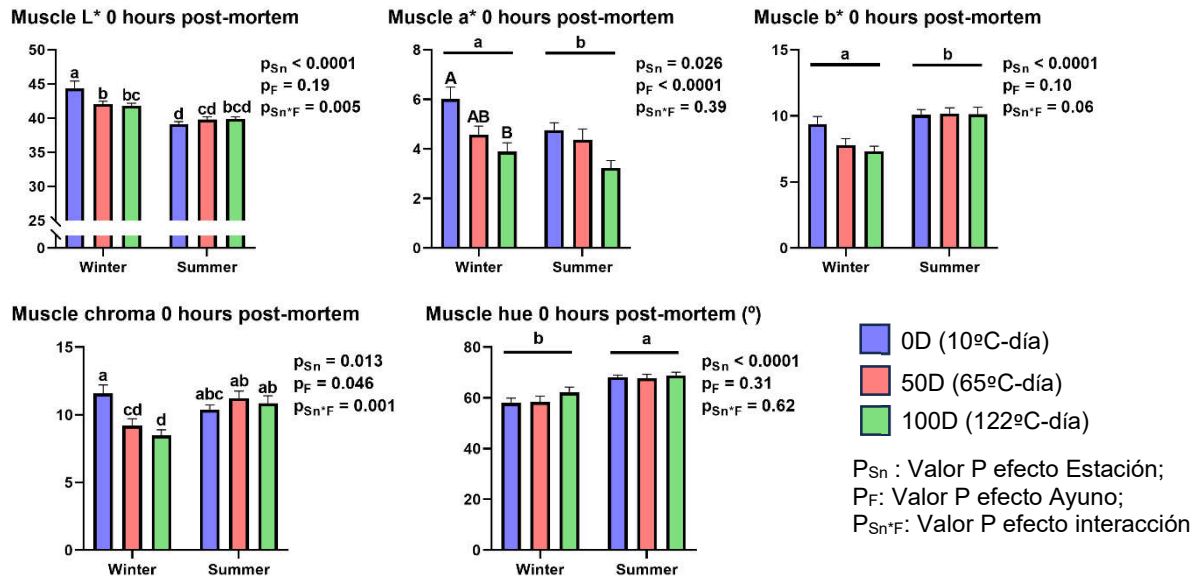


Figura 1.51.- Parámetros de color del músculo inicialmente a 0h *post-mortem* de las truchas en función de la época del año y del ayuno

En la figura 1.52 se presentan los resultados de los parámetros de color del músculo tomados a las 24 horas *post-mortem*. Observamos cómo hay un cambio del efecto de los factores estudiados, donde se aprecia que los peces sacrificados en invierno cambian a una tonalidad más oscura, por tener una menor luminosidad (L^*) y un menor índice de rojo (a^*), mientras que el tono (h^*) se encuentra incrementado. En relación con el ayuno se puede decir que tienen coloración también más oscura al aumentar el tiempo de ayuno por reducirse el índice de amarillo (b^*) y el tono (h^*).

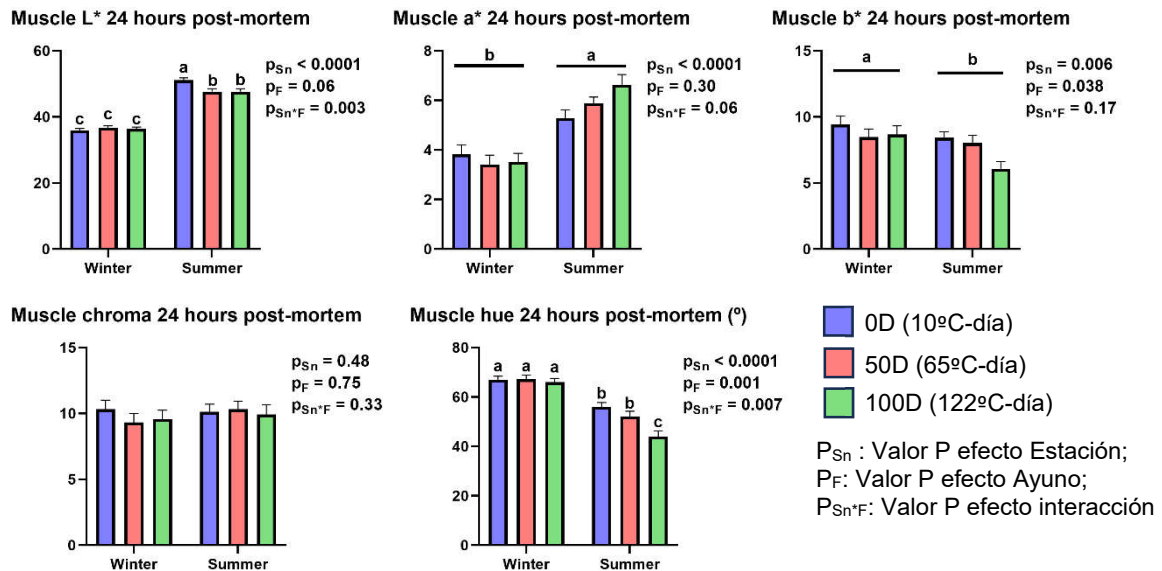


Figura 1.52.- Parámetros de color del músculo a las 24h *post-mortem* de las truchas en función de la época del año y del ayuno

En la Figura 1.53 se presentan los valores de pH muscular inicial 0 horas y final 24 horas *post-mortem*. Se puede observar cómo solamente encontramos un efecto de la época del año en el pH inicial siendo más elevado en los peces sacrificados en invierno que los sacrificados en verano y que no existe efecto del tipo de ayuno. A las 24 horas *post-mortem* si que observamos un efecto del tiempo de ayuno, siendo más elevado con el

tiempo de ayuno este es muy interesante porque indica que la calidad del producto se puede encontrar reducida, porque las truchas cuando llegan al punto final de venta han transcurrido más de 24 horas.

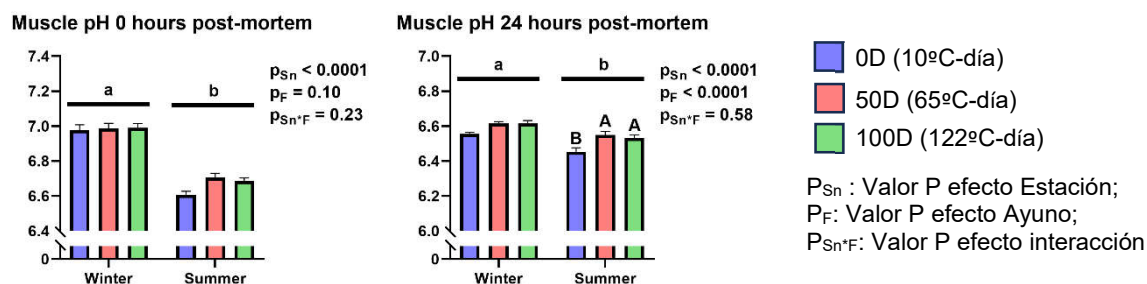


Figura 1.53.- pH muscular inicial 0 horas y final 24 horas *post-mortem* de las truchas en función de la época del año y del ayuno

La Figura 1.54 presentan los resultados del establecimiento y posible resolución de *rigor mortis* en las truchas. Se observa cómo la época del año tiene un gran efecto sobre el establecimiento del *rigor mortis* donde el invierno se establece mucho más rápido que en verano, sin embargo, tras 24 horas *post mortem* este efecto de la época del año se observa al contrario, las truchas mantienen un ángulo de *rigor mortis* más elevado. En relación con el ayuno solamente se observa que en verano el establecimiento del *rigor mortis* se produce más tarde en los peces sometidos a tiempos de ayuno más prolongado y que las 24 horas este efecto no se observa.

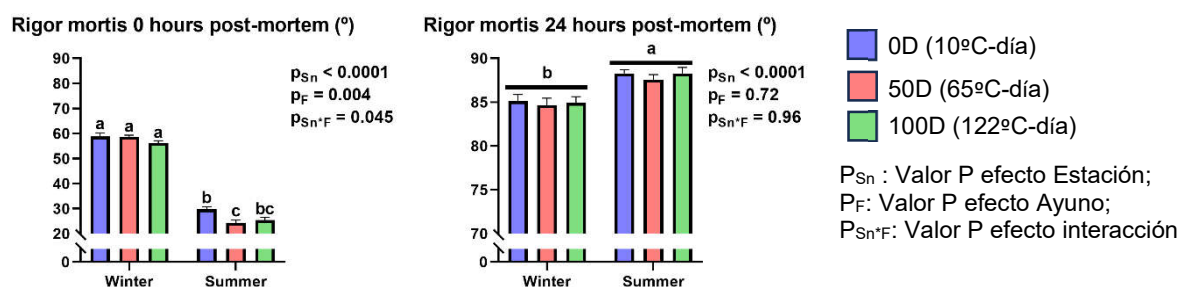


Figura 1.54.- Ángulo de rigor mortis inicial 0 horas y final 24 horas *post-mortem* de las truchas en función de la época del año y del ayuno

- Incidencias

No se ha tenido ninguna incidencia respecto al proyecto, excepto que se han cambiado el orden las pruebas primero se ha realizado la experiencia de verano y posteriormente se realizó en diciembre del año 2022, la prueba de temperatura baja del agua en invierno.

Actividad 2.1 Validación de parámetros comportamentales

Incluir, para cada una de las actividades en desarrollo o finalizadas, la siguiente información:

- Entidades participantes IRTA, IMEDEA

- *Presupuesto inicial y Presupuesto ejecutado*

- Se ha ejecutado el 100% del presupuesto asignado a esa actividad ya que se ha adquirido todo lo requerido para completar esta actividad, aunque parte de ella, la correspondiente a los experimentos de invierno, todavía no se ha desarrollado.

- *Descripción de las tareas y trabajos realizados*

En esta tarea se llevó a cabo el experimento propuesto siguiendo el diseño experimental del proyecto. Los indicadores fueron validados con 20 peces que fueron anestesiados y recuperados.

- *Subcontrataciones*

No hubo subcontrataciones para esta actividad

- *Resultados obtenidos*

- **Indicadores de consciencia**

En la Figura 2.1 se presentan los tiempos de aparición de los diferentes indicadores de consciencia según diferentes dosis de anestesia. Se observa como conforme aumenta la dosis de anestesia administrada disminuye el tiempo de aparición de los diferentes indicadores de consciencia. En el caso de la dosis de anestesia más baja (125mL a 20 g /L en 40 L de agua de mar; 62 ppm), los individuos tardan en dejar de respirar unos 12,5 minutos de media, mientras que para las dosis más altas este indicador aparece a los 80 segundos de exposición al anestésico. Por otro lado, para las dosis más altas (350 y 437 ppm; 700 y 875 mL de anestésico en 40L) no se observan diferencias en el tiempo de aparición de los diferentes indicadores.

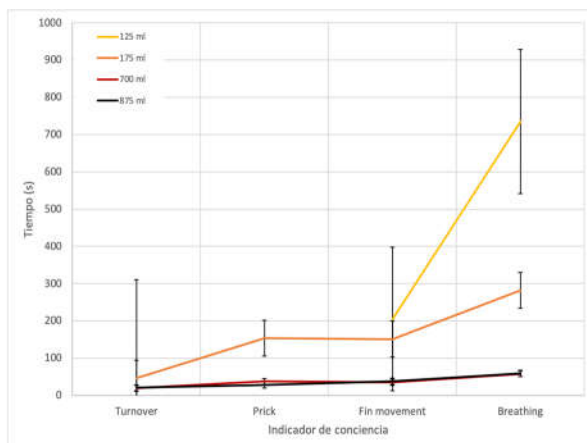


Fig.2.1 – Indicadores de consciencia vs. Tiempo
Incidencias

No se detectaron incidencias en el desarrollo de la actividad.

2.2 Caracterización del perfil electroencefalográfico de peces conscientes/inconscientes y muertos con el fin de validar los indicadores comportamentales.

Incluir, para cada una de las actividades en desarrollo o finalizadas, la siguiente información:

- *Entidades participantes* IRTA IMEDEA

-

- *Presupuesto inicial y Presupuesto ejecutado*

- Se ha ejecutado el 100% del presupuesto asignado a esa actividad ya que se ha adquirido todo lo requerido para completar esta actividad, aunque parte de ella, la correspondiente a los experimentos de invierno, todavía no se ha desarrollado.

-

- *Descripción de las tareas y trabajos realizados*

La actividad fue desarrollada de acuerdo al diseño experimental propuesto y se tomaron muestras de sangre cuyos resultados se presentan y muestras de tejidos para biología molecular que serán analizadas en la UAB (subcontratación). También se llevaron a cabo registros de electroencefalograma (EEG) y de las actividades muscular y cardíaca.

- *Subcontrataciones*

En esta tarea está prevista la subcontratación, pero tal como aparece en la memoria se subcontrata la UAB para análisis de biología molecular

- *Resultados obtenidos*

Los individuos utilizados para este experimento presentaron una longitud estándar media ($SL \pm SD$) de $31,38 \pm 2,95$ cm, longitud total media ($TL \pm SD$) de $34,85 \pm 3,40$ cm y un peso húmedo medio ($WW \pm SD$) de $492,15 \pm 121,76$ g. No existen diferencias significativas en la biometría de los individuos de los distintos tratamientos.

En la figura 2.2 se muestran los tiempos de aparición de los diferentes indicadores de consciencia para cada técnica de sacrificio (Ikejime, agua con hielo y anestesia a 350 ppm). Se ha utilizado la prueba ANOVA y el test post-hoc de Tukey para comprobar la significación de las diferencias entre tratamientos. En el gráfico se observa como el tiempo de desaparición del movimiento de las aletas es significativamente mayor en el tratamiento de agua con hielo ($t = 600$ s) que en Ikejime y anestesia ($t = 112,09 \pm 34,72$ s y $t = 83,5 \pm 17,68$ s respectivamente) ($p < 0.05$). También existen diferencias en el tiempo que tardan en dejar de respirar los individuos sacrificados con agua con hielo ($t = 1279,6 \pm 683,28$ s), siendo éste significativamente mayor que en los otros dos tratamientos ($t_{Ikejime} = 228,3 \pm 99,22$ s y $t_{anestesia} = 96,5 \pm 33,098$) ($p < 0.05$).

-

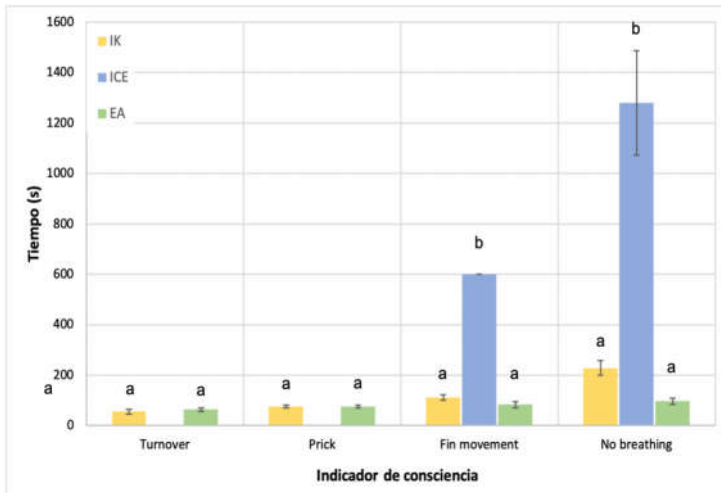


Fig. 2.2 – Indicadores de consciencia vs. Tiempo por cada técnica de sacrificio

Frecuencia cardíaca por técnica de sacrificio

En la figura 2.3 se presenta la frecuencia cardíaca media a lo largo del tiempo de sacrificio (30 minutos antes del sacrificio y 60 minutos después). La línea continua corresponde a la frecuencia cardíaca basal media de individuos control ($HR_{24h} = 69,89 \pm 1,60$ bpm). Las líneas discontinuas indican la frecuencia cardíaca basal media durante el día y durante la noche ($HR = 76,39 \pm 2,19$ bpm y $HR = 63,03 \pm 1,77$ bpm respectivamente). En los individuos sacrificados mediante Ikejime se alcanzan valores de frecuencia cardíaca indetectables a los 30 minutos del inicio del sacrificio. En el caso de los individuos tratados con anestesia el valor indetectable se alcanza a los 36 minutos del inicio del sacrificio, mientras que para los individuos sacrificados con agua con hielo la frecuencia cardíaca no es indetectable hasta los 48 minutos. Estos resultados se comentan más detalladamente para cada técnica de sacrificio. Así pues, los individuos sacrificados mediante agua con hielo tardan significativamente más tiempo en perder la señal de ritmo cardíaco que los individuos sacrificados mediante cualquiera de los otros dos métodos estudiados.

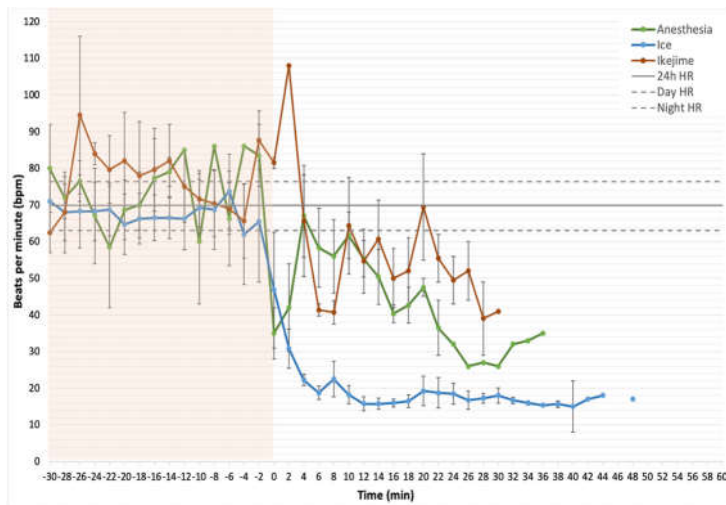


Fig.2.3 – Frecuencia cardíaca a lo largo del tiempo en las diferentes técnicas de sacrificio

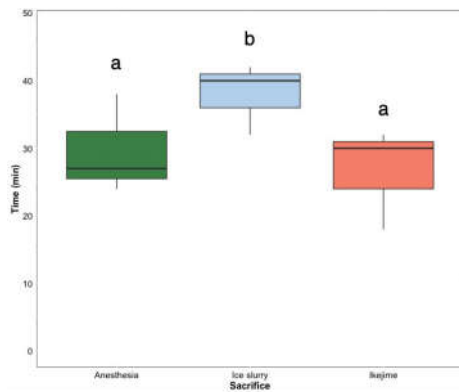


Figura 2.4

En la figura 2.5 se puede ver la frecuencia cardíaca media a lo largo del tiempo de sacrificio en individuos sacrificados mediante la técnica de Ikejime. La frecuencia cardíaca de los minutos previos al sacrificio muestra valores normales, con algunos picos por encima de la media diurna debido a las maniobras de manejo (1). En el momento del inicio del sacrificio se observa un

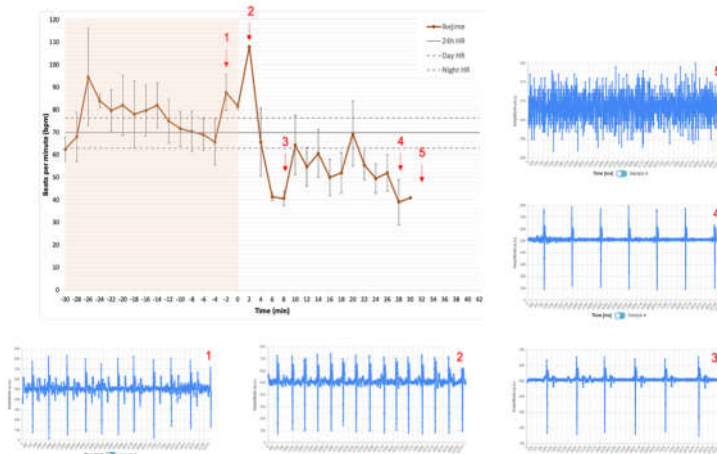


Fig.2.5 – Frecuencia cardíaca a lo largo del tiempo en individuos sacrificados mediante Ikejime.

aumento de la frecuencia cardíaca hasta los 108 bpm a causa de las maniobras de muestreo e inmovilización para realizar el sacrificio (2). Una vez realizado el sacrificio la frecuencia cardíaca media disminuye hasta llegar a los 40,6 bpm (3). El resto del tiempo analizado, la frecuencia cardíaca media se mantiene por debajo de la media basal, sugiriendo así un ritmo cardíaco latente (4). Finalmente, a los 30 minutos del inicio del sacrificio la frecuencia cardíaca se considera indetectable (5).

En la figura 2.6 se presenta la frecuencia cardíaca media a lo largo del tiempo de sacrificio en individuos sacrificados mediante sobredosis de anestesia. La frecuencia cardíaca de los minutos previos al sacrificio muestra valores normales. En el momento de inicio del sacrificio se observa una disminución de la frecuencia cardíaca hasta alcanzar valores muy inferiores al rango de medias basales. Posteriormente se observa un ligero aumento de la frecuencia cardíaca situado por debajo de la media basal (1). A partir del minuto 6 del inicio del sacrificio la frecuencia cardíaca disminuye progresivamente mostrando valores inferiores al rango de medias basales (2; 3) hasta alcanzar un valor mínimo de 26 bpm (4). Finalmente, a los 36 minutos del inicio del sacrificio la frecuencia cardíaca se considera indetectable

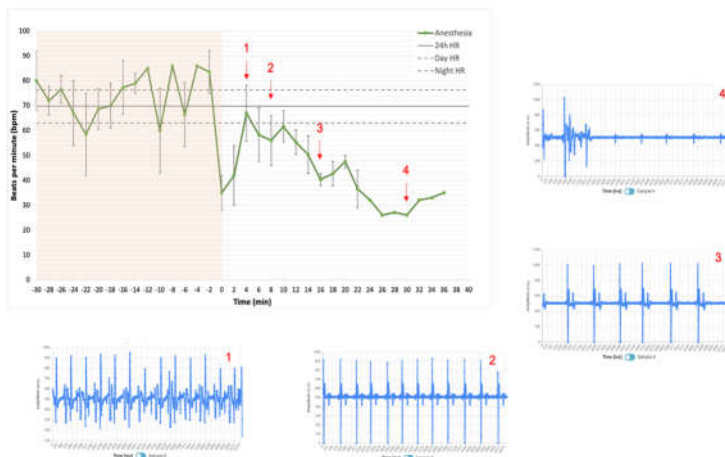


Fig.2.6 – Frecuencia cardíaca a lo largo del tiempo en individuos sacrificados mediante anestesia.

En la figura 2.7 se puede apreciar la frecuencia cardíaca media a lo largo del tiempo de sacrificio en individuos sacrificados mediante agua con hielo. La frecuencia cardíaca de los minutos previos al sacrificio muestra valores normales (1). En el momento de inicio del sacrificio se observa una disminución de la frecuencia cardíaca (2) hasta alcanzar valores muy inferiores al rango de medias basales (15,75 bpm) (3). Esta disminución de la frecuencia cardíaca se mantiene desde los 4 minutos del inicio del sacrificio hasta los 48 minutos, donde se observa un ritmo cardíaco latente (4a). A los 50 minutos la frecuencia cardíaca se considera indetectable (4b).

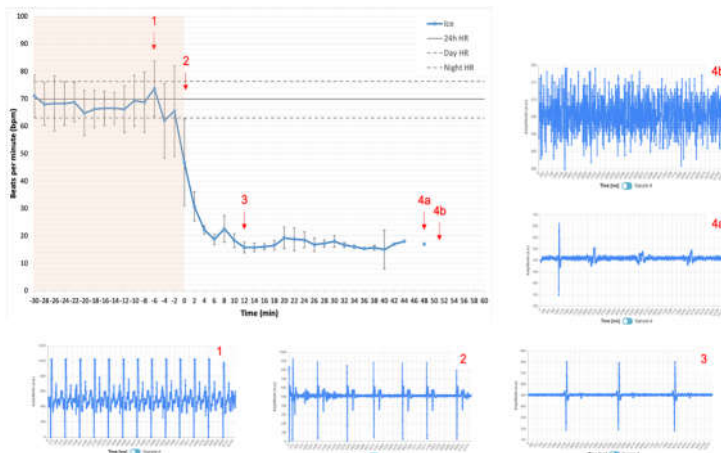


Fig. 2.7 – Frecuencia cardíaca a lo largo del tiempo en individuos sacrificados mediante agua con hielo.

En el caso de individuos sometidos a estrés previo al sacrificio (confinamiento o ayuno), se observa un aumento significativo del tiempo en que se tarda en perder la señal cardíaca en aquellos individuos sometidos a confinamiento/ayuno y sacrificados mediante agua con hielo en invierno (Fig. 2.8).

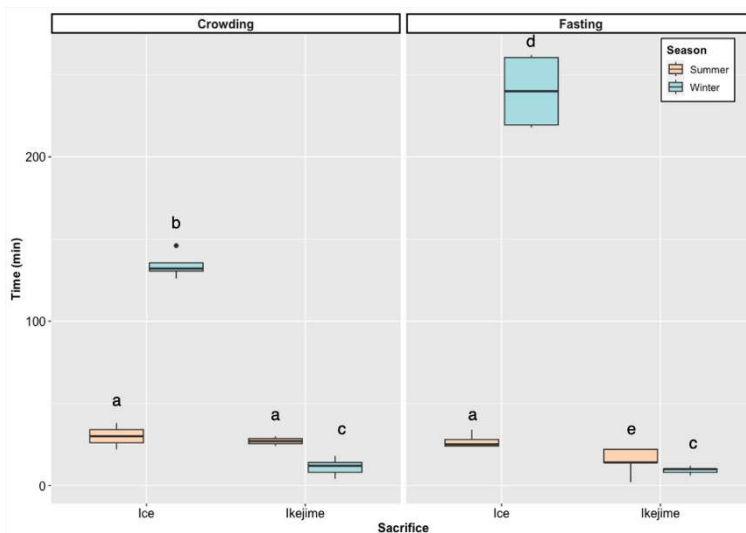


Figura 2.8. Tiempo de pérdida de señal de ritmo cardíaco durante el sacrificio de individuos sometidos a procedimientos estresantes pre-cosecha (confinamiento y ayuno).

- **Actividad cerebral por técnica de sacrificio**

A continuación, se muestran electroencefalogramas de individuos sacrificados mediante agua con hielo y mediante sobredosis de anestesia. En este caso no

se incluye la técnica de Ikejime, ya que ésta provoca lesiones en el cerebro, por lo que no se puede analizar la actividad cerebral de estos individuos mediante electroencefalogramas. En cada gráfica se muestra el índice de consciencia (qCON), el porcentaje de encefalograma plano observado en 30 segundos (BSR, brain suppression rate) y la tensión muscular (electromiograma; EMG). En la figura 2.9 se pueden ver los electroencefalogramas de 3 individuos sacrificados mediante sobredosis de anestesia. En el primer caso (a) se observa un primer efecto del anestésico a los 8 minutos de registro. A partir de entonces y durante 1,5 minutos se observa un estado de anestesia en el que qCON disminuye hasta 22. Posteriormente se observan aumentos y disminuciones sucesivas del coeficiente de consciencia, así como del BSR, sugiriendo que la anestesia no ha resultado efectiva a la hora de disminuir la actividad cerebral. En todo momento durante el sacrificio la tensión muscular (EMG) se mantiene en valores muy cercanos a 0.

En el segundo caso (b), el individuo no pierde la consciencia hasta los 25 minutos de inicio del sacrificio con anestesia. En este caso, la tensión muscular disminuye progresivamente hasta alcanzar valores muy cercanos a 0.

Por último, en la figura c se muestra el caso de otro individuo que alcanza el estado de anestesia profunda a los 8 minutos del inicio del sacrificio, entrando así en un estado de inconsciencia ($BSR > qCON$). Además, la figura muestra como en menos de 1 minuto el individuo pierde la tensión muscular ($EMG=0$).

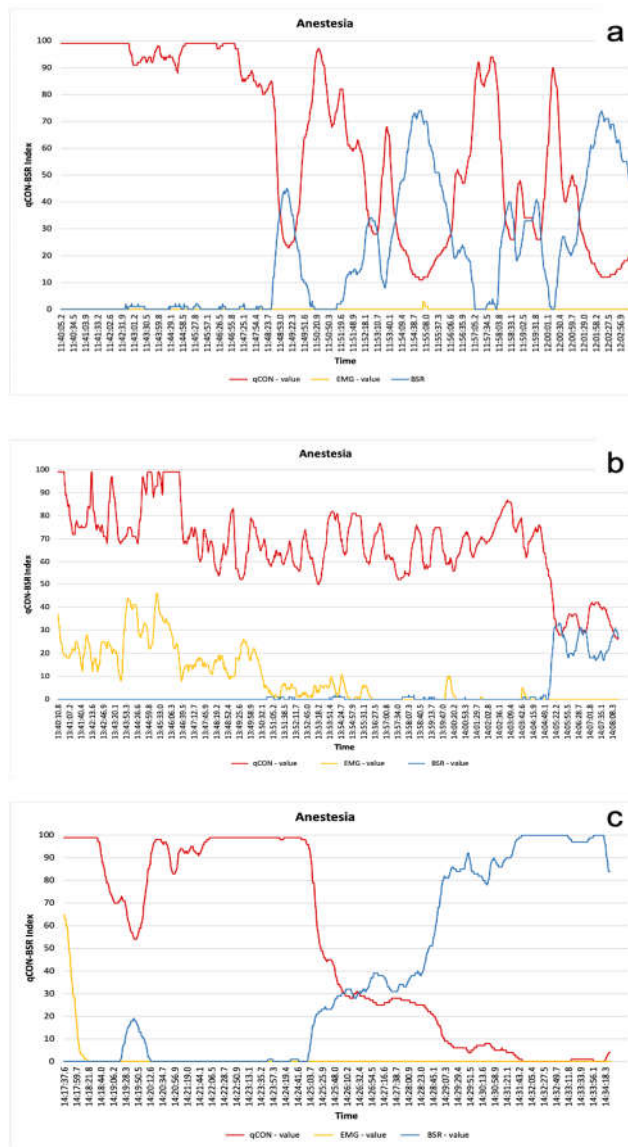


Fig.2.9 – Electroencefalograma realizado a 3 individuos durante el sacrificio mediante sobredosis de anestesia.

En la figura 2.10 se pueden observar los electroencefalogramas de 2 individuos sacrificados mediante agua con hielo. En el primer caso (a) no se observa la pérdida de consciencia hasta los 30 minutos del inicio del sacrificio. Además, durante este período de tiempo se observa una elevada tensión muscular ($EMG > 70$) en diferentes puntos, coincidiendo con los incrementos del coeficiente de consciencia. El individuo no entra en sedación hasta el minuto 25 y no es hasta los 30 minutos que alcanza el estado de inconsciencia ($BSR > qCON$).

En la figura 2.10 b se observa el caso de un individuo sacrificado mediante agua con hielo que no llega a perder la consciencia. En este caso, el método de sacrificio no resultó efectivo, ya que aunque se aprecia una disminución del coeficiente de consciencia ($qCON \approx 50$), existe una elevada tensión muscular

durante todo el tiempo de sacrificio y el porcentaje de electrograma plano se mantiene en valores muy bajos (BSR \approx 0).

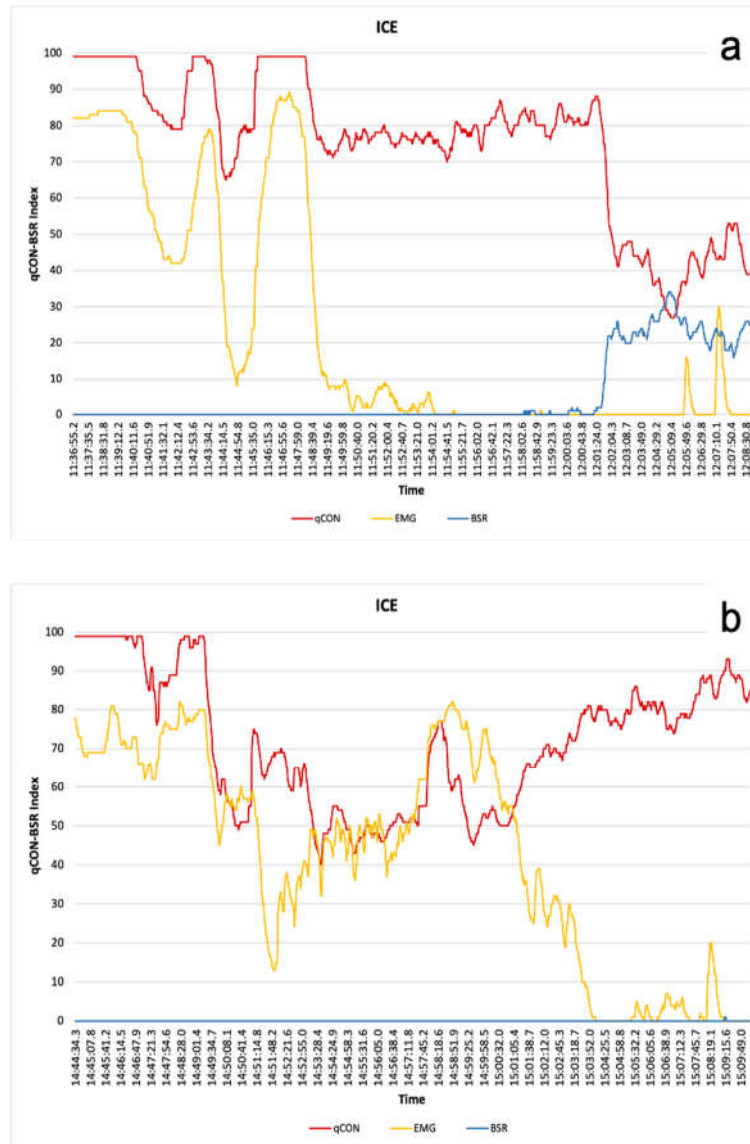


Fig.2.10 – Electroencefalograma realizado a 2 individuos durante el sacrificio mediante agua con hielo.

Análisis de plasma por técnica de sacrificio

En la figura 2.11 se presenta la concentración media de diferentes parámetros medidos en plasma de individuos sacrificados mediante Ikejime, agua con hielo y sobredosis de anestesia. Se ha utilizado la prueba ANOVA y el test post-hoc de Tukey para comprobar la significación de las diferencias entre tratamientos para cada parámetro. El nivel de pH de los individuos sacrificados mediante anestesia es significativamente más bajo que en las otras dos técnicas de sacrificio (p -valor $<$ 0.05). Los individuos sacrificados mediante Ikejime o agua

con hielo presentan valores de BE, TCO2 y HCO3 significativamente más elevados que aquellos sacrificados mediante anestesia (p-valor<0.05 en todos los casos). En el caso de PCO2 los valores entre anestesia e Ikejime difieren significativamente (p-valor<0.05) mientras que los valores de PCO2 de individuos sacrificados con agua con hielo no presentan diferencias significativas con ninguno de los otros dos tratamientos (p>0,05). Los individuos sacrificados mediante agua con hielo presentan valores de Na significativamente más bajos que los sacrificados mediante las otras dos técnicas (p-valor<0.05). Los valores de cortisol, glucosa, lactato y K no difieren significativamente entre técnicas de sacrificio (p > 0.05 en todos los casos).

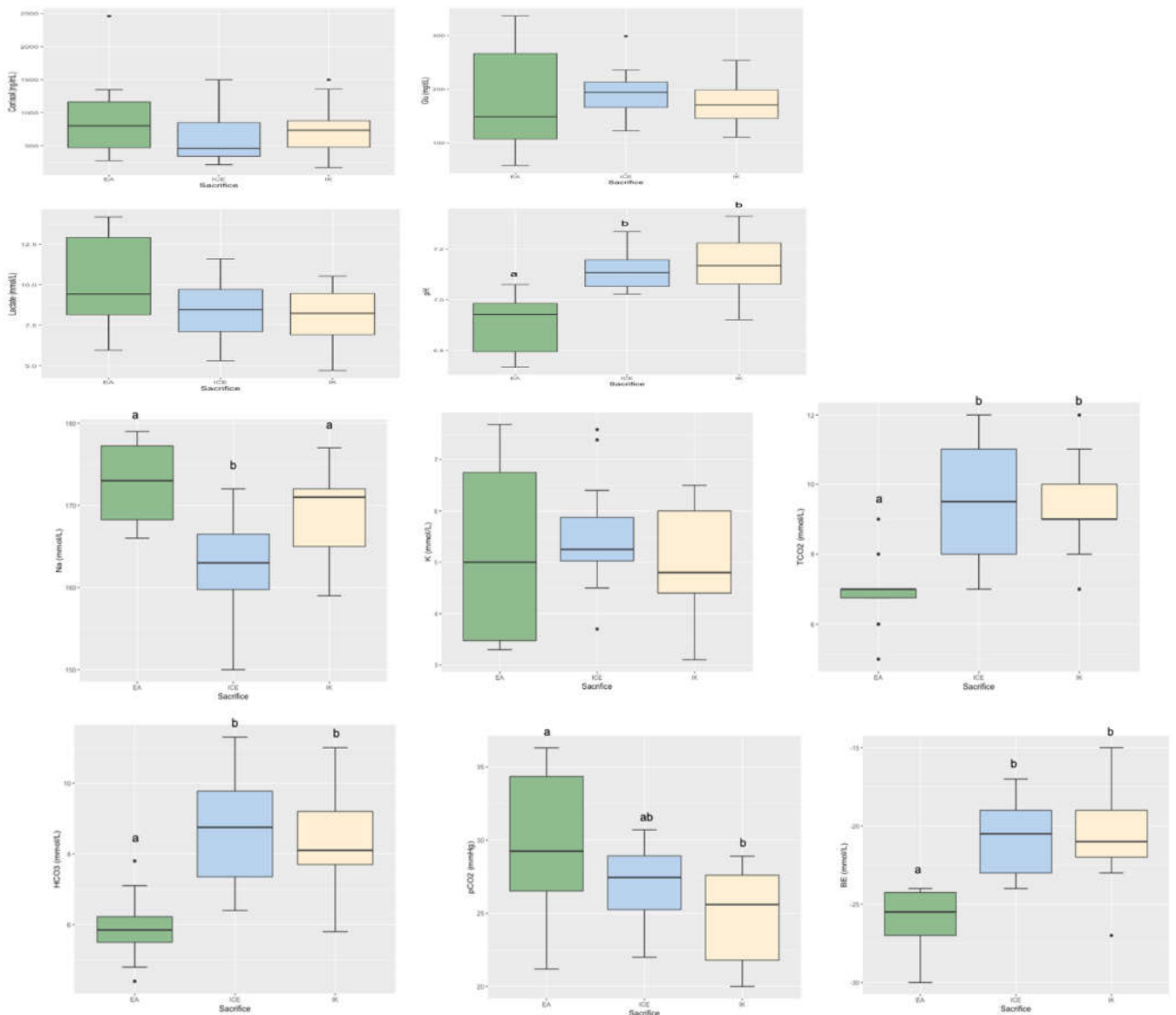


Fig.2.11 – Análisis de componentes en plasma.

Incidencias

No se detectaron incidencias en el desarrollo de la actividad.

Actividad 3.1 Aturdimiento de lubina en fases combinando bajas temperaturas con concentraciones crecientes de CO₂.

- Entidades participantes: ULPCG, IMIDA

- Presupuesto inicial y Presupuesto ejecutado:

- Se ha ejecutado el 100% del presupuesto asignado a esa actividad ya que se ha adquirido todo lo requerido para completar esta actividad, aunque parte de ella, la correspondiente a los experimentos de invierno, todavía no se ha desarrollado.

- Descripción de las tareas y trabajos realizados

Los procedimientos llevados a cabo en esta tarea han sido positivamente informados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (OEBA-ULPGC-35/2020) y autorizados por la Dirección General de Ganadería de la Consejería de agricultura, Ganadería y Pesca del Gobierno de Canarias.

Las lubinas utilizadas fueron criadas en las Instalaciones de Acuicultura de la Fundación Parque Científico Tecnológico de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, y provenían del stock de esta especie que se mantiene en dichas instalaciones. Un total de 40 peces, con un peso medio de 1.050 g fueron divididas en dos lotes de 20 individuos, sometiéndose cada lote a una metodología diferente de aturdimiento.

Se utilizó como grupo control el lote con aturdimiento mediante shock térmico simulando las actuales metodologías con las que trabajan las empresas que producen lubina en nuestro país, ajustando las condiciones acordes a las directrices de la Guía de Prácticas Correctas para el Sacrificio – Piscicultura UNE 173300 (AENOR, 2016). Así, se introdujeron las lubinas en un tanque de 300 l con una proporción de agua de mar/hielo de 1:1 (v/v).

Para el aturdimiento con gases, se testaron varias concentraciones de CO₂ en el agua (60, 100, 135 y 170 mg de CO₂/l) a diferentes temperaturas (23, 14 y 9°C) y con el apoyo de un gas inerte como el argón para intentar reducir los tiempos hasta lograr la inconsciencia de los peces. Las condiciones finalmente empleadas fueron las de 130 mg de CO₂/l más argón (2 l/s difundiéndose de manera continua en el tanque de aturdimiento) a una temperatura de 9°C, decididas en base a el menor tiempo hasta alcanzar el aturdimiento y la ausencia de signos manifiestos de aversión. Los indicadores de progreso del aturdimiento fueron: (i) la pérdida de equilibrio, entendida como la alteración de la postura habitual de natación; (ii) la pérdida de la verticalidad, posición anormal de los peces con la parte inferior del cuerpo orientada hacia la superficie del agua; (iii) la reducción y cese de la frecuencia opercular; (iv) la falta de reacción tras la presión en el pedúnculo caudal; y (v) la pérdida de la respuesta visual evocada (VER) tras enfocar un haz de luz a la pupila (Figura 3.1). Estos signos también fueron estudiados para determinar la consecución del aturdimiento mediante shock térmico, analizando cada 30 s la evolución mostrada por los peces.

Por su parte, el grado de aversión se determinó mediante una escala cualitativa: (a) natación normal, asignando un valor de "0"; (b) erección de los radios de la aleta dorsal, valor "1"; (c) natación cerca de la superficie del agua con la cabeza en algún momento ligeramente fuera del agua hasta el nivel de los ojos, valor "2"; (d) natación agitada llegando a sacar la cabeza fuera del agua, valor "3"; natación muy agitada llegando a sacar la mitad del cuerpo fuera del agua, valor "4".

El lote de 20 lubinas aturrido con gases se introdujo en un tanque de 300 l con agua de mar a 9 C, difundiendo el CO₂ hasta alcanzar 130 mg/l y añadiendo argón de manera continua a razón de 2 l/s (Figura 3.2). Los niveles de oxígeno se mantuvieron en torno a 5,7 mg/l y el pH en 6,5.

Tras alcanzarse el aturdimiento, se tomaron muestras de sangre para determinar niveles plasmáticos de indicadores de estrés. Finalmente, los peces se sacrificaron en un tanque con agua-hielo (1:1) durante 90 min. Una vez sacrificados se distribuyeron en cajas de poliestireno expandido, se cubrieron con hielo en escamas y se conservaron en una cámara frigorífica a 4 C durante 14 días de cara a poder determinar la evolución del deterioro a lo largo de la vida útil. Para evitar la potenciación de dicho deterioro que implicaría el agua acumulada por el deshielo en el fondo de las cajas, éstas fueron previamente agujereadas, reponiéndose el hielo, caso necesario, a durante todo el periodo de almacenamiento.

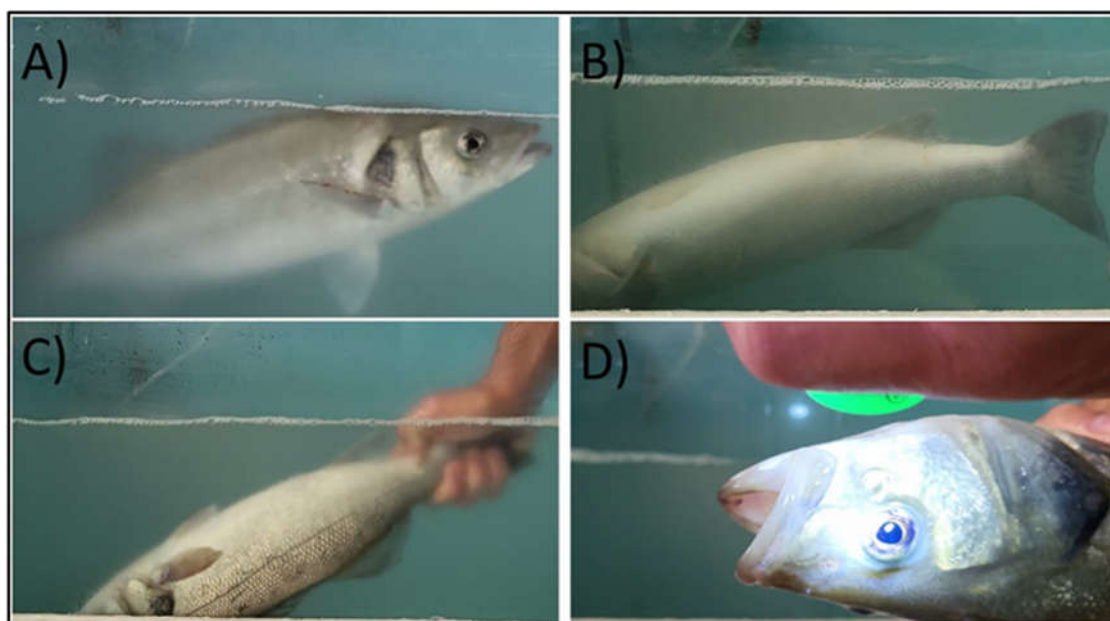


Figura 3.1. Indicadores de progreso del aturdimiento: (A) pérdida de equilibrio; (B) pérdida de la verticalidad; (C) falta de reacción tras la presión en el pedúnculo caudal; (D) pérdida de la respuesta visual evocada.



Figura 3.2. Aturdimiento de lubinas con gases y agua a baja temperatura.

La evolución del deterioro se evaluó los días 0, 2, 6 y 14 tras el sacrificio. Cinco peces de cada uno de los tipos de aturdimiento fueron analizados en cada punto de muestreo, determinándose su grado de frescura mediante la valoración del QIM (Quality Index Method), las reservas energéticas a nivel muscular concretando su valor K, y la textura del filete mediante el protocolo TPA (Texture Profile Analysis).

En el análisis sensorial del QIM cinco evaluadores entrenados y con experiencia previa en este protocolo de trabajo, puntuaron las lubinas mediante una plantilla adaptada a la especie (Figura 3.3). Así, atributos de apariencia, elasticidad de la carne, olor, forma y color del ojo, olor y color de las branquias, conforman la cantidad de puntos de demérito que se van incrementando a lo largo de la vida útil durante el almacenamiento en hielo. Los diez peces valorados en cada punto de muestreo, cinco por tipo de aturdimiento, fueron colocados en un orden al azar sobre bandejas con hielo e identificados con un código de tres dígitos (Figura 3.4).

PARÁMETROS		ATRIBUTOS	puntos	códigos de cada muestra														
Apariencia	Piel	Muy Brillante	0															
		Brillante	1															
		Apagada	2															
	Mucosidad cutánea	Clara-transparente	0															
		Ligeramente turbia	1															
Carne	Elasticidad	Elástica	0															
		Marcada tras presión	1															
Olor		Fresco	0															
		Neutro	1															
		A pescado	2															
		Pasado/Agrio	3															
Ojo	Córnea	Clara-traslúcida	0															
		Ligeramente opaca	1															
		Opaca/Con sangre	2															
	Forma	Convexo	0															
		Plano	1															
		Cóncavo	2															
Branquias	Color	Brillante/rojo oscuro	0															
		Rojo parduzco	1															
	Olor	Fresco	0															
		Neutro	1															
		A pescado	2															
		Pasado/Agrio	3															
Índice de calidad (0-15 puntos)		Suma total de puntos de demérito																

Figura 3.3. Plantilla utilizada para el análisis sensorial del QIM adaptado a lubina.

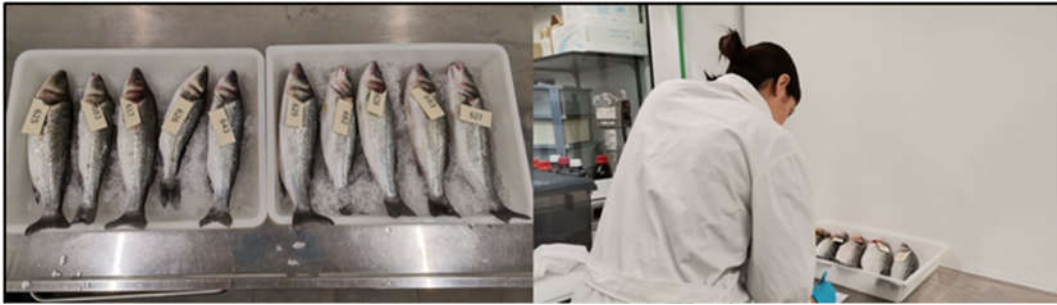


Figura 3.4. Proceso de determinación del QIM.

La evolución de las reservas energéticas o valor K se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Valor K (\%)} = \frac{HxR + Hx}{ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx} \times 100$$

identificándose los nucleótidos como adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), inosina monofosfato (IMP), inosina (HxR) e hipoxantina (Hx). Para el proceso de extracción se obtuvieron 5 g de filete y se homogeneizó en 25 ml de ácido perclórico al 0.6 M durante 2 min a 0 °C. La muestra homogeneizada fue centrifugada a 2 °C, 3000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se neutralizó a un pH de 6,7- 6,9 utilizando NaOH al 1 y 0,1 M. Posteriormente, 1 ml del extracto obtenido se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm y se conservó a -20 °C para su análisis mediante HPLC con un cromatógrafo 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) (Figura 3.5).

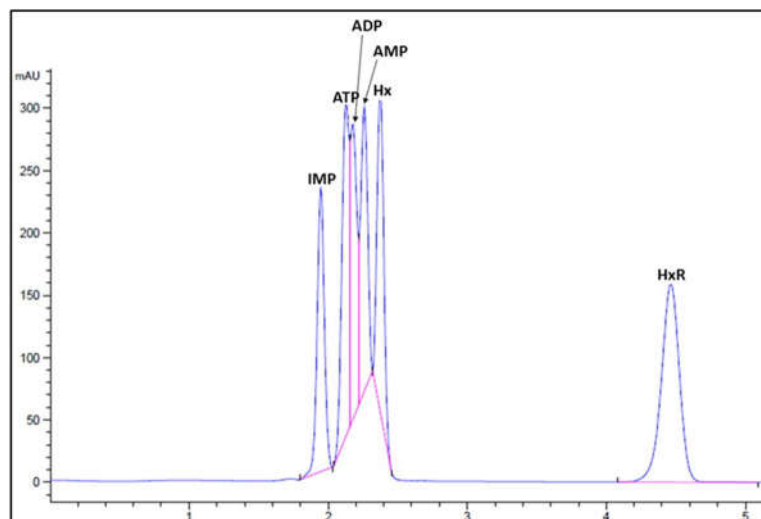


Figura 3.5. Cromatograma para la cuantificación de los nucleótidos y la determinación del valor K.

La determinación del perfil de textura, TPA, se ha realizado de manera individual en cada pez sobre tres piezas de 2x2 cm de la parte anterior del filete dorsal izquierdo tras

retirar la piel. Se ha utilizado un texturómetro TA-XT2 (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK). La medición se realizó a través de una placa de compresión de 100 mm Ø a una velocidad de cruceta 0,8 mm/s (Figura 3.6), sometiendo la pieza a una deformación del 60% de su espesor. Los parámetros de textura calculados la capacidad de fractura, la fuerza máxima de compresión o firmeza, elasticidad, cohesividad, gomosidad, masticabilidad, adhesividad y resiliencia (Figura 3.7).

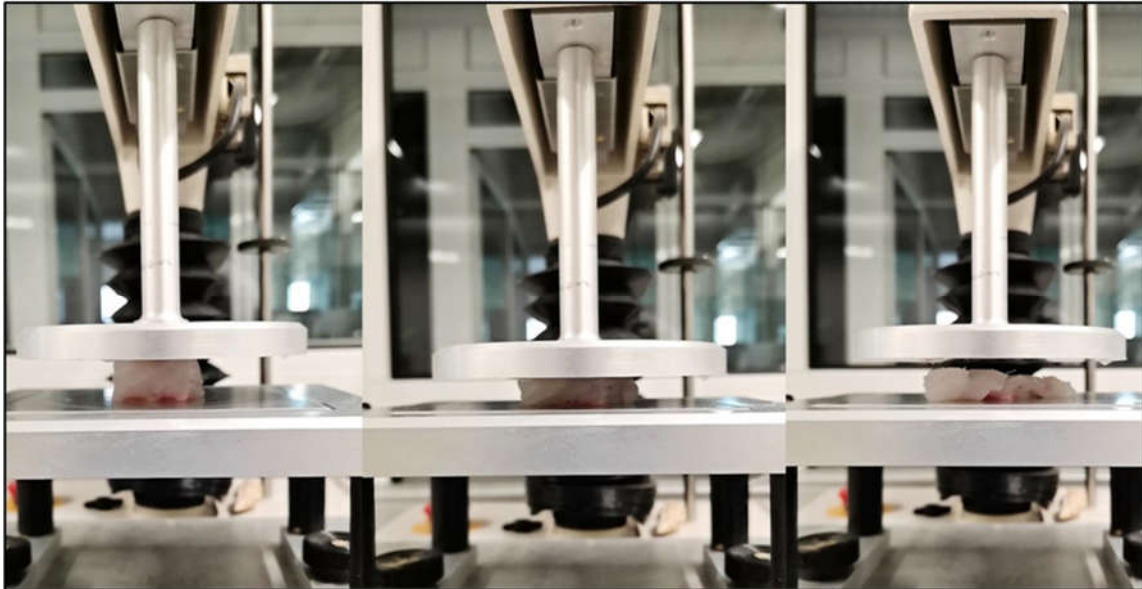


Figura 3.6. Proceso de compresión con la placa de 100 mm Ø de una pieza de filete de 2x2 cm.

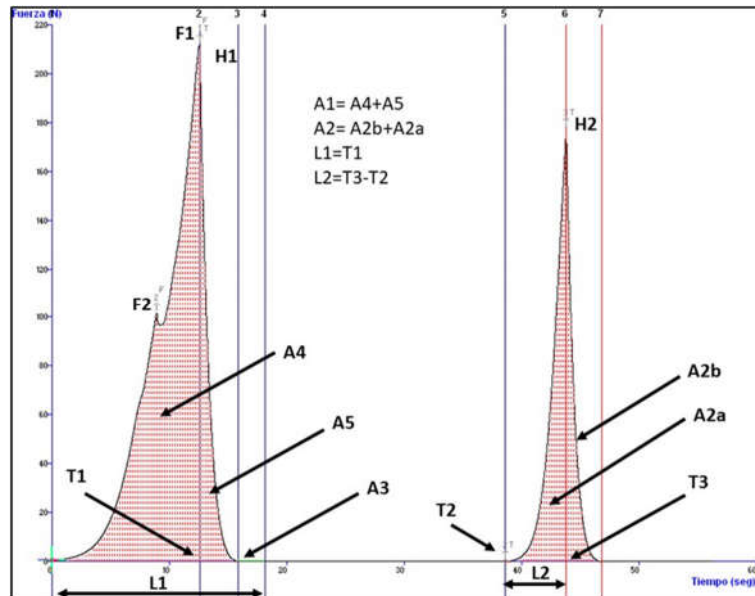


Figura 3.7. Gráfica del TPA. Cálculos utilizados para determinar los parámetros de textura: Firmeza = Fuerza 1, (F1), H1, Capacidad de fractura = Fuerza 2, (F2), Elasticidad = (Tiempo 3-2) / Tiempo 1, (L2 / L1), Cohesividad = (Área 5: 6 + Área 6: 7) / (Área 1: 2 + Área 2: 3), (A1 / A2), Gomosidad = Fuerza 1 * [(Área 5: 6 + Área 6: 7) / (Área 1: 2 + Área 2: 3)], [H1 * (A1 / A2)], Masticabilidad = Fuerza 1 * [(Área 5: 6 + Área

6: 7) / (Área 1: 2 + Área 2: 3)] * [(Tiempo 3 – Tiempo 2) / Tiempo 1], [H1 * (A1 / A2) * (L2 / L1)], Adhesividad = Área 3: 4, (A3), Resiliencia = (Área 2: 3 / Área 1: 2), (A5 / A4).

Para estudio de los parámetros plasmáticos, tras alcanzarse el aturdimiento, se extrajeron 2 ml de sangre de cada pez en tubos heparinizados. La sangre se centrifugó a 3000 g durante 5 minutos a 4 C, obteniéndose el plasma que se almacenó a -80 C hasta su posterior análisis. La determinación de los parámetros plasmáticos se realizó mediante un analizador SMT 120VP (Chengdu Seamaty Technology Co. Ltd, Chengdú, China) cuantificando la glucosa, lactato, pH, fosfato, calcio, magnesio, potasio, sodio y cloro.

- Resultados obtenidos

El periodo de aturdimiento mediante shock térmico se demoró hasta un máximo de 6 minutos para que todos los peces estuvieran aturridos, aunque la variabilidad individual fue notable, completándose en algunos individuos el proceso antes de los 5 minutos. Para el caso de los gases, el tiempo máximo hasta el estado de aturdimiento fue de 4 minutos y 20 segundos.

En la Tabla 3.1 se presentan los resultados obtenidos para el QIM, el valor K y los parámetros de textura analizados dentro de cada día de conservación en hielo y entre los dos tratamientos de aturdimiento testados. Como cabría esperar, el tiempo de conservación en hielo tuvo un efecto significativo sobre todos los parámetros estudiados. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas achacables al método de aturdimiento. En las Figuras 3.8, 3.9 y 3.10 se muestra en detalle la evolución del QIM, valor K y firmeza del filete (entendida como máxima fuerza de compresión al 60% de su espesor). Tanto los valores del QIM como del valor K aumentaron significativamente cada día de conservación en hielo. La firmeza, al igual que el resto de parámetros de textura, sólo fue significativamente diferente el día 0.

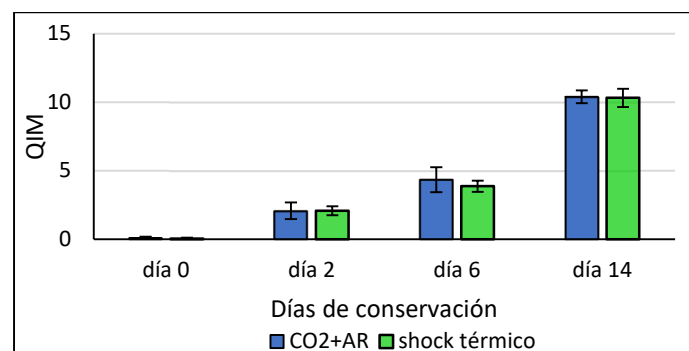


Figura 3.8. Evolución del QIM durante la conservación en hielo según el sistema de aturdimiento.

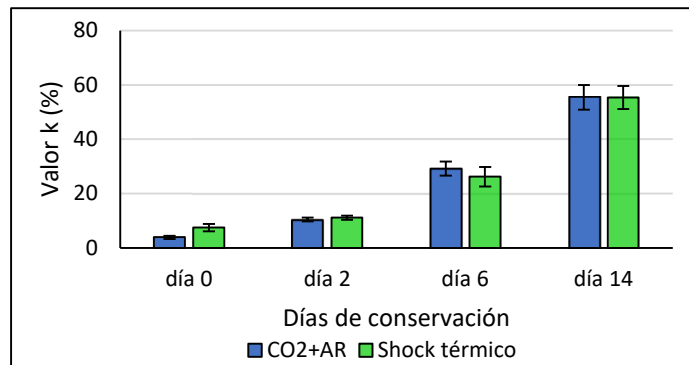


Figura 3.9. Evolución del valor K durante la conservación en hielo según el sistema de aturdimiento.

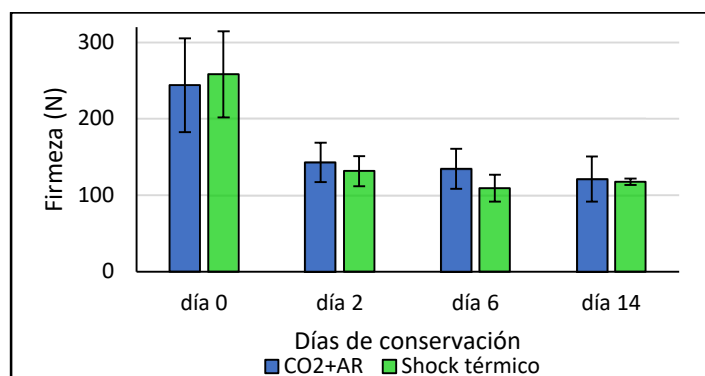


Figura 3.10. Evolución de la firmeza durante la conservación en hielo según el sistema de aturdimiento.

Los resultados tras el análisis de las muestras de plasma se muestran en la Tabla 3.II. Únicamente se detectaron diferencias significativas en el valor de pH del plasma, más bajo en el caso de las lubinas aturridas con la mezcla de gases. En cualquier caso es una variación muy pequeña que refleja una tendencia hacia la acidosis, probablemente motivada por una ligera reducción del bicarbonato tras la hipercapnia motivada por la mezcla de gases en el medio de aturdimiento.

Tabla 3.II. Parámetros del plasma de lubina (mmol/l) según el tipo de aturdimiento (Media±SD).

	Shock térmico	CO ₂ +Argón	<i>P-value</i>
Glucosa	7,21±2,27	6,97±1,81	0,803
Lactato	6,86±2,31	7,95±2,47	0,320
pH	7,35±0,09 ^a	7,24±0,09 ^b	0,019
Calcio	3,48±0,16	3,32±0,22	0,079
Fósforo	2,83±0,42	2,83±0,27	0,970
Magnesio	1,52±0,45	1,45±0,43	0,707

Potasio	5,44±1,13	5,53±0,42	0,820
Sodio	162,39±15,02	159,67±14,1	0,681
Cloro	156,36±7,20	151,50±4,33	0,084

Diferentes letras en la misma línea denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$)

Tabla 3.I. Resultados de QIM, valor K (%) y parámetros de textura (N) en lubinas a los 0, 2, 6 y 14 días de conservación en hielo según el método de aturdimiento (Media±SD).

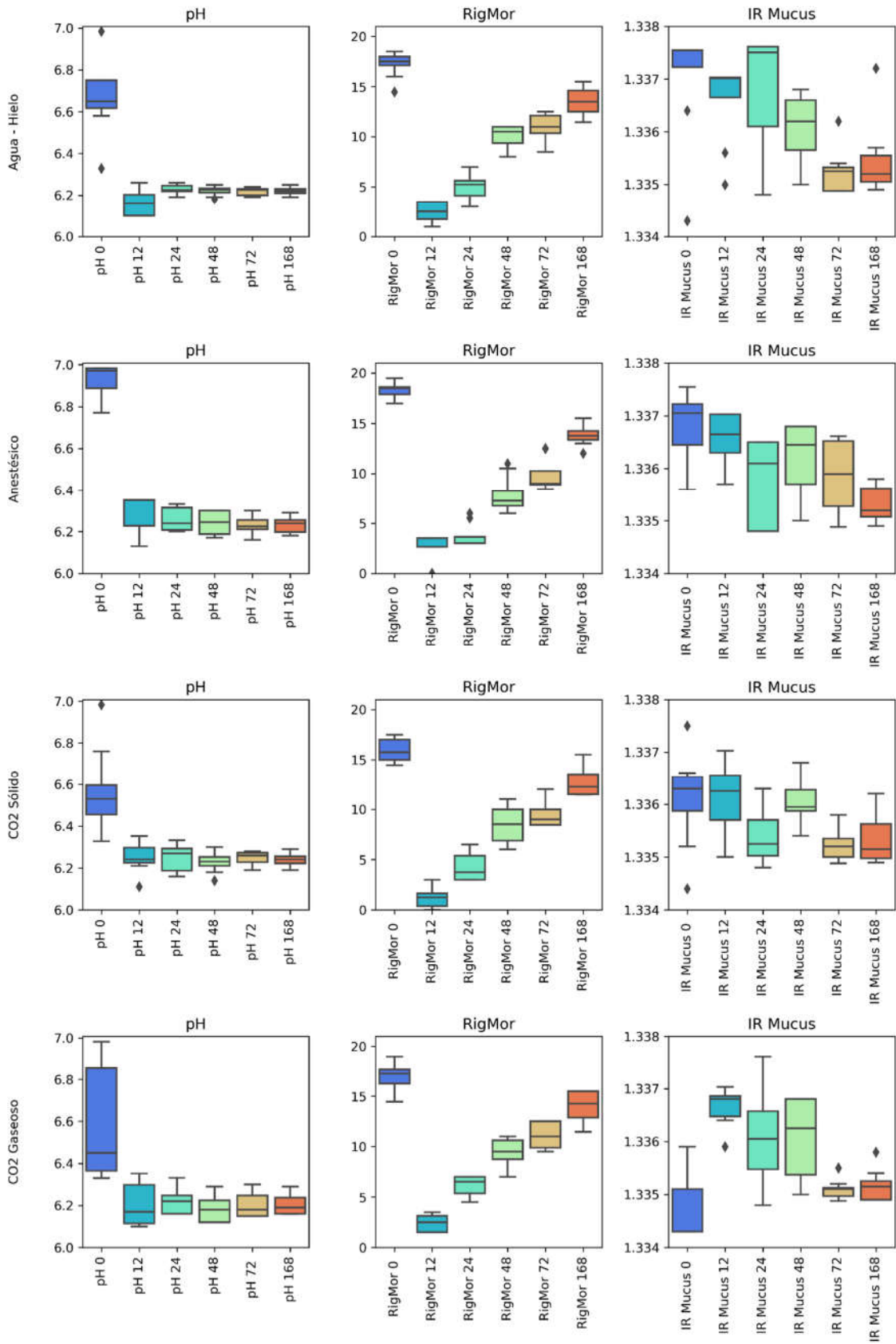
Días de conservación	Método de aturdimiento	QIM	Valor K	Firmeza	Elasticidad	Cohesividad	Gomosidad	Masticabilidad	Resiliencia
Día 0	Shock térmico	0,04±0,09 ^y	7,54±1,39 ^y	258,12±56,38 ^y	0,45±0,05 ^y	0,32±0,02 ^y	83,76±21,23 ^y	38,79±12,38 ^y	0,18±0,02 ^y
	CO ₂ +Ar	0,08±0,11 ^y	3,95±0,63 ^y	244,13±61,38 ^y	0,42±0,20 ^y	0,35±0,03 ^y	85,31±20,50 ^y	34,19±26,45 ^y	0,19±0,02 ^y
Día 2	Shock térmico	2,08±0,33 ^x	11,20±0,8 ^x	131,52±19,82 ^w	0,28±0,01 ^w	0,20±0,02 ^w	26,22±5,07 ^w	7,31±1,23 ^w	0,09±0,00 ^w
	CO ₂ +Ar	2,08±0,61 ^x	10,52±0,73 ^x	143,06±25,63 ^w	0,36±0,06 ^w	0,22±0,02 ^w	31,95±5,86 ^w	11,48±2,61 ^w	0,11±0,03 ^w
Día 6	Shock térmico	3,88±0,41 ^w	26,26±3,56 ^w	109,13±17,58 ^w	0,32±0,04 ^w	0,19±0,02 ^w	21,50±4,47 ^w	7,06±2,12 ^w	0,11±0,04 ^w
	CO ₂ +Ar	4,36±0,91 ^w	29,25±2,63 ^w	134,58±26,14 ^w	0,30±0,03 ^w	0,20±0,02 ^w	26,66±6,15 ^w	8,04±1,53 ^w	0,09±0,01 ^w
Día 14	Shock térmico	10,32±0,66 ^y	55,40±4,24 ^y	117,63±4,16 ^w	0,3±0,04 ^w	0,21±0,03 ^w	24,66±4,47 ^w	7,48±2,15 ^w	0,10±0,02 ^w
	CO ₂ +Ar	10,40±0,47 ^y	55,51±4,54 ^y	121,06±29,54 ^w	0,3±0,05 ^w	0,2±0,01 ^w	24,33±5,02 ^w	6,44±1,04 ^w	0,09±0,01 ^w
	Aturdimiento	0,368	0,741	0,556	0,953	0,127	0,406	0,971	0,681
<i>P</i> -value	Días de conservación	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
	Aturdimiento x Días	0,713	0,652	0,411	0,363	0,242	0,920	0,818	0,132

Diferentes letras en la misma columna (v,w,x,y) denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$)

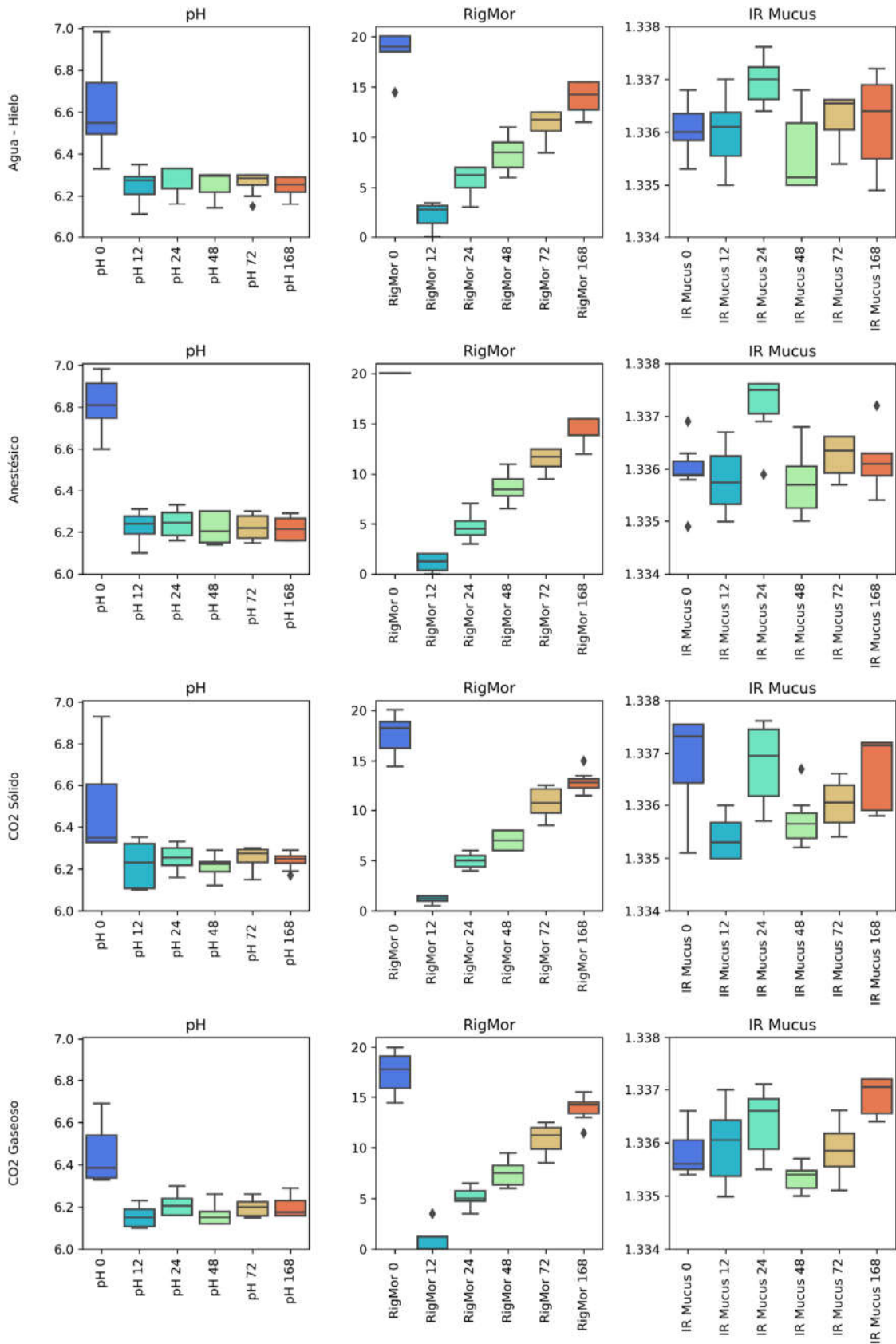
En el IMIDA se llevó a cabo un experimento donde se evaluó la calidad de la carne comparando diferentes métodos de sacrificio a dos temperaturas. Los métodos usados fueron sacrificio en agua-hielo, sacrificio con sobredosis de anestésico, sacrificio con CO₂ en estado gaseoso y CO₂ en estado líquido. Las temperaturas de trabajo fueron 15 y 25°C. Los parámetros evaluados fueron pH, rigor mortis e índice de refractancia del mucus.

Los resultados se presentan en las siguientes figuras:

Boxplots por tipo de Aturdimiento 15°C



Boxplots por tipo de Aturdimiento 25°C



Actividad 3.2 Aturdimiento de lubina mediante electrocución.

- *Entidades participantes: ULPCG, IRTA, IMIDA, IMEDEA*

- *Presupuesto inicial y Presupuesto ejecutado:*

- Se ha ejecutado el 100% del presupuesto asignado a esa actividad ya que se ha adquirido todo lo requerido para completar esta actividad, aunque parte de ella, la correspondiente a los experimentos de invierno, todavía no se ha desarrollado.

- *Descripción de las tareas y trabajos realizados*

Los procedimientos llevados a cabo en esta tarea han sido positivamente informados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (OEBA-ULPGC-07/2023) y autorizados por la Dirección General de Ganadería de la Consejería de agricultura, Ganadería y Pesca del Gobierno de Canarias.

Las lubinas utilizadas fueron criadas en las Instalaciones de Acuicultura de la Fundación Parque Científico Tecnológico de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, y provenían del stock de esta especie que se mantiene en dichas instalaciones. Un total de 104 peces, con un peso medio de 693 g fueron utilizados en las cuatro tareas que se desarrollaron dentro de esta actividad.

Tarea 1. Determinación de las condiciones para el aturdimiento eléctrico de la lubina.

Para el desarrollo del protocolo se utilizó un prototipo suministrado por la empresa Fish Management Systems, el cual fue diseñado y fabricado según las características especificadas referidas a la talla de las lubinas a aturdir. Así, en un tanque de 50 cm de largo por 20 de ancho y otros 20 de profundo se colocó cada pez orientado con la cabeza cercana al electrodo correspondiente al ánodo y la cola al cátodo. Acoplado al tanque de aturdimiento está el sistema de control para aplicar voltaje y frecuencia bajo unas condiciones a determinar para lograr el aturdimiento inmediato y que éste se mantenga al menos durante el tiempo necesario para culminar con la muerte del animal, garantizando así que no haya una recuperación de la consciencia durante el proceso de matanza. Se realizaron diferentes pruebas modificando el voltaje y la duración del pulso eléctrico al que se sometían los peces, evaluándose por un lado la eficacia del aturdimiento en el sentido de que llegue efectivamente a producirse, y caso de lograrse determinar el aspecto externo de los peces tras el sacrificio y su evolución en las primeras 24 horas de conservación en hielo. En este caso los atributos para evaluar el aspecto externo fueron la apertura parcial o total de la boca frente a la postura normal manteniéndose cerrada, la apertura o no del opérculo y el grado de enrojecimiento de toda la zona craneal del pez. Los voltajes testados fueron de 30, 40, 60 y 70 V, con pulsos de duraciones de 5, 15 y 20 s (valores bajos para los mayores voltajes y tiempos más prolongados para los menores voltajes), en todos los casos con una frecuencia de 50 Hz. Se utilizaron seis peces por tratamiento.

Tarea 2. Estudio del ritmo cardíaco en función del método de aturdimiento y posterior recuperación.

Un total de 30 lubinas fueron utilizadas en esta tarea, consistente en la implantación de un biosensor para medir actividad cardíaca mediante una intervención quirúrgica. Para ello, una vez el pez estuvo completamente anestesiado tras la inmersión en MS-222 (concentración: 100 mg/10 l, tiempo estimado 3-5 min), se colocó con la cara ventral hacia arriba en una mesa quirúrgica (en forma de V) donde continuó el proceso de anestesia introduciendo un tubo dentro de la boca enfocando a las branquias por el que por gravedad recirculó agua de mar con una concentración de 50 mg/10 l de MS-222. Así mantenido, se realizó una incisión de 2-3 cm en la cavidad abdominal en el centro del plano ventral, justo después de las aletas pectorales. A continuación, se introdujo el sensor de la frecuencia cardíaca en la cavidad abdominal con el extremo plano primero hacia el pericardio y los dos electrodos orientados ventralmente hacia los músculos abdominales de la pared corporal. El sensor se mantuvo en su lugar con una sutura no absorbible a corta distancia (4,0 USP RESOLON® Blue) unida al extremo redondeado del registrador mediante un único punto de sutura que también cierra el extremo anterior de la incisión. Se utilizan de dos a tres puntos más para cerrar el resto de la incisión. Para finalizar, se limpió suavemente la herida de cualquier resto de sangre o líquido con toallitas de tejido antes de aplicar una fina capa de Blastoestimulina (1%), Betadine (100mg/g) y Furacin (2mg/g) en la zona para sellar la herida y evitar infecciones. El pez se marcó externamente cerca de la aleta dorsal con una marca T-bar (Hallprint®) y, a continuación, se transfirió a un tanque de recuperación con agua de mar bien oxigenada, hasta que se despertó y recuperó el equilibrio y la capacidad natatoria, manteniéndose en observación los días siguientes hasta el comienzo del experimento. El proceso de implantación se ilustra en la Figura 3.11.



Figura 3.11. Izquierda: Sensor (*bio-logger*) modelo DST mili-HRT de la marca Star-Oddi® implantado en las lubinas del experimento. Centro: Mesa y herramientas de cirugía para la implantación de los sensores y tanques experimentales. Derecha: instantánea durante el proceso de la cirugía e implantación del sensor en una lubina.

Una vez recuperados de la intervención, tras cinco días, se dividieron en dos lotes de 15 individuos, cada uno sometido a un tipo de aturdimiento, (i) shock térmico según la norma UNE 173300 y (ii) eléctrico según el protocolo establecido en la tarea 1. De las 15 lubinas aturcidas con shock térmico, cinco permanecieron en la cuba con agua más hielo hasta su muerte (método empleado por las empresas acuícolas) confirmada según protocolo descrito en actividad 3.1, otras cinco se devolvieron a un tanque de

recuperación con agua de mar a temperatura igual que la de origen, y donde se observó el tiempo hasta recuperar el equilibrio y el movimiento opercular, y las cinco últimas se sacrificaron mediante la técnica del ikejime. En cuanto a las aturdidas mediante shock eléctrico, cinco se introdujeron en una cuba con agua más hielo hasta su muerte, otras cinco igualmente se devolvieron a un tanque de recuperación, y las cinco restantes se sacrificaron con la técnica del ikejime. Las diez lubinas recuperadas se sacrificaron mediante sobredosis de anestesia.

En los seis tratamientos experimentales (Tabla 3.III) tras el aturdimiento y previo sacrificio o recuperación, según el caso, se tomaron muestras de sangre para los análisis plasmáticos (metodología detallada en actividad anterior).

Tabla 3.III. Tratamientos experimentales para el estudio del ritmo cardíaco.

Aturdimiento	Sacrificio	Notas
Shock térmico	Agua:hielo	Protocolo comercial
Shock térmico	Ikejime	Muerte por punción cerebral
Shock térmico	Anestésico	Recuperación tras aturdimiento
Eléctrico	Agua:hielo	Alternativa humanitaria
Eléctrico	Ikejime	Muerte por punción cerebral
Eléctrico	Anestésico	Recuperación tras aturdimiento

Tarea 3. Estudio de la vida útil en función del método de aturdimiento.

Siguiendo igualmente los resultados obtenidos en la tarea 1, un lote de 25 lubinas fue sometido a un procedimiento de aturdimiento eléctrico, mientras que otras 25 se aturdieron mediante shock térmico. Tras alcanzarse el aturdimiento, los peces se sacrificaron en un tanque con agua-hielo (1:1) durante 90 min. Una vez sacrificados se distribuyeron en cajas de poliestireno expandido, se cubrieron con hielo en escamas y se conservaron en una cámara frigorífica a 4 C durante 14 días de cara a poder determinar la evolución del deterioro a lo largo de la vida útil. Se siguieron los mismos protocolos ya descritos en la actividad anterior en referencia a determinación del estado de aturdimiento y condiciones de conservación en hielo durante la vida útil, completándose durante dicho periodo los análisis de QIM, valor K y parámetros de textura. Reseñar únicamente que en el experimento de vida útil los puntos de muestro durante el almacenamiento en hielo fueron a los 0, 2, 6, 10 y 14 días tras el sacrificio.

En todos los puntos de muestreo a lo largo de la vida útil se tomaron muestras de músculo al nivel de la inserción anterior de la aleta dorsal para determinar el efecto del tipo de aturdimiento sobre las estructuras celulares. Atendiendo al tipo de técnicas histológicas empleadas, éstas han sido agrupadas por bloques de cara a la presentación y evaluación de los resultados obtenidos:

- Bloque 1. Se desarrollaron técnicas histoquímicas para evaluar integridad de las fibras (las tres primeras, i, ii y iii) así como determinar el contenido en glucógeno (la iv): (i) H&E, tinción de conjunto con hematoxilina y eosina ayuda a identificar diferentes tipos de células y tejidos y a obtener información importante sobre las características, la forma y la estructura celular del tejido; (ii) PTAH, hematoxilina

ácida fosfotúngstica para evidenciar la presencia de fibrina y de estriaciones musculares; (iii) Gómori modificado, para destacar el tejido muscular y el tejido conectivo asociado; (iv) PAS, para poner de manifiesto el glucógeno de los tejidos mediante gracias a la presencia del ácido perclórico.

- Bloque 2. Mediante técnicas inmunohistoquímicas se identificó mediante el uso de anticuerpos la cantidad y distribución de las proteínas contráctiles (Actina) y un marcador de daño o stress (HSP70).
- Bloque 3. Se trabajó con una la técnica histoenzimática, ATPasa, para determinar fibras metabólicamente distintas, de reacción oxidativa fuerte frente a reacción oxidativa débil. A diferencia de los otros bloques, esta técnica sólo se aplicó en el día 0 tras el sacrificio.
- Bloque 4. Se procesaron muestras destinadas a microscopía electrónica para evaluar cambios en la ultraestructura de las fibras musculares, así como la cantidad, distribución y morfología de las mitocondrias subsarcolemales e interfibrilares que pudieran estar vinculadas a los tratamientos de aturdimiento. Para el estudio de las mitocondrias se realizaron cortes semifinos, de un grosor de entre 0,3 a 1 μm , mientras que en el caso de las posibles modificaciones ultraestructurales se realizaron cortes ultrafinos entre los 70 a 100 nm. En este bloque sólo se procesaron muestras a los días 0 y 6 tras el sacrificio.

En los bloques 1, 2 y 3 se diferenció entre cortes histológicos de fibras tipo I, lentas y oxidativas, que se corresponden con el músculo rojo, y las fibras tipo II, rápidas y glucolíticas, identificadas como músculo blanco, pudiéndose éstas a su vez subdividirse en tipo IIa (glucolítico), tipo IIb (glucolítico/oxidativo) y tipo IIc, fibras que están modificándose por efectos exógenos. En el bloque 4 de microscopía electrónica sólo se trabajó con muestras de fibras tipo II.

- Resultados obtenidos

Tarea 1. Determinación de las condiciones para el aturdimiento eléctrico de la lubina.

Para el ajuste de las condiciones de aturdimiento eléctrico hay que buscar un compromiso entre el mínimo tiempo de exposición, obligado para su posible implantación a escala industrial, y la garantía de la no recuperación hasta que se complete el sacrificio en agua-hielo, pero además con el mínimo efecto sobre el aspecto del pescado para que no se genere rechazo o merma durante la comercialización. Ello va a estar motivado por la apertura de boca y opérculos que provoca la utilización de electricidad para aturdir, así como el enrojecimiento, con diferente grado de intensidad, que aparece en la cabeza, especialmente visible bajo los ojos y en el opérculo.

Con la aplicación de voltajes bajos, 30 V, durante periodos prolongados, 20 s, si bien se promovió un aparente aturdimiento que pudo constatarse con el cese de movimientos operculares, así como la falta de reacción tras la punción manual en el pedúnculo caudal, no se alcanzó la pérdida de consciencia ya que se mantuvo la respuesta visual evocada (VER). Por su parte, con los voltajes más altos y los menores tiempos de exposición, 70 V y 5 s, si se produjo una pérdida de consciencia pero los peces, tras finalizar el procedimiento, presentaron bocas y opérculos abiertos, que no se cerraron hasta las 24 h post sacrificio aunque no en todos los casos. Otro inconveniente de la

aplicación de estas condiciones fue el enrojecimiento de la cabeza. La reducción del voltaje manteniendo el tiempo de exposición, 60 V y 5 s, mejoró ligeramente el aspecto en relación a la apertura de bocas y opérculos acompañado de una menor incidencia de enrojecimiento, pero la mitad de las lubinas así aturdidas recuperaron la consciencia pocos segundos tras ser introducidas en el agua-hielo.

El voltaje intermedio de 40 V durante 15 s se consideró como el más adecuado para el aturdimiento de las lubinas en el rango de pesos con el que se trabajó. En todos los casos hubo pérdida de la consciencia que no se recuperó durante el proceso de sacrificio en agua-hielo. En el momento del aturdimiento algunos peces presentaron opérculos y bocas abiertas, pero se cerraron en la mayor parte de los casos a las 24 h post sacrificio durante la conservación en hielo. El grado de enrojecimiento en la cabeza fue apenas apreciable.

Tarea 2. Estudio del ritmo cardíaco en función del método de aturdimiento y posterior recuperación.

En la Figura 3.12, se muestra el ritmo cardíaco registrado a lo largo del tiempo de las lubinas expuestas a aturdimiento mediante shock térmico y sacrificadas mediante las tres técnicas exploradas: sobredosis de anestesia (verde), agua:hielo (azul) e ikejime (naranja).

Durante la fase de aturdimiento (8 min) se puede observar cómo, en los tres grupos, el ritmo cardíaco disminuye hasta alcanzar niveles muy bajos (15-20 bpm).

Una vez iniciado el procedimiento de sacrificio, se puede observar cómo el ritmo cardíaco deja de ser detectado en el grupo sacrificado con ikejime en primer lugar ($5,25 \pm 0,66$ min) y posteriormente en el grupo sacrificado con anestesia ($12,16 \pm 0,60$ min; tiempo de recuperación no incluido), mientras que el ritmo cardíaco del grupo sacrificado con agua:hielo es detectado durante mucho más tiempo ($37,9 \pm 9,47$ min). Las líneas punteadas muestran el promedio (barras de error = SE) de la temperatura interna de las lubinas durante el experimento, donde se puede observar la bajada de temperatura en los tres grupos durante el aturdimiento en hielo, que continúa bajando en los grupos de sacrificio en hielo e ikejime, y cómo asciende en el grupo sacrificado con anestesia.

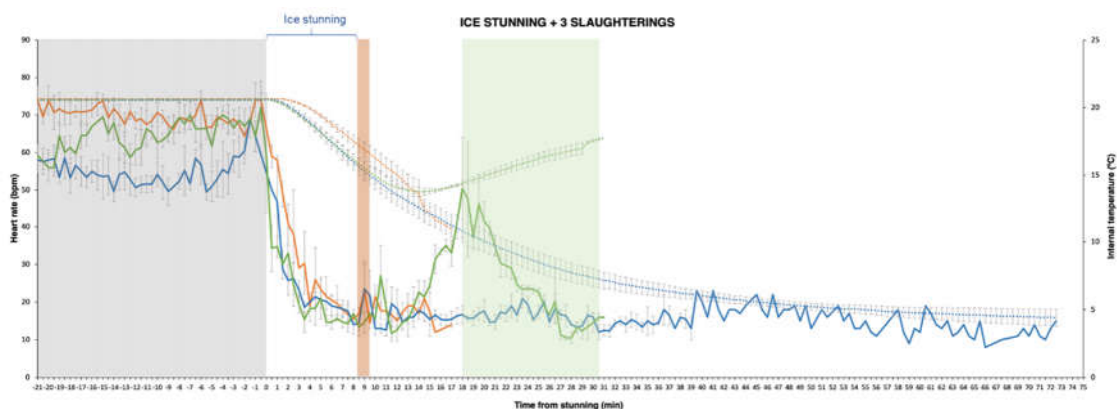


Figura 3.12. Ritmo cardíaco de lubinas sometidas a aturdimiento de shock térmico y sacrificadas mediante las tres técnicas exploradas: sobredosis de anestesia (verde), agua:hielo (azul) e ikejime (naranja).

La Figura 3.13 muestra el ritmo cardíaco registrado a lo largo del tiempo de las lubinas expuestas a aturdimiento eléctrico y sacrificadas mediante las tres técnicas exploradas: sobredosis de anestesia (verde), agua:hielo (azul) e ikejime (naranja). Se puede observar cómo el ritmo cardíaco deja de ser detectado con anterioridad en los grupos sacrificados con ikejime ($5,5 \pm 0,83$ min) y anestesia ($5,2 \pm 1,06$ min; tiempo de recuperación no incluido), mientras que el ritmo cardíaco del grupo sacrificado con hielo es detectado durante mucho más tiempo ($24,7 \pm 4,06$ min). Las líneas punteadas muestran el promedio (barras de error = SE) de la temperatura interna de las lubinas durante el experimento, donde se puede observar la bajada de temperatura en el grupo sacrificado con hielo, mientras que en los otros dos casos ésta se mantiene constante.

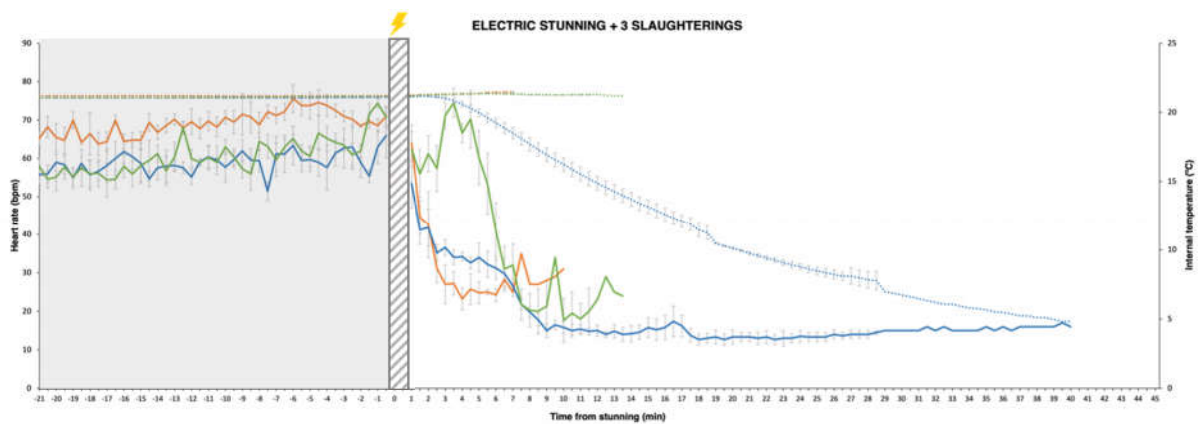


Figura 3.13. Ritmo cardíaco de lubinas sometidas a aturdimiento eléctrico y sacrificadas mediante las tres técnicas exploradas: sobredosis de anestesia (verde), agua:hielo (azul) e ikejime (naranja).

La Figura 3.14 muestra el ritmo cardíaco registrado a lo largo del tiempo de las lubinas expuestas a un aturdimiento eléctrico (naranja) o mediante shock térmico (azul), y sacrificadas mediante sobredosis de anestesia. Durante el proceso de aturdimiento, se observa una clara disminución del ritmo cardíaco en el grupo aturdido con shock térmico, mientras que en el aturdimiento eléctrico no existe un patrón claro. Previo al sacrificio existe un período de recuperación dónde en ambos grupos aumenta la frecuencia cardíaca. Por último, durante el proceso de sacrificio mediante sobredosis de anestesia el ritmo cardíaco disminuye hasta alcanzar valores indetectables. En el caso de los individuos expuestos al aturdimiento eléctrico la señal de ritmo cardíaco deja de ser detectada antes que la de los individuos aturdidos mediante shock térmico ($5,2 \pm 1,06$ min y $12,16 \pm 0,60$ min respectivamente). Las líneas punteadas muestran el promedio (barras de error = SE) de la temperatura interna de las lubinas durante el experimento, donde se puede observar la bajada de temperatura en el grupo aturdido con shock térmico, mientras que en el grupo aturdido eléctricamente ésta se mantiene constante.

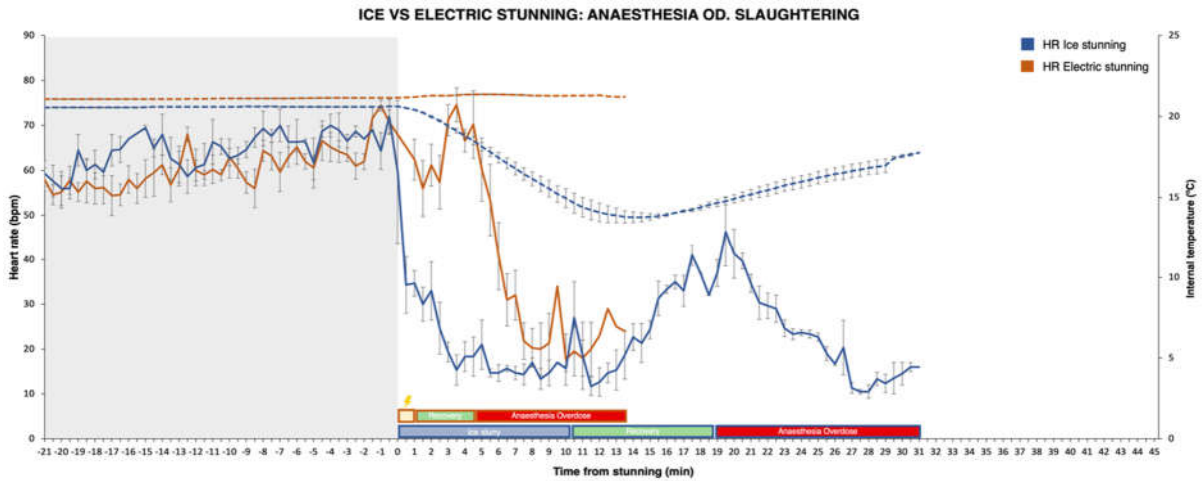


Figura 3.14. Comparativa de los ritmos cardíacos de lubinas sacrificadas mediante sobredosis de anestesia y sometidas a aturdimiento con shock térmico (azul) y eléctrico (naranja).

La Figura 3.15 muestra el ritmo cardíaco registrado a lo largo del tiempo de las lubinas expuestas a un aturdimiento eléctrico (naranja) o con shock térmico (azul), y sacrificadas mediante agua:hielo. Se observa cómo durante el proceso de sacrificio el ritmo cardíaco disminuye hasta alcanzar valores alrededor de 10-20 bpm en ambos grupos. En el caso de los individuos expuestos al aturdimiento eléctrico la señal de ritmo cardíaco deja de ser detectada antes que la de los individuos aturridos mediante shock térmico ($24,7 \pm 4,06$ min y $37,9 \pm 9,47$ min respectivamente). Las líneas punteadas muestran el promedio (barras de error = SE) de la temperatura interna de las lubinas durante el experimento donde se puede observar, en ambos casos, una disminución gradual de temperatura.

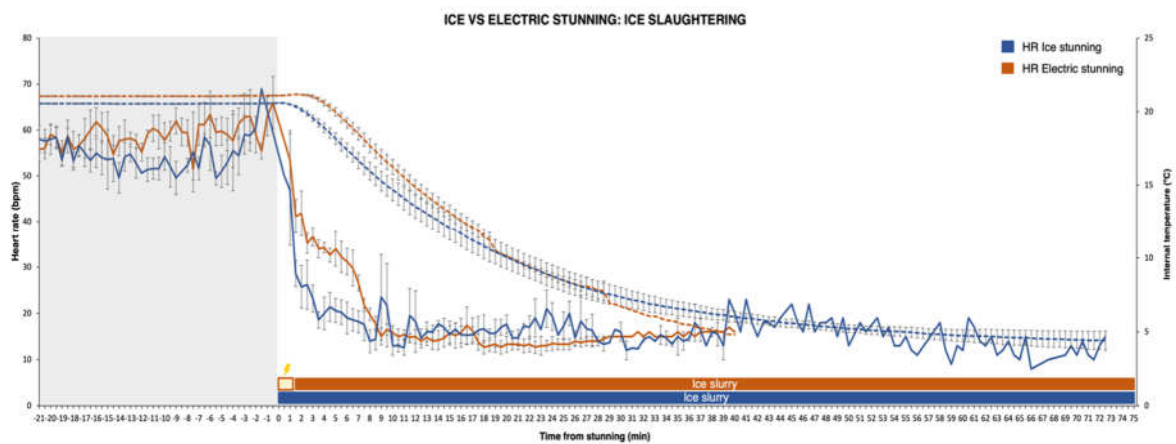


Figura 3.15. Comparativa de los ritmos cardíacos de lubinas sacrificadas mediante shock térmico/hielo y sometidas a aturdimiento de shock térmico (azul) y eléctrico (naranja).

La Figura 3.16 muestra el ritmo cardíaco registrado a lo largo del tiempo de las lubinas expuestas a un aturdimiento eléctrico (naranja) o con shock térmico (azul), y sacrificadas mediante el método de ikejime. Durante el proceso de aturdimiento, se observa una clara disminución del ritmo cardíaco en el grupo aturdido mediante shock térmico. No existen diferencias significativas en el tiempo en el que la señal de ritmo cardíaco se pierde después de aplicar el sacrificio mediante ikejime, para ninguno de los dos grupos (Figura 3.17). Las líneas punteadas muestran el promedio (barras de error = SE) de la temperatura interna de las lubinas durante el experimento, donde se puede observar la bajada de temperatura en el grupo aturdido con hielo, mientras que en el grupo aturdido eléctricamente ésta se mantiene constante.

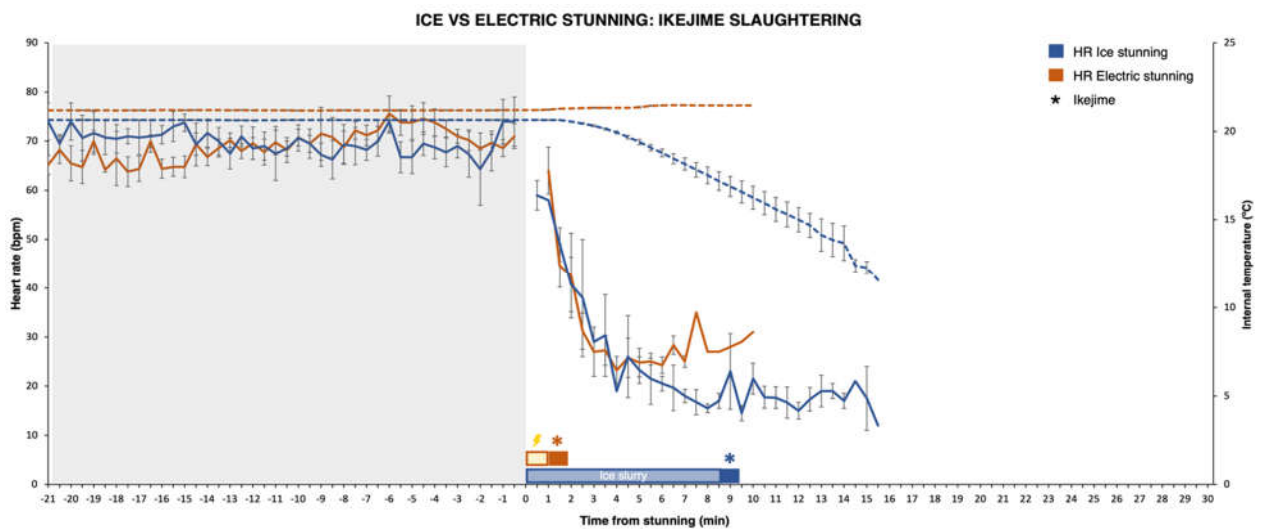


Figura 3.16. Comparativa de los ritmos cardíacos de lubinas sacrificadas mediante ikejime y sometidas a aturdimiento de shock térmico (azul) y eléctrico (naranja).

La Figura 3.17 muestra los tiempos en los que la señal de ritmo cardíaco se pierde en cada uno de los grupos explorados desde el inicio del sacrificio. El análisis de los datos se ha realizado mediante la aplicación de un modelo lineal generalizado (glm) con distribución de Poisson, así como la prueba *post-hoc* de Tukey. Los individuos aturdidos mediante shock térmico y sacrificados en agua:hielo (Ice+Ice) tardan significativamente más en dejar de mostrar señal de ritmo cardíaco que cualquiera de las otras combinaciones de aturdimiento y sacrificio ($37,9 \pm 9,47$ min). En el caso de los individuos expuestos a un aturdimiento eléctrico y sacrificados mediante agua:hielo (E+Ice), el tiempo de pérdida de señal cardíaca se reduce significativamente hasta alcanzar los 24,7 min de media. No existen diferencias significativas en el tiempo en que la señal de ritmo cardíaco se pierde para los individuos sacrificados mediante *ikejime*, independientemente del método de aturdimiento aplicado.

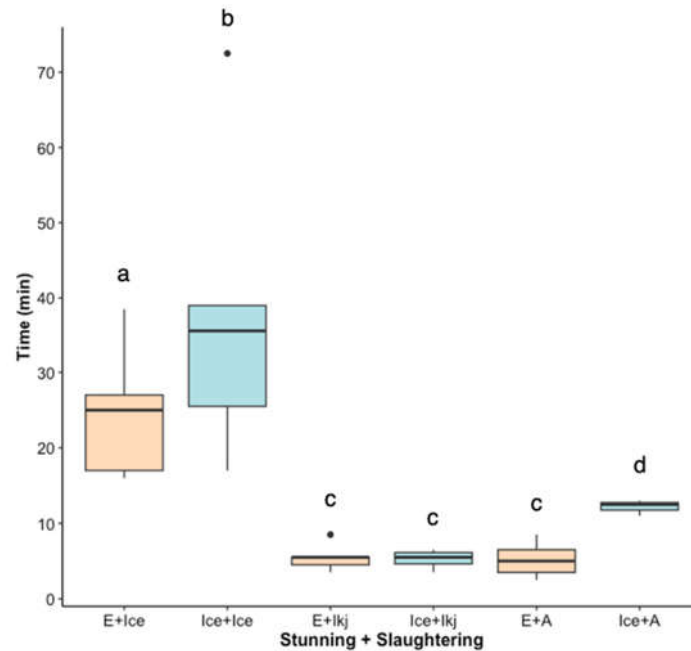


Figura 3.17. Box-plot mostrando los promedios de tiempo en el que la señal del ritmo cardíaco se vuelve indetectable, para los distintos tratamientos explorados.

Con los resultados del estudio de la actividad cardiaca se puede concluir lo siguiente:

- El tiempo registrado de la actividad cardíaca no refleja ni la pérdida de consciencia ni tiempo de la muerte, pues dichas relaciones están aún por explorar. No obstante, el tiempo de registro de la actividad cardíaca durante el proceso de sacrificio puede entenderse como un “proxy” de la eficacia de los métodos empleados en términos de bienestar animal.
- Los resultados muestran que el método de aturdimiento eléctrico empleado en este experimento reduce el tiempo en el que la señal del ritmo cardíaco se vuelve indetectable durante el sacrificio posterior, sobre todo para el sacrificio en agua:hielo, pero también cuando se emplea sobredosis con anestesia.
- La técnica de ikejime es claramente el método más eficaz para el sacrificio humanitario de los peces, pero el menos operativo.
- El sacrificio directamente en hielo resultó ser el método menos recomendado pues la señal del ritmo cardíaco es la que más tarda en hacerse indetectable.

Los resultados tras el análisis de las muestras de plasma se muestran en la Tabla 3.IV. Sólo se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de fosfato y potasio, con los valores más elevados para el caso de las lubinas sometidas a un aturdimiento eléctrico. A nivel muscular la mayor parte del potasio se encuentra dentro de las células, y gracias a la pequeña proporción localizada en el espacio extracelular se establece la necesaria diferencia del potencial de membrana fundamental para la diversas. Así, estos cambios observados hacia una hiperpotasemia son reflejo de un aumento de la excitabilidad neuromuscular.

Tabla 3.IV. Parámetros del plasma de lubina (mmol/l) según el tipo de aturdimiento (Media±SD).

	Shock térmico	Eléctrico	<i>P-value</i>
Glucosa	7,34±1,77	7,28±1,79	0,922
Lactato	9,12±1,78	10,12±1,19	0,098
pH	7,35±0,1	7,36±0,1	0,913
Calcio	3,47±0,25	3,66±0,28	0,064
Fósforo	3,51±0,44 ^b	4,08±0,39 ^a	0,001
Magnesio	1,91±0,60	1,59±0,14	0,054
Potasio	5,83±0,76 ^b	6,37±0,52 ^a	0,036
Sodio	151,38±2,45	150,55±2,44	0,359
Cloro	170,25±8,48	172,26±4,45	0,438

Diferentes letras en la misma línea denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Tarea 3. Estudio de la vida útil en función del método de aturdimiento.

Como ya se describió en la actividad anterior, la mayor parte de los peces completaron el proceso de aturdimiento a los 5 minutos tras ser introducidos en el agua-hielo, aunque en algún caso se demoró hasta los 6 minutos, siendo este el tiempo a tener en cuenta como garantía de pérdida de la consciencia. Para el caso del aturdimiento eléctrico la inconsciencia se alcanzó de forma inmediata tras la aplicación del procedimiento.

En la Tabla 3.V se presentan los resultados obtenidos para el QIM, el valor K y los parámetros de textura analizados dentro de cada día de conservación en hielo y entre los dos tratamientos de aturdimiento testados. A diferencia de lo observado tras el aturdimiento con mezcla de gases, además de las variaciones determinadas por el periodo de conservación en hielo en los diferentes puntos de muestreo, se aprecia un efecto significativo del método de aturdimiento sobre las reservas energéticas del músculo, así como en la firmeza y gomosidad del filete.

La evolución de la frescura del pescado valorada mediante el QIM (Figura 3.18), con el aumento significativo de los puntos de demérito a medida que se progresó durante el almacenamiento en hielo, no fue diferente atendiendo al método de aturdimiento.

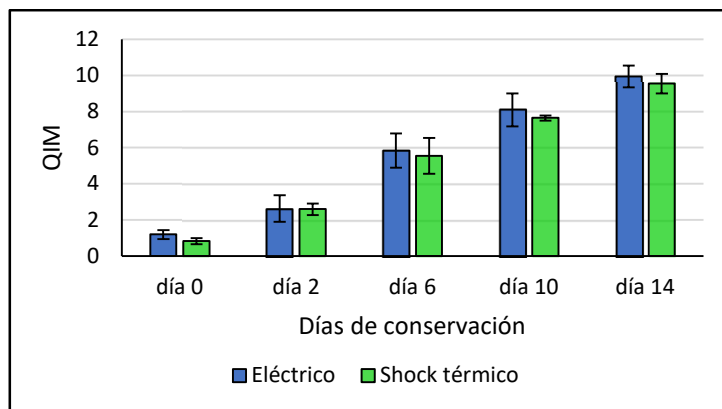


Figura 3.18. Evolución del QIM durante la conservación en hielo según el sistema de aturdimiento.

El valor K no fue diferente entre aturdimientos ni entre días hasta el día 2 post sacrificio. Sin embargo, a partir de este punto de muestreo, se apreciaron diferencias significativas tanto entre días, algo esperado, como entre aturdimientos, siendo en todos los casos más bajos los valores para los peces aturridos mediante shock térmico (Figura 3.19). A pesar de no evolucionar de forma diferente el QIM en función del tipo de aturdimiento, este otro indicador de frescura, sin duda más preciso, pone sobre aviso de una peor calificación para las lubinas sacrificadas aturridas mediante electricidad.

También la firmeza del músculo alcanzó valores diferentes tras la compresión del filete en función del tipo de aturdimiento (Figura 3.20). Los peces aturridos mediante shock térmico mostraron una mayor firmeza del filete en todos los puntos de muestreo a lo largo del periodo de vida útil. Los valores se fueron aproximando a medida que se avanzó durante la conservación en hielo, destacándose las mayores diferencias entre ambos aturdimientos en los primeros días tras el sacrificio. Es decir, en las lubinas aturridas mediante shock térmico la evolución del descenso en la firmeza del filete fue lineal, mientras que en las aturridas con electricidad se produjo una caída brusca hasta el día 2 tras el sacrificio, para a partir de ahí progresar con un ligero descenso.

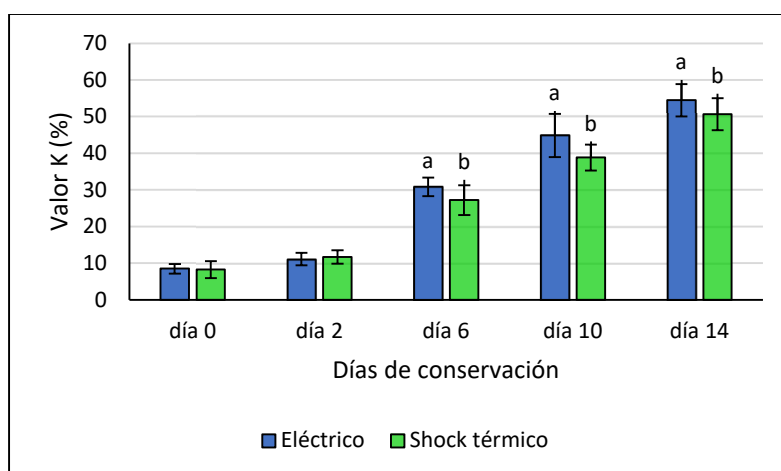


Figura 3.19. Evolución del valor K durante la conservación en hielo según el sistema de aturdimiento.

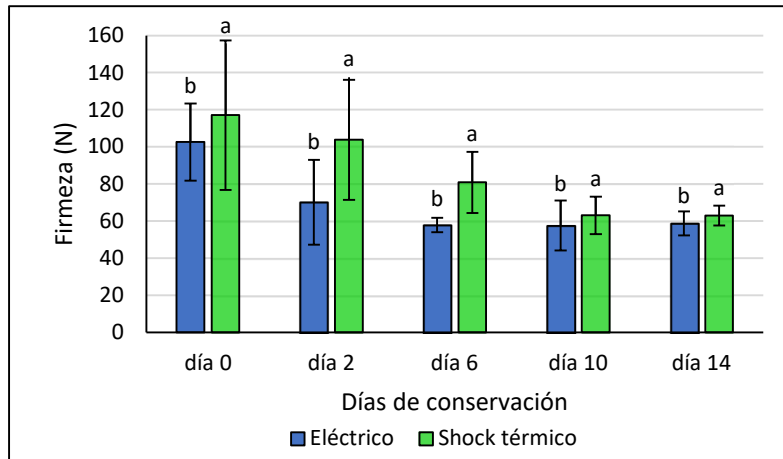


Figura 3.20. Evolución de la firmeza durante la conservación en hielo según el sistema de aturdimiento.

Tabla 3.V. Resultados de QIM, valor K (%) y parámetros de textura (N) en lubinas a los 0, 2, 6, 10 y 14 días de conservación en hielo según el método de aturdimiento (Media±SD).

Días de conservación	Método de aturdimiento	QIM	Valor K	Dureza	Elasticidad	Cohesividad	Gomosidad	Masticabilidad	Resiliencia
Día 0	Shock térmico	0,84±0,17 ^z	8,25±2,31 ^y	117±40,30 ^{va}	0,5±0,06 ^v	0,33±0,05 ^y	38,72±16,73 ^{va}	19,52±9,38 ^v	0,17±0,03 ^v
	Eléctrico	1,2±0,24 ^z	8,53±1,33 ^y	102,64±20,78 ^{vb}	0,43±0,05 ^v	0,26±0,06 ^v	28,39±11,19 ^{vb}	12,51±5,64 ^v	0,14±0,03 ^v
Día 2	Shock térmico	2,6±0,32 ^x	11,74±1,87 ^y	103,85±32,34 ^{wa}	0,28±0,03 ^w	0,19±0,03 ^w	21,20±9,63 ^{wa}	5,85±2,71 ^w	0,09±0,02 ^w
	Eléctrico	2,64±0,74 ^x	11,18±1,73 ^y	70,19±22,89 ^{wb}	0,31±0,05 ^w	0,17±0,03 ^w	12,68±6,44 ^{wb}	4,00±2,69 ^w	0,08±0,02 ^w
Día 6	Shock térmico	5,55±0,99 ^y	27,25±4,07 ^{xb}	80,93±16,48 ^{wa}	0,27±0,04 ^w	0,19±0,03 ^w	15,36±4,69 ^{wa}	4,17±1,70 ^w	0,08±0,01 ^w
	Eléctrico	5,85±0,95 ^y	30,88±2,56 ^{xa}	57,98±3,88 ^{wb}	0,27±0,02 ^w	0,18±0,02 ^w	10,21±1,45 ^{wb}	2,77±0,38 ^w	0,08±0,01 ^w
Día 10	Shock térmico	7,65±0,14 ^w	38,86±3,56 ^{wb}	67,58±13,17 ^{wb}	0,26±0,02 ^w	0,18±0,01 ^w	12,39±3,06 ^{wb}	3,19±0,85 ^w	0,07±0,01 ^w
	Eléctrico	8,1±9,11 ^w	44,88±5,87 ^{wa}	73,50±25,35 ^{wa}	0,31±0,10 ^w	0,21±0,08 ^w	15,22±5,32 ^{wa}	4,74±2,18 ^w	0,09±0,02 ^w
Día 14	Shock térmico	9,55±0,54 ^v	50,68±4,40 ^{vb}	78,50±21,77 ^{wa}	0,27±0,04 ^w	0,19±0,02 ^w	15,16±5,38 ^{wa}	4,14±1,50 ^w	0,08±0,01 ^w
	Eléctrico	9,95±0,60 ^v	54,49±4,41 ^{va}	58,79±6,43 ^{wb}	0,27±0,04 ^w	0,17±0,02 ^w	10,13±1,79 ^{wb}	2,82±0,93 ^w	0,07±0,01 ^w
P-value	Aturdimiento	0,095	0,011	0,012	0,888	0,155	0,025	0,071	0,116
	Días de conservación	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Aturdimiento. x días	0,959	0,218	0,411	0,098	0,094	0,416	0,181	0,070

Diferentes letras dentro de día (a,b) y diferentes letras en la misma columna (v,w,x,y,z) denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$)

Los resultados obtenidos tras el estudio de las fibras musculares mediante las diferentes técnicas histológicas están organizados en función de los bloques descritos en la metodología siguiendo la secuencia temporal de los días tras el sacrificio. En los bloques 1 y 2 se presentan cuatro imágenes para cada una de las técnicas empleadas identificadas con las letras a, b, c y d. Las letras a y b para las fibras tipo II y las letras c y d para las fibras tipo I. Dentro de cada tipo de fibras se presenta el corte para el músculo de las lubinas aturdidas mediante shock térmico (ST) que se corresponde con las letras a (en las fibras tipo II) y c (en las fibras tipo I), y el de las lubinas aturdidas mediante electricidad (EL) identificado con las letras b y d respectivamente en cada tipo de fibras.

La Figura 3.21 muestra los resultados en el día 0 tras el sacrificio para las técnicas del bloque 1. Con la técnica de H&E las fibras tipo II mostraron cambios en la arquitectura, con imágenes de aspecto más agrietadas en el aturdimiento mediante shock térmico. En el aturdimiento eléctrico se aprecian imágenes más compactas. Este efecto fue visible de manera especial con la PTAH, tanto en las fibras tipo II como en las tipo I, con una fragmentación más marcada pero en las fibras de menor calibre. La tinción de Gomori evidenció en ambos tipos de fibras imágenes compatibles con un infiltrado denso de coloración verde ya que el colorante presenta apetencia por el material de carácter proteico, como en el caso del colágeno de los tabiques interfibrilares. Este hallazgo podría ser compatible con algún tipo de extravasación vascular asociada con la electro estimulación. Por último, con la técnica de PAS se apreció una mayor cantidad de glucógeno en las fibras del tipo IIa de los peces aturdidos mediante shock térmico. Esta tendencia fue más evidente en el musculo de tipo I donde se encontraron grandes grupos celulares PAS positivos correspondiente a depósitos de glucógeno no consumidos durante el transcurso del sacrificio. También en las zonas de transición entre musculo del tipo II y del tipo I denominado musculo rosado (tipo IIb) con características intermedias entre los dos tipos de fibras musculares.

También en el día 0 tras el sacrificio, la figura 3.22 presenta un nivel de expresión para el anticuerpo anti-actina más intenso con el aturdimiento eléctrico. El patrón fue diferente con una mayor proporción de fibras con patrón en huella dactilar en aturdimiento con shock térmico, similar a las bandas musculares tradicionales. En las fibras tipo I no se apreciaron diferencias entre aturdimientos.

Por su parte, la expresión de la proteína de stress HSP70 en el musculo de tipo II fue más marcada en el shock térmico, pero con una distribución homogénea en todas las fibras. En el aturdimiento eléctrico la expresión estuvo más focalizado en determinadas fibras siguiendo el patrón visto con el Gómori modificado. En el musculo de tipo I la distribución fue limitada y similar en las fibras tipo II en ambos aturdimientos aunque siguiendo un patrón similar a lo encontrado en el musculo de tipo I, difuso en el de shock térmico y focal en el eléctrico.

En cuanto a la ATPasa, no se detectaron diferencias entre tipos de aturdimiento en la cantidad de fibras que reaccionaron con diferentes grados de oxidación (Figura 3.23)..

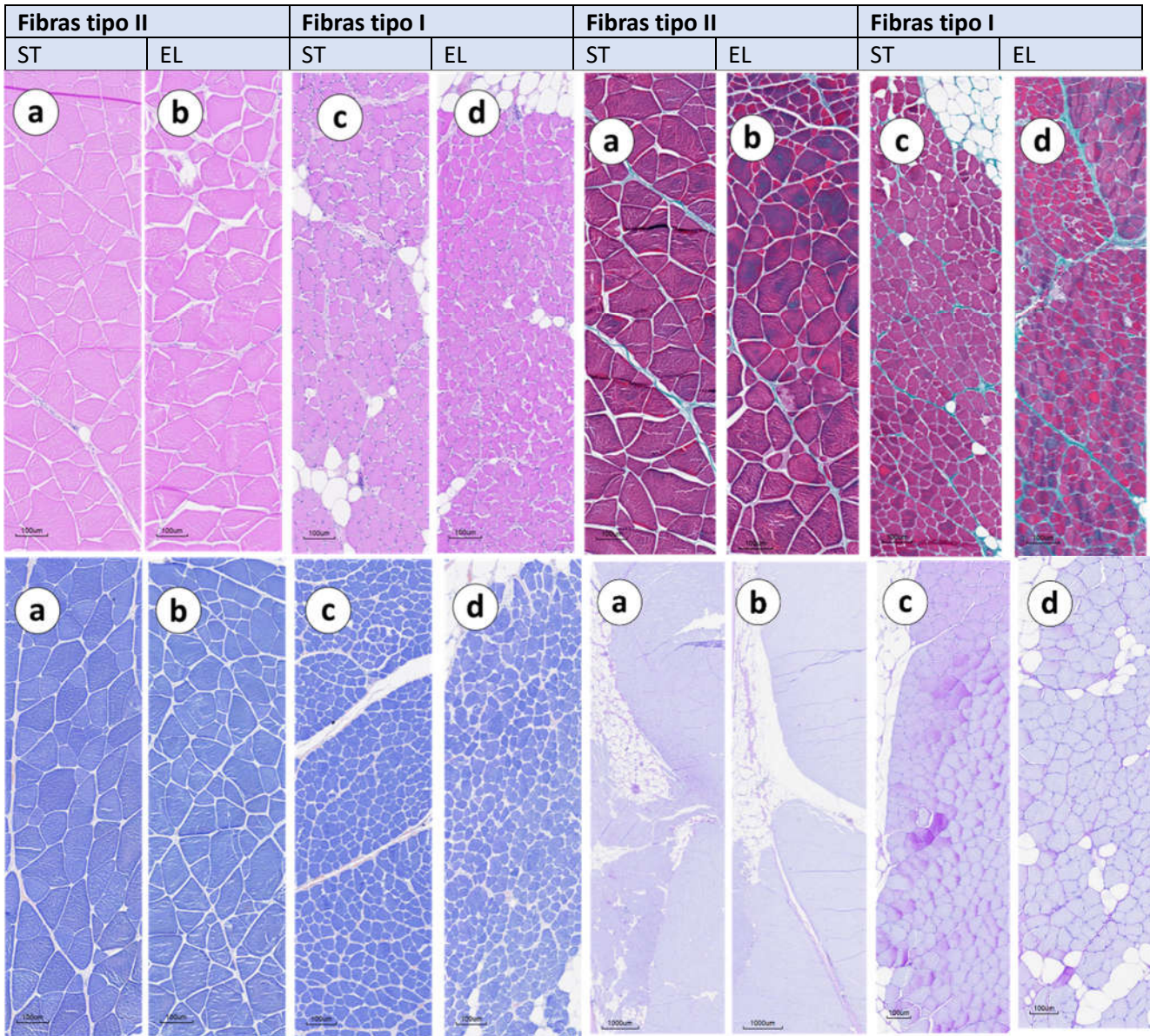


Figura 3.21. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) el día 0 tras el sacrificio en función del tipo de aturdimiento mediante shock térmico (ST) o eléctrico (EL) con las técnicas de H&E, PTAH, Gomori y PAS (de izquierda a derecha y de arriba abajo).

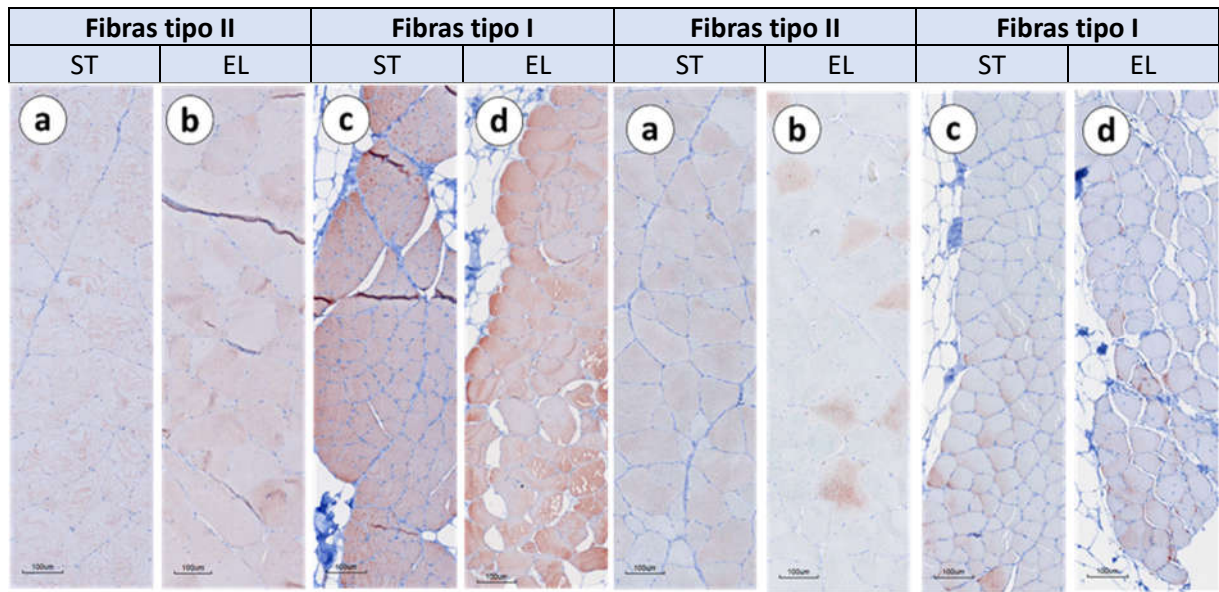


Figura 3.22. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) el día 0 tras el sacrificio en función del tipo de aturdimiento mediante shock térmico (ST) o eléctrico (EL) para detección de Actina y HPS70 (de izquierda a derecha).

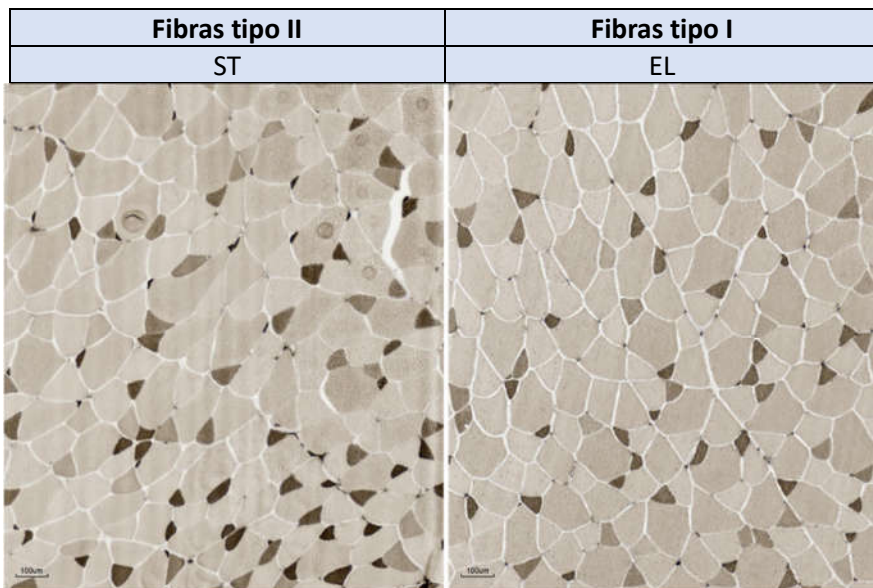


Figura 3.23. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) el día 0 tras el sacrificio en función del tipo de aturdimiento mediante shock térmico (ST) o eléctrico (EL) con la técnica de la ATPasa.

Con los cortes de microscopía electrónica en el músculo de tipo II se pudo comprobar que la aparente fragmentación diferencial encontrada con microscopía óptica no tiene correspondencia con cambios a nivel fibras. Se pudo encontrar bandas Z algo más compactas en el aturdimiento eléctrico que en el de shock térmico. En ambos casos hubo ausencia de mitocondrias interfibrilares (representan el 80% del total de mitocondrias), lo que indica un agotamiento de los recursos energéticos interfibrilares con el proceso del sacrificio. Sin embargo, las mitocondrias subsarcolémicas (el otro 20%) destinadas a la autogestión de la fibra muscular fueron abundantes. Se determinó el tamaño de éstas últimas en los dos tipos de aturdimiento, oscilando entre 0,5 y 1 μm (Figura 3.24)

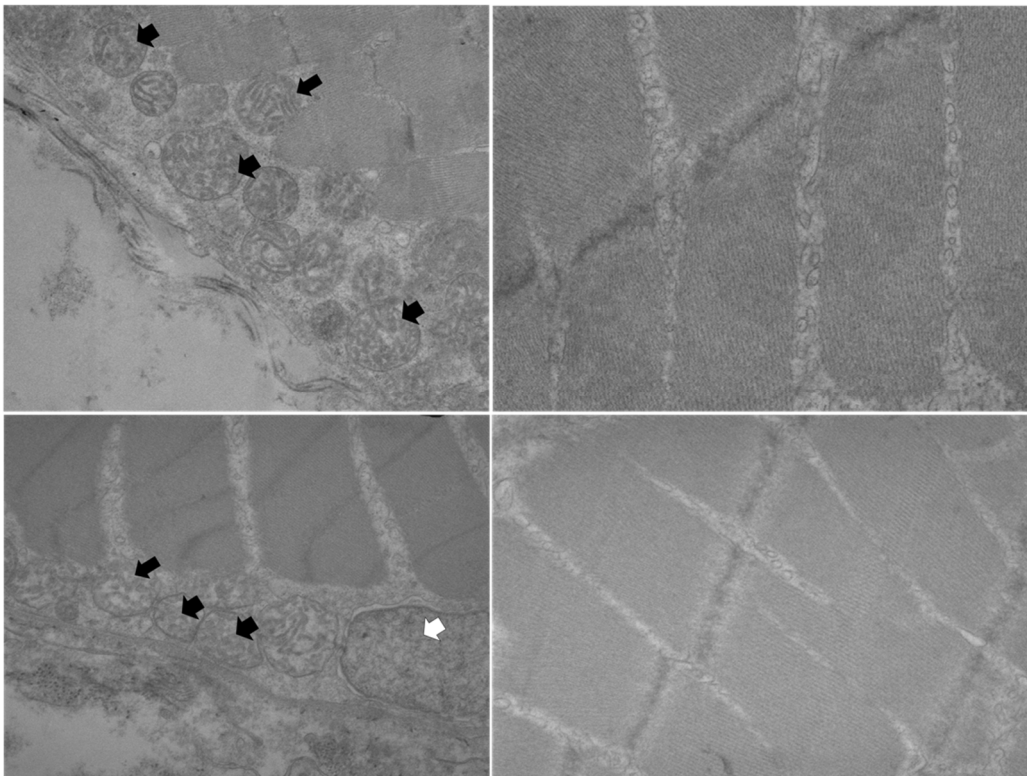


Figura 3.24. Músculo blanco (fibras tipo II) el día 0 tras el sacrificio con el detalle de las mitocondrias subsarcolémicas y línea Z con aturdimiento mediante shock térmico (imágenes superiores) y eléctrico (imágenes inferiores).

El día 2 tras el sacrificio (Figura 3.25), en la tinción con H&E se mantiene la tendencia de un aparente cuarteamiento de las fibras en el músculo de los peces aturridos mediante shock térmico, tanto en las fibras tipo II como las tipo I. Sin embargo, con la técnica del PTAH esa disgregación evidenciada en el aturdimiento con shock térmico en el día 0 se hace menos evidente en ambos tipos de músculo. La técnica de Gomori pone de manifiesto el patrón diferencial entre aturdimientos, aunque tras estos dos primeros días de almacenamiento en hielo con el almacén en hielo durante 2 días, se suaviza la imagen consolidada de acúmulo de material colagenoso tan evidente en el día 0. Con

el PAS se aprecia una mayor presencia de positividad correspondiente con glucógeno, siendo muy evidente un mayor acumulo no consumido en las fibras de tipo I.

El nivel de expresión con el anticuerpo anti-actina se incrementa con la conservación en hielo a este día 2. El patrón de distribución diferencial observado en el día 0 se ha ido perdiendo sobre todo en el musculo de tipo II. En el musculo de tipo I, aunque conservado se va desdibujando, ofreciendo menores diferencias entre grupos (Figura 3.26).

Con la proteína de stress HSP70 la positividad en el musculo de tipo II fue prácticamente residual (Figura 3.26). En el musculo de tipo I, al igual que sucedió el día 0, la mayor expresión de la proteína de stress HSP70 en el día 2 tras el sacrificio se detectó en el aturdimiento mediante shock térmico, estando prácticamente ausente en el eléctrico.

Tras 6 días de almacenamiento en hielo, las fibras de musculo de tipo II y las del musculo de tipo I mostraron una imagen compacta y sin signos de deterioro con la H&E. Las estriaciones o fragmentaciones que podía apreciarse en el día 0 y el día 2 fueron menos evidentes. Con la técnica del PTAH se evidenció un patrón más granular en aturdimiento mediante shock eléctrico, tanto en fibras tipo II como fibras tipo I. Con la técnica de Gomori, aunque todavía era apreciable la coloración intrafibrilar en las fibras del musculo de tipo II con el aturdimiento eléctrico, esta fue menos manifiesta, no apreciándose diferencias en el musculo de tipo I. En el PAS se mantiene la tendencia a una mayor presencia de glucógeno en aturdimiento eléctrico, especialmente en las fibras I (Figura 3.27).

La manifestación del anticuerpo anti-actina siguió incrementándose, con un patrón de huella dactilar más conservado en el caso del aturdimiento con shock térmico y especialmente en las fibras tipo II. La expresión de la proteína de stress HSP70 en las fibras de tipo II en el día 6 está muy degradada, hasta ser prácticamente nula, mientras que en las de tipo I, si bien residual aún era localizable e, el aturdimiento eléctrico (Figura 3.28).

Mediante la visión con microscopía electrónica, al igual que sucedió el día 0 tras el sacrificio, los cambios determinados fueron encaminados a buscar diferencias en el tamaño de las mitocondrias subsarcolémicas, ya que se mantenía la ausencia de una presencia significativa de mitocondrias interfibrilares. Se mantuvo la apariencia más compacta de las líneas Z en el aturdimiento eléctrico. Respecto al aspecto de las mitocondrias tras su almacén en hielo, se encontraron crestas mitocondriales más cortas, la membrana de las crestas más remarcada y presencia de grumos en la matriz mitocondrial producto de los fenómenos de autolisis (Figura 3.29).

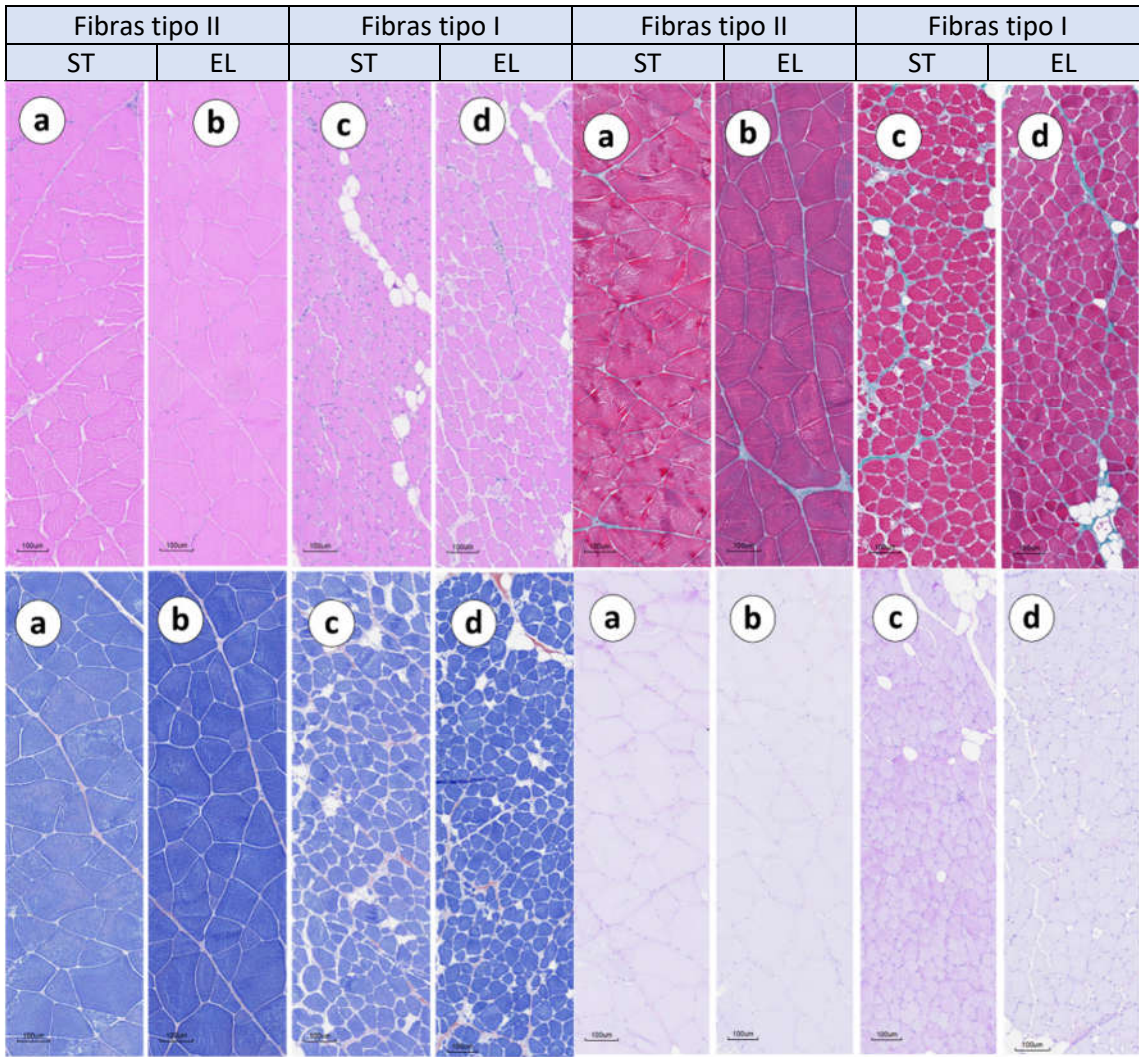


Figura 3.25. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) el día 2 tras el sacrificio en función del tipo de aturdimiento mediante shock térmico (ST) o eléctrico (EL) con las técnicas de H&E, PTAH, Gomori y PAS (de izquierda a derecha y de arriba abajo).

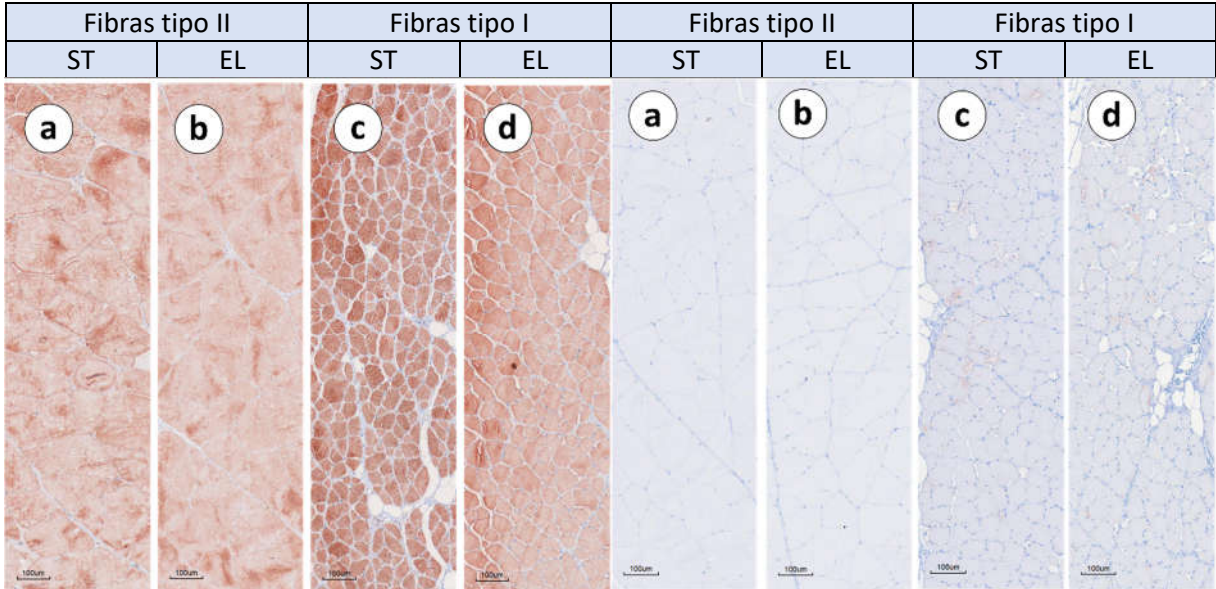


Figura 3.26. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) el día 2 tras el sacrificio en función del tipo de aturdimiento mediante shock térmico (ST) o eléctrico (EL) para detección de Actina y HPS70 (de izquierda a derecha).

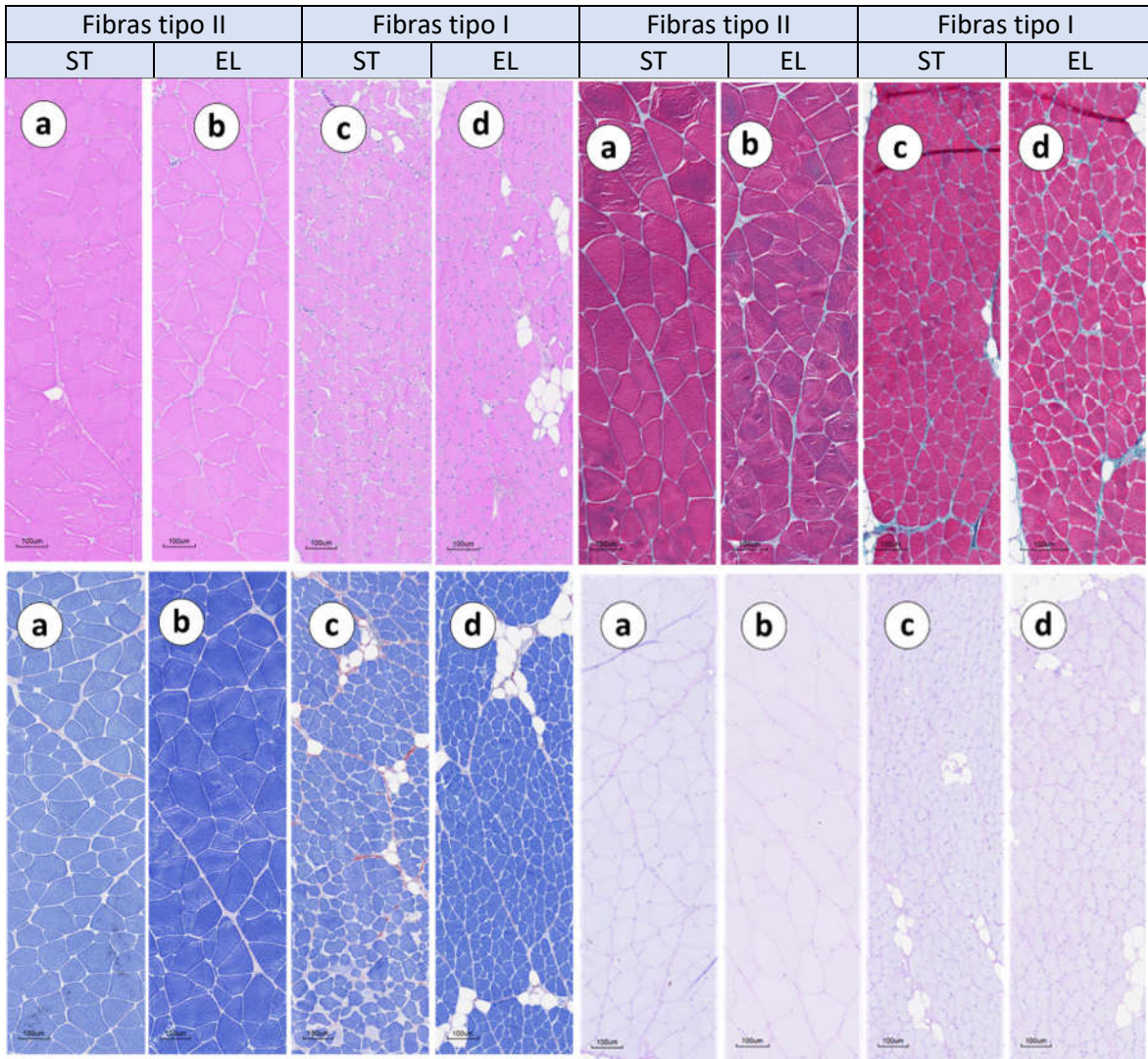


Figura 3.27. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) el día 6 tras el sacrificio en función del tipo de aturdimiento mediante shock térmico (ST) o eléctrico (EL) con las técnicas de H&E, PTAH, Gomori y PAS (de izquierda a derecha y de arriba abajo).

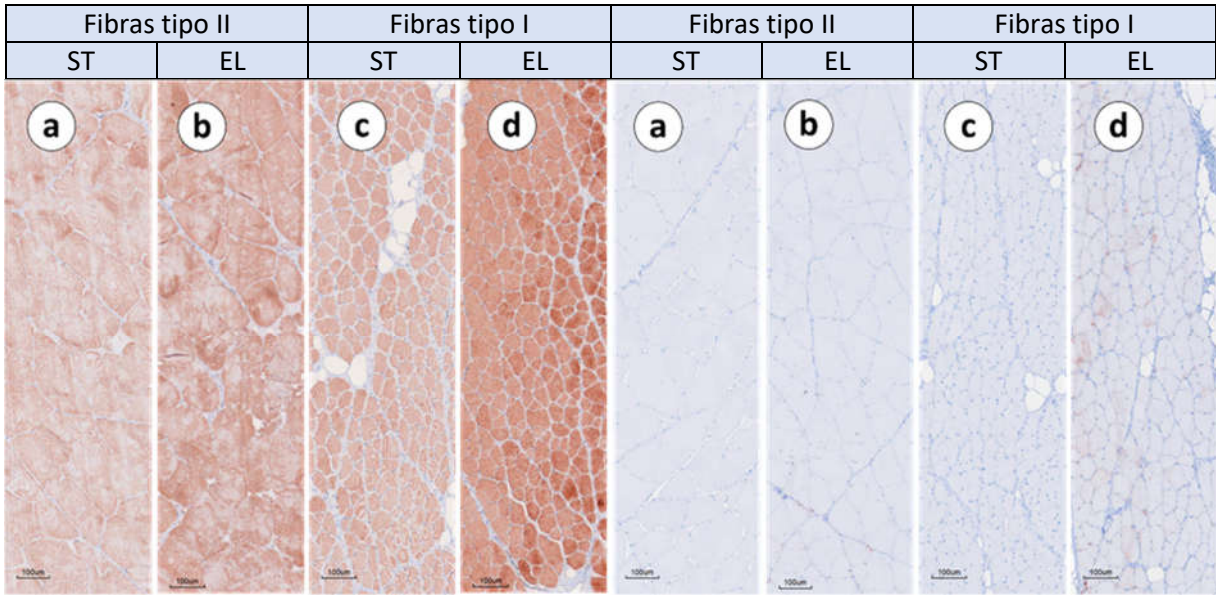


Figura 3.28. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) el día 6 tras el sacrificio en función del tipo de aturdimiento mediante shock térmico (ST) o eléctrico (EL) para detección de Actina y HPS70 (de izquierda a derecha).

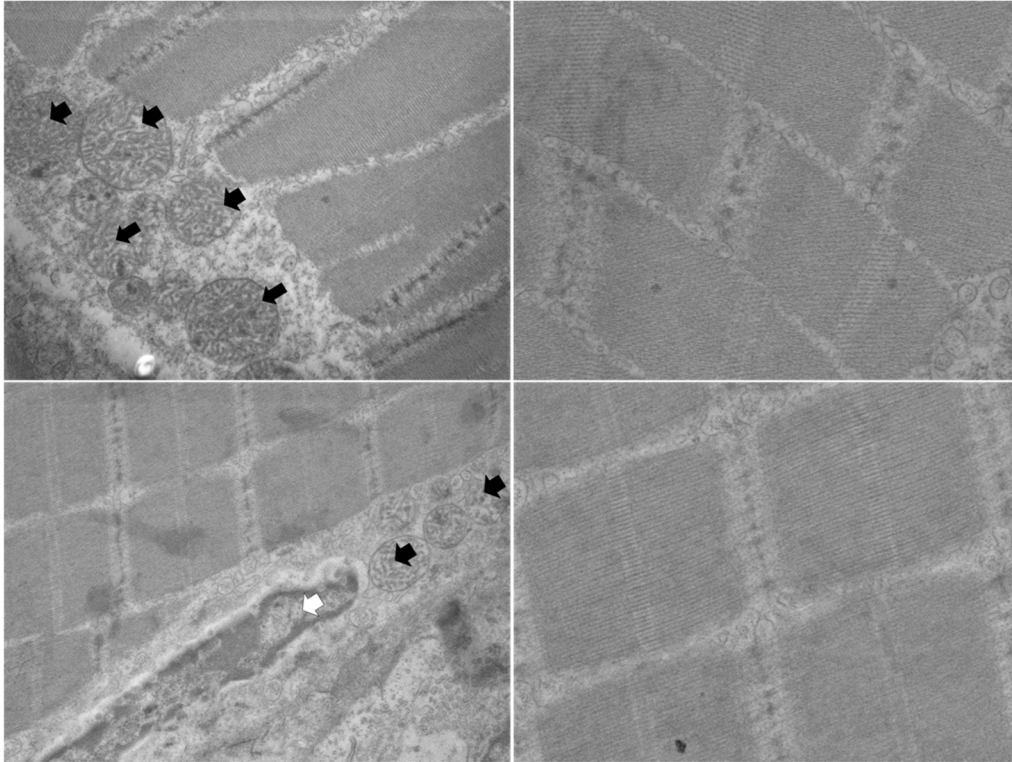


Figura 3.29. Músculo blanco (fibras tipo II) el día 6 tras el sacrificio con el detalle de las mitocondrias subsarcolémicas y línea Z con aturdimiento mediante shock térmico (imágenes superiores) y eléctrico (imágenes inferiores).

Ya en el día 10 de conservación en hielo con H&E sólo se observaron diferencias en las fibras de tipo I, con un patrón fibrilar algo diferente en aturdimiento con shock térmico frente al eléctrico, éste último con una fragmentación incompleta y más central. Con la técnica de la PTAH se aprecia mejor este patrón diferencial observado con H&E. La técnica de Gómori ofrece un dibujo similar a lo determinado en los anteriores puntos de muestreo, disminuyendo la intensidad en los infiltrados. En el PAS se mantiene el mayor acumulo de glucógeno en el aturdimiento mediante shock térmico, apreciable especialmente en las fibras de tipo I (Figura 3.30).

Como ya sucedió en el anterior punto de muestreo, el patrón de huella dactilar en la anti-actina, a pesar de estar muy difuso, siguió más conservado en el aturdimiento mediante shock térmico en ambos tipos de fibras. También hubo una mayor expresión de la proteína de estrés HSP70 (Figura 3.31).

Por último, en el día 14 tras el sacrificio, la H&E muestra un patrón de cuarteamiento hace más heterogéneo, pudiendo ser más visible en las fibras tipo II, las de mayor calibre, con el aturdimiento eléctrico. Este efecto puede ser apreciado con más detalle con la técnica del PTAH. Con la de Gomori se evidencia la pérdida del contenido proteinaceo depositado en las fibras visible en los anteriores puntos de muestreo. De la misma manera, con la técnica PAS, aunque se mantiene todavía la tendencia de más glucógeno en aturdimiento mediante shock térmico, las diferencias son menos apreciables con respecto al eléctrico (Figura 3.32).

La expresión del anticuerpo anti-actina al final del periodo de conservación en hielo es marcada y difusa, y aún siendo el patrón de huella dactilar más habitual en el aturdimiento mediante shock térmico, es residual tanto en fibras tipo II como fibras tipo I. La expresión de la proteína de stress HSP70 en el día 14 se pierde en ambos aturdimientos (Figura 3.33).

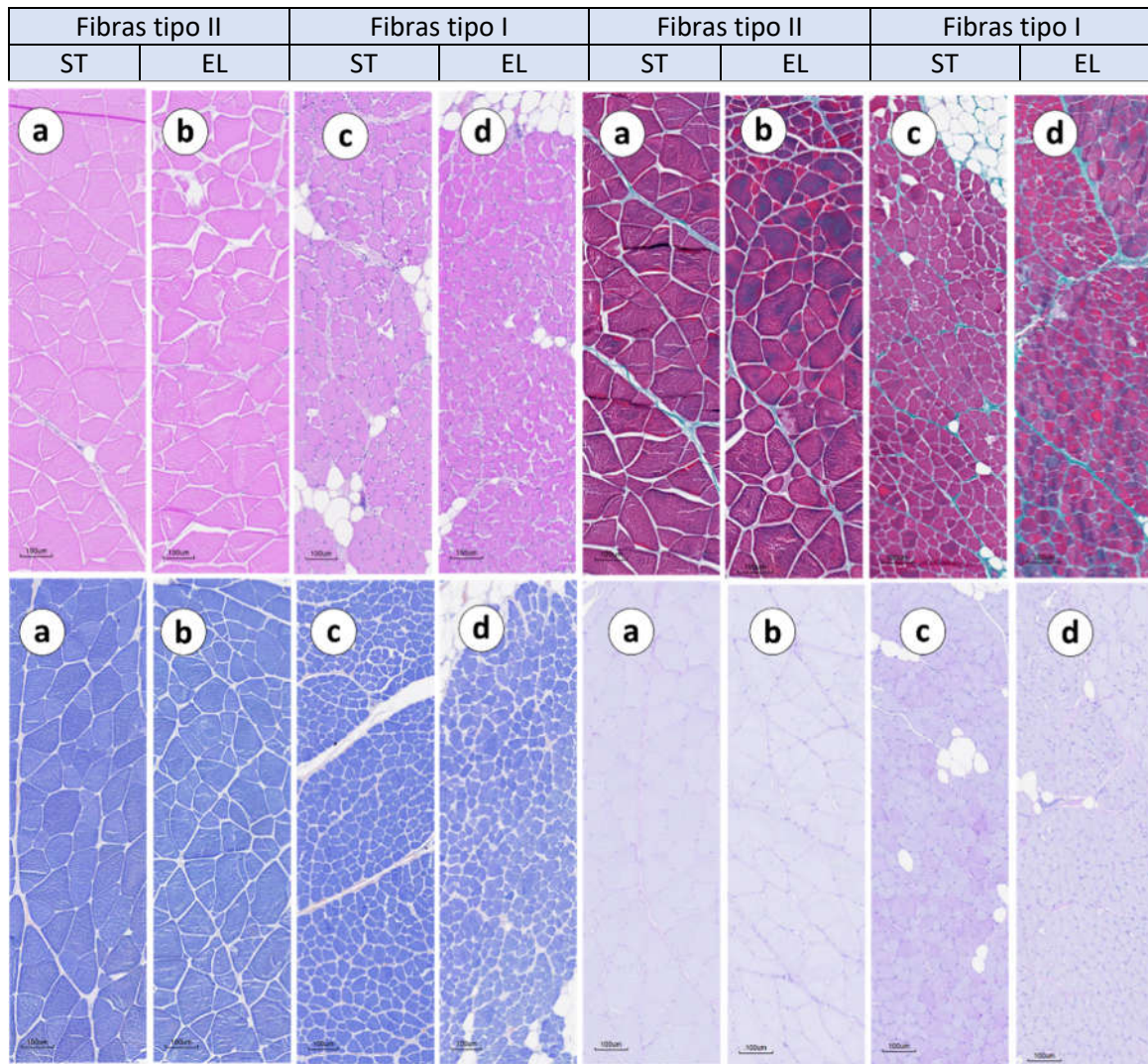


Figura 3.30. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) el día 10 tras el sacrificio en función del tipo de aturdimiento mediante shock térmico (ST) o eléctrico (EL) con las técnicas de H&E, PTAH, Gomori y PAS (de izquierda a derecha y de arriba abajo).

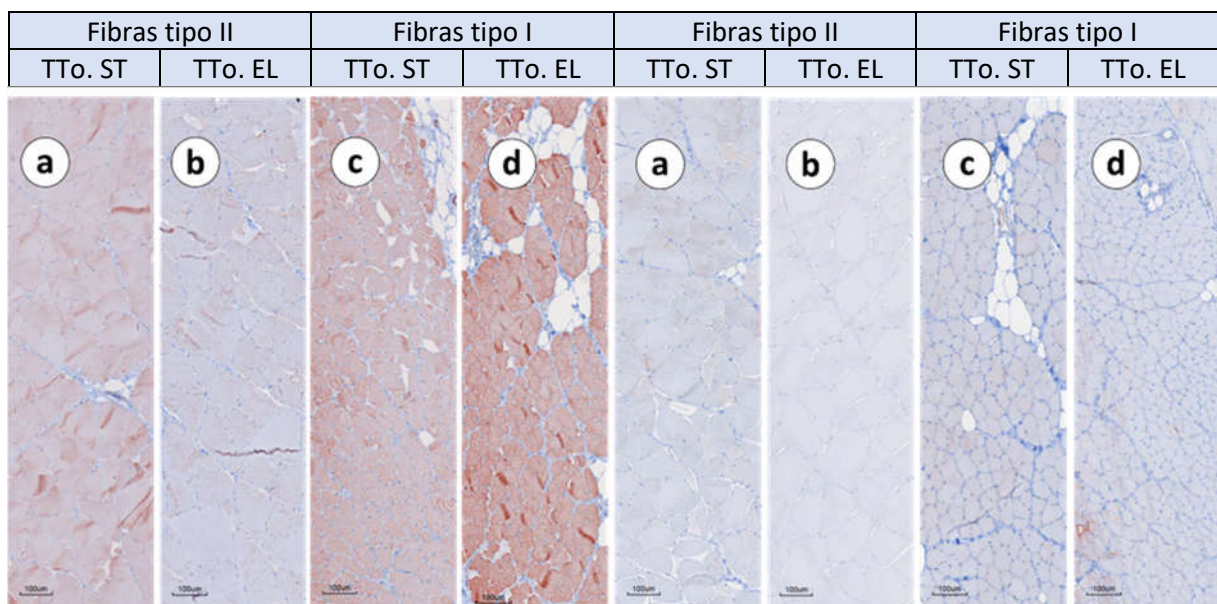


Figura 3.31. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) el día 10 tras el sacrificio en función del tipo de aturdimiento mediante shock térmico (ST) o eléctrico (EL) para detección de Actina y HPS70 (de izquierda a derecha).

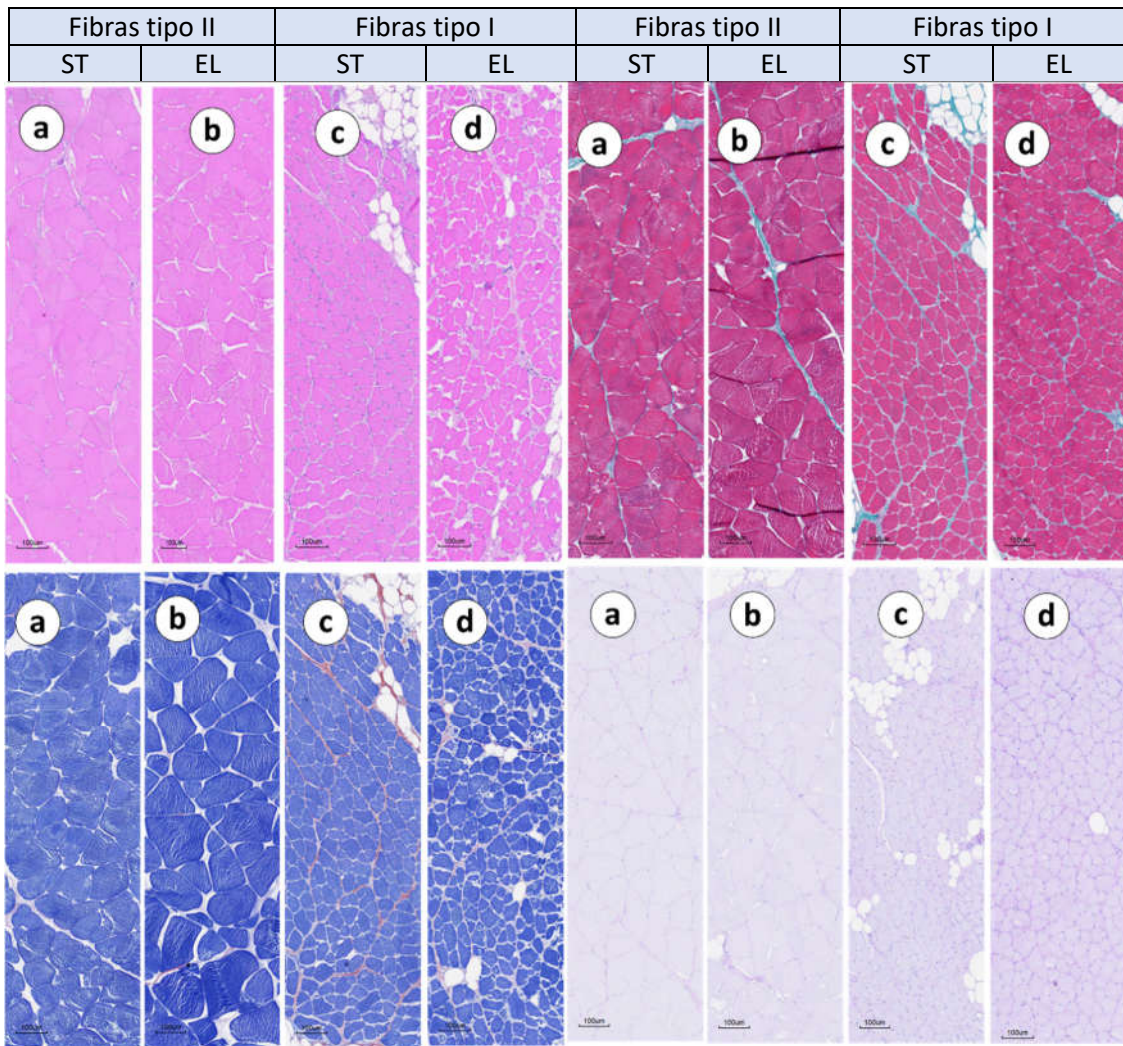


Figura 3.32. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) el día 14 tras el sacrificio en función del tipo de aturdimiento mediante shock térmico (ST) o eléctrico (EL) con las técnicas de H&E, PTAH, Gomori y PAS (de izquierda a derecha y de arriba abajo).

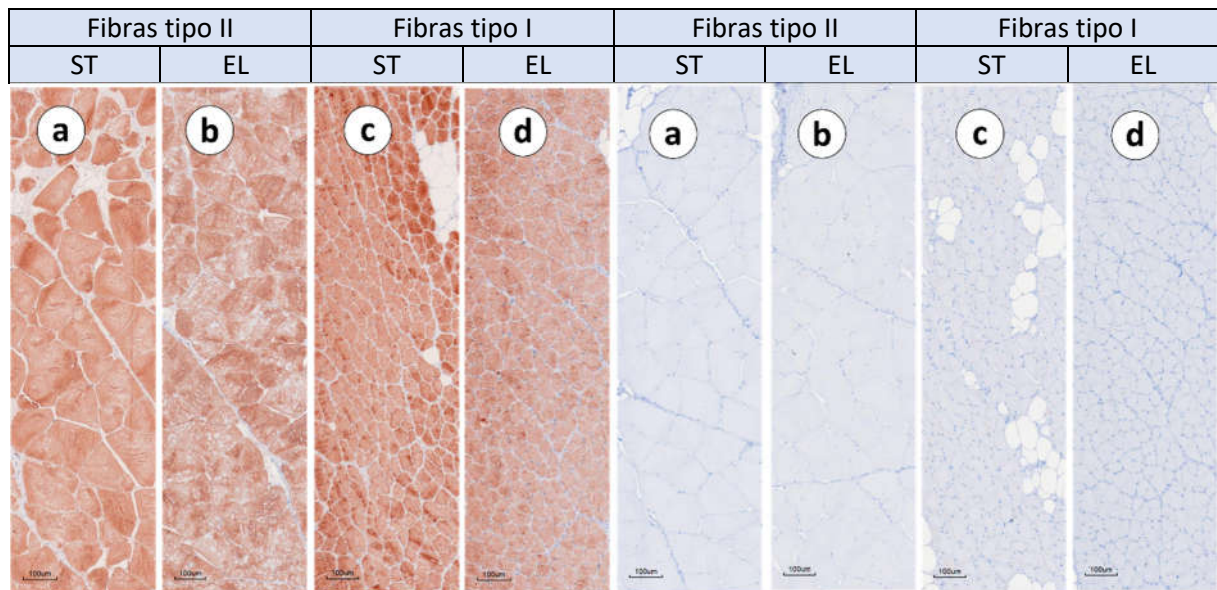


Figura 3.33. Músculo blanco (fibras tipo II) y músculo rojo (fibras tipo I) el día 14 tras el sacrificio en función del tipo de aturdimiento mediante shock térmico (ST) o eléctrico (EL) para detección de Actina y HPS70 (de izquierda a derecha).



Actividad 3.3 Validación a escala comercial.

- *Entidades participantes: ULPGC, IMIDA*
- *Presupuesto inicial y Presupuesto ejecutado:*

Se ha ejecutado el 100% del presupuesto asignado a esa actividad ya que se ha adquirido todo lo requerido para completar esta actividad, aunque parte de ella, la correspondiente a los experimentos de invierno, todavía no se ha desarrollado.

- Descripción de las tareas y trabajos realizados

La prueba de validación se ha realizado en la empresa AQUANARIA, ubicada en la isla de Gran Canaria y dedicada a la producción de lubinas de tallas elevadas. Si bien en la memoria del proyecto se detalló la pretensión de hacerla en las instalaciones de viveros flotantes, intentar testar un protocolo de aturdimiento eléctrico utilizando un prototipo que requeriría las correspondientes certificaciones para poder ser emplazado en la cubierta del barco, ha obligado a llevarlo a cabo en las dependencias que la citada empresa tiene en tierra.

Se han comparado los efectos del aturdimiento mediante shock térmico frente al aturdimiento eléctrico, en ambos casos completándose el proceso con el sacrificio en agua-hielo (1:1, v/v). Las lubinas, con un peso medio de 3,128 kg, fueron aturdidadas con un prototipo suministrado por la empresa Fish Management Systems.

Tras el aturdimiento se determinó la pérdida de consciencia siguiendo el protocolo descrito en la actividad 3.1. Los peces fueron sacrificados y conservados en cajas de poliestireno expandido cubiertos con hielo en escamas y se conservados en una cámara frigorífica a 4 C durante 2 días. Durante este periodo se realizó un seguimiento de las características de frescura atendiendo al protocolo del QIM, así como de la evolución del *Rigor Mortis*, la apertura de boca y opérculos y la posible presencia de petequias a nivel ventral o el enrojecimiento de la cabeza.

Tras concluir el periodo de conservación en hielo, se realizó un análisis sensorial del producto cocinado siguiendo los procedimientos que la empresa AQUANARIA tiene implantados y que desarrolla con su panel interno de evaluadores entrenados. Se valoraron características de olor, textura y sabor, buscando las posibles diferencias achacables al sistema de aturdimiento.

- Resultados obtenidos

El aturdimiento en las lubinas tras la electrocución fue inmediato. No se observó ningún signo de recuperación tras la introducción en el agua:hielo ni hasta completarse el sacrificio unos 90 min más tarde. Por su parte, el tiempo hasta alcanzarse el aturdimiento mediante shock se demoró en algún individuo hasta los 8 min, ligeramente superior a lo observado en las pruebas realizadas en las actividades anteriores con individuos de menor talla. Ello habrá sido debido



a una reducción de la temperatura corporal menos dramática (no se monitorizó este parámetro).

El aspecto externo de las lubinas no fue diferente entre los dos tipos de aturdimiento. Lo observado en el laboratorio en relación a bocas y opérculos abiertos, así como cierto grado de enrojecimiento en la cabeza, no se repitió en la prueba realizada en la granja. Tampoco se detectaron diferencias en los atributos que describen la frescura ni en la evolución del *Rigor Mortis*.

Por último, tampoco se detectaron diferencias en las valoraciones de los atributos utilizados para el perfil sensoria de la lubina tal cual está establecido por el panel de evaluadores de la empresa Aquanaria.

Actividad 3.4 : Determinación de la respuesta de estrés y calidad de la carne de truchas arcoíris sometidas a dos tipos de aturdimiento, eléctrico o hielo, comparando invierno y verano

Incluir, para cada una de las actividades en desarrollo o finalizadas, la siguiente información:

- *Entidades participantes:* UCM
- *Presupuesto inicial y Presupuesto ejecutado:*

	2021	2022	2023
Presupuesto inicial	31.905,54 €	19.310,55 €	13.204,91€
Presupuesto ejecutado	–	–	–

Tal como aparece en la memoria económica - JUSTIFICACIÓN GASTOS PROYECTO WELLSTUN.

- *Descripción de las tareas y trabajos realizados*

Dentro del WP3, Llevar a cabo una evaluación a escala comercial de un proceso de sacrificio donde se comprueben las mejores condiciones de pre-sacrificio y se evalúen los indicadores de consciencia y confirmación de la muerte que estaba incluido dentro del tercer Objetivo Especifico (OE3) y en relación con la Tarea 3.4. el objetivo marcado determinar la respuesta de estrés y calidad de la carne de truchas arcoíris sometidas a dos tipos de aturdimiento, eléctrico o hielo, debido a la gran repercusión que tiene en la trucha la temperatura del agua se realizarán en dos épocas muy diferentes donde la temperatura del agua será muy diferente como son verano e invierno.

El objetivo marcado en esta tarea se ha cumplido al 100 % y se han desarrollado de todas las actividades planteado en el proyecto. Para ello se adquirieron 200 truchas a una piscifactoría comercial de trucha arcoíris localizada en Guadalajara, que suministró truchas de tamaño ración de 300 a 400 g y se transportaron a las instalaciones del piscifactoría de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Montes, Forestal y del Medio Natural.

En la piscifactoría de la Escuela los peces se mantuvieron durante una semana en los tanques o “raceways”, en una densidad aproximada de biomasa de 15 kg/m^3 , similar a un tipo comercial. Las truchas durante esta adaptación fueron alimentadas dos veces al día con una tasa del 1,7 % de su peso vivo (nivel recomendado en trucha arcoíris con una temperatura del agua de $12\text{-}17 \text{ }^\circ\text{C}$; NRC, 1981).

Se realizaron dos pruebas similares en dos estaciones diferentes, invierno y verano, para poder comparar los datos obtenidos según la temperatura del agua. Los peces se aturdieron antes del sacrificio mediante:

- **Electronarcosis:** Para el aturdimiento eléctrico o electronarcosis se utilizó un aturridor eléctrico en seco experimental. Se emplearán dos ciclos de intensidades eléctricas distintas: 400 mA durante 0,5 s y 200 mA durante 1,5 s posteriores (E1) o 200 mA durante 2 s (E2).
- **Agua con hielo (H):** Se comprobó que tengan una temperatura inicial mínima de 1°C y que no supere los 4°C . Se mantendrán a los peces en esta mezcla de agua y hielo durante 36 minutos máximo. Se controló la temperatura del agua con ibuttons (sensores de temperatura pequeños) y usando termómetros.

Durante la prueba se procedió a sacar a los peces individualmente y aturdirlos por vía del aturridor eléctrico o con hielo, tal y como se describe en la Figura 4. El primer pez se aturdió eléctricamente mediante el sistema E1 y se metió en hielo, el segundo se aturdió eléctricamente mediante el sistema E2 y se metió en hielo, el tercero se introduce en hielo/agua directamente, el cuarto y quinto pez se aturdió eléctricamente mediante los métodos E1 y E2, respectivamente, para después ser introducidos en agua a temperatura ambiente (para ver la duración del aturdimiento sin hielo). A los tres minutos los peces E3 y H3 se metieron en agua y se observará posible recuperación, a los 9 minutos los peces E9 y H9 se metieron en agua y se observó la posible recuperación, etc. Los cubos donde se situaron a los peces durante este muestreo deberán tener un diámetro de al menos 30-35 cm en la parte inferior, para asegurar que los peces tengan suficiente espacio.

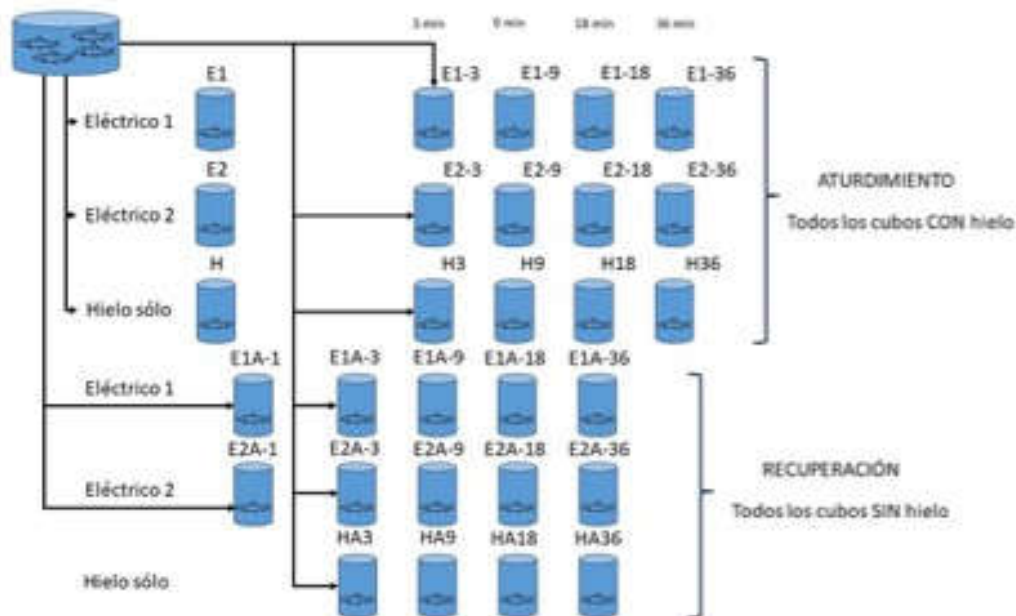


Figura 1.- Plan de muestreo de truchas, diferenciando entre los peces aturridos eléctricamente mediante los dos sistemas y con hielo solo. Se empieza por el pez E1,



seguido por E2 y H, luego E1A-1 y E2A-1, E1-3, E2-3, H3, E1-9, E2-9, H9, E1-18, E2-18, H18, E1-36, E2-36 y H36.

Los peces E y H se mantuvieron en agua con hielo y se les realizó un test de consciencia a los 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 y 32 min. Después de cada réplica se pesaron a todos los peces y se les tomo una muestra de sangre a partir de la vena caudal.

La sangre se trasvasó a dos tubos uno con anticoagulante, EDTA para obtener plasma y otro con FNa para evitar el uso de glucosa por parte de los eritrocitos y obtener suero. Inmediatamente se centrifugaron a 6.000 rpm durante 5 minutos y el plasma y el suero alicuotaron en otros botes de 1,5 ml para su congelación a -32 °C y poder realizar posteriormente los análisis sanguíneos de cortisol, glucosa, lactato, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados y actividades enzimáticas como la lactato deshidrogenasa (LDH) y la creatinina fosfoquinasa (CPK).

Para la tomaron muestras de hígado y músculo se congelar en nitrógeno líquido para la determinación de la concentración de glucógeno hepático y muscular. Se midió el color de la piel de estos animales, en hígado se cuantificó el color hepático y el color muscular, además se tomó el pH del músculo y en otros 10 peces de valoró el establecimiento del *rigor mortis*. Además se tomaron muestras para valorar parámetros de expresión génica en las truchas relacionadas con las funciones básicas de respuesta de estrés, pero como la última toma de muestras fue en verano están todavía procesándose para la obtención de resultados, ya que para evitar distorsiones en las evaluación se remitieron todas la muestras en congelación en dos tandas separadas 1 mes en el junio y julio tal como aparece en la memoria económica del proyecto.

Test de consciencia y recuperación

Para valoró el grado de consciencia de los peces usando cuatro indicadores de acuerdo con Morzel et al. (2002): evaluación de la respiración (movimiento de opérculo), la pérdida de equilibrio (capacidad para enderezarse), la respuesta a un pinchazo (estímulo táctil con punta metálica) y el reflejo vestibulo-ocular (vestibulo-ocular réflex o VOR), ver Tablas 1 y 2. Se cuantificó la recuperación y se anotó el tiempo que tardan en recuperarse.

Tabla 1. Test para evaluar estado de consciencia/recuperación post-aturdimiento

Test	Respiración	Capacidad para enderezarse	Respuesta a un pellizco en la cola	Reflejo vestibulo - ocular
Protocolo	Observar al pez no perturbado	Colocar el pez en posición lateral	Agarrar la cola firme y arrastrar el pez a la línea de flotación mientras que se araña la cola	Agarrar el pez firmemente y girarlo desde una posición horizontal a una posición vertical; los ojos siempre deben estar enfrentados a los del observador
Localización	En agua	En agua	En agua	En aire
Observaciones	Movimiento (existencia y ritmo) de los opérculos branquiales	Capacidad o el intento de volver a una posición natural	Intención de escapar	Giro de los ojos para compensar los cambios en la postura corporal

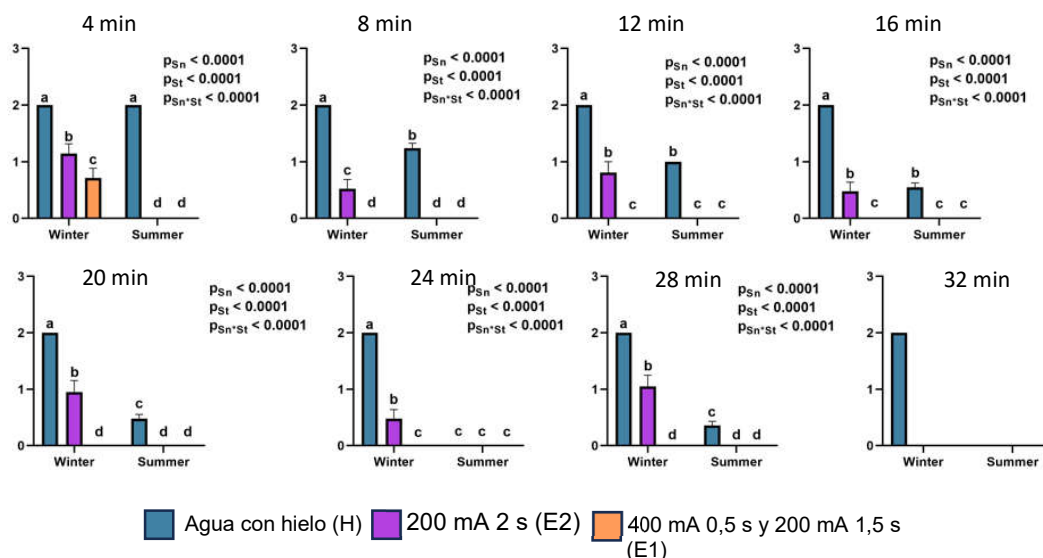


Tabla 2. Puntuaciones atribuidas a las observaciones hechas para cada test

Puntuación	Respiración	Capacidad para enderezarse	Respuesta a un pellizco en la cola	Reflejo vestibulo-ocular
0	Ningún movimiento rítmico opercular	No hay intento	No hay respuesta	No hay movimiento del ojo
1	Movimiento opercular irregular, reducido, más profundo, o rápido de lo normal	Intento lento o retrasado	Intento débil para escapar	Movimiento de los ojos lento y retrasado
2	Movimiento opercular regular lento	Respuesta inmediata	Claro intento para escapar	Claro movimiento de los ojos

- Resultados obtenidos

Los resultados obtenidos en esta prueba sobre la determinación de la respuesta de estrés y calidad de la carne de truchas arcoíris sometidas a dos tipos de aturdimiento, eléctrico o hielo, comparando invierno y verano, se presentan a continuación:



P_{Sn} : Valor P efecto Estación; P_{St}: Valor P efecto Aturdimiento; P_{Sn*St}: Valor P efecto interacción

Figura 1.- Valoración de la respiración de las truchas sometidas a los sistemas de aturdimiento Agua con hielo (H), 400 mA durante 0,5 s y 200 mA durante 1,5 s posteriores (E1) o 200 mA durante 2 s (E2)

Se puede observar cómo en verano las truchas sometidas a agua con hielo pierden la capacidad de tener movimientos de respiración a las 28 minutos, donde de forma espontánea puede aparecer algún movimiento, mientras que en cuando se aplicó un aturdimiento por electronarcosis desde el momento inicial en verano no aparecieron ningún movimiento opercular de respiración, mientras que en invierno perdieron ese reflejo dependiendo del tipo de aturdimientos eléctrico empleado, el E1 lo perdió desde el momento 8 minutos, mientras que el E2 mantuvo hasta el tiempo 28 minutos.

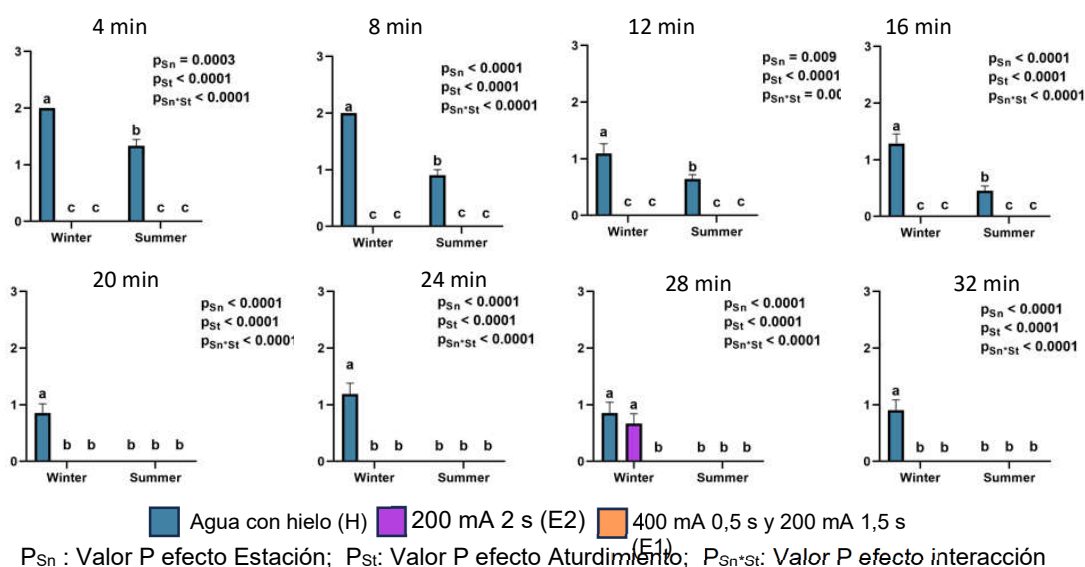


Figura 2.- Valoración de la capacidad de enderezarse de las truchas sometidas a los sistemas de aturdimiento Agua con hielo (H), 400 mA durante 0,5 s y 200 mA durante 1,5 s posteriores (E1) o 200 mA durante 2 s (E2)

En cuanto a la capacidad de enderezarse las truchas con electronarcosis los pierden desde el momento inicial, mientras que las que fueron sometidas a agua con hielo mantuvieron la capacidad hasta el minutos 16 si el sacrificio fue realizado en verano hasta más de 30 minutos cuando fue en invierno.

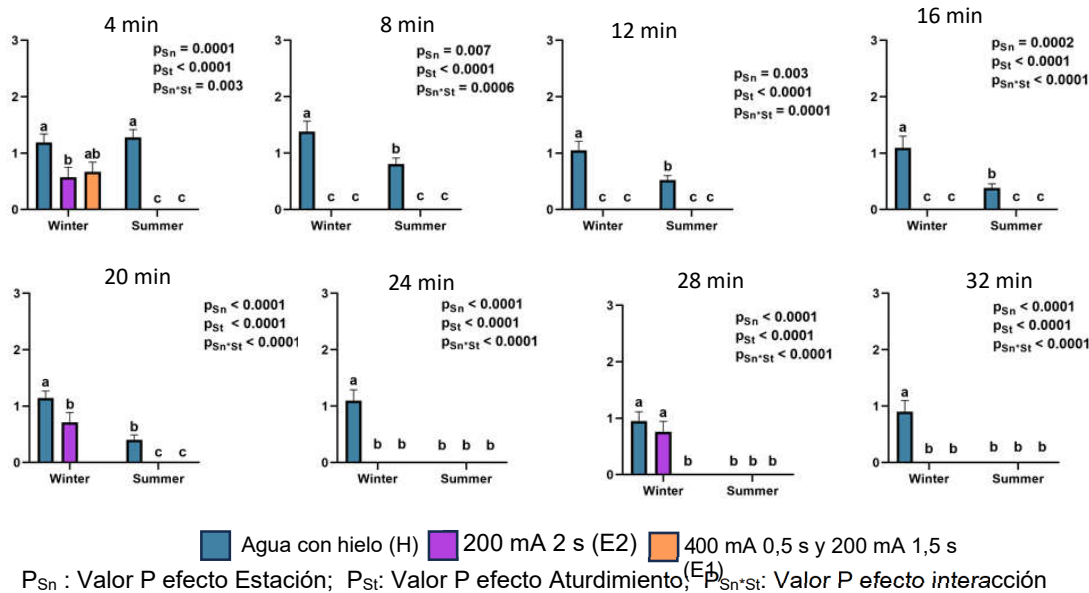
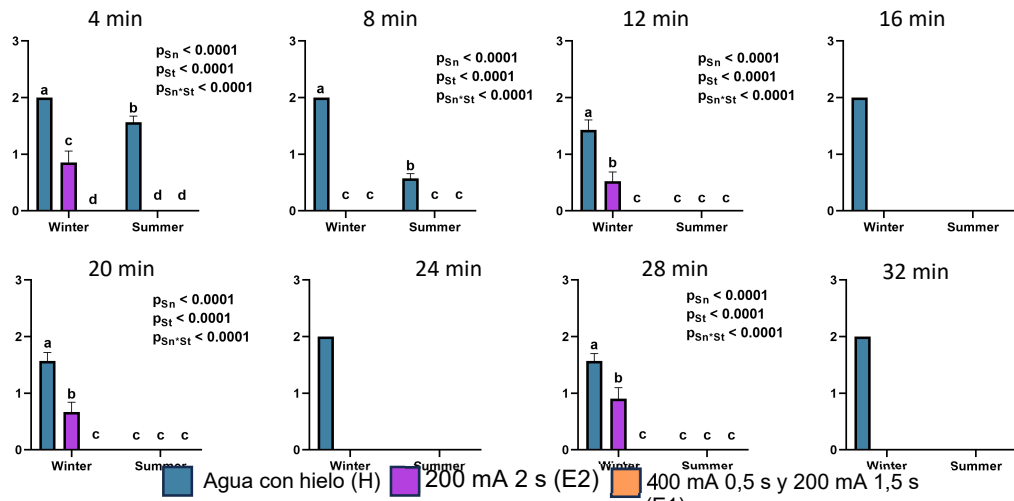


Figura 3.- Valoración de la respuesta al pinchazo de la cola de las truchas sometidas a los sistemas de aturdimiento Agua con hielo (H), 400 mA durante 0,5 s y 200 mA durante 1,5 s posteriores (E1) o 200 mA durante 2 s (E2)

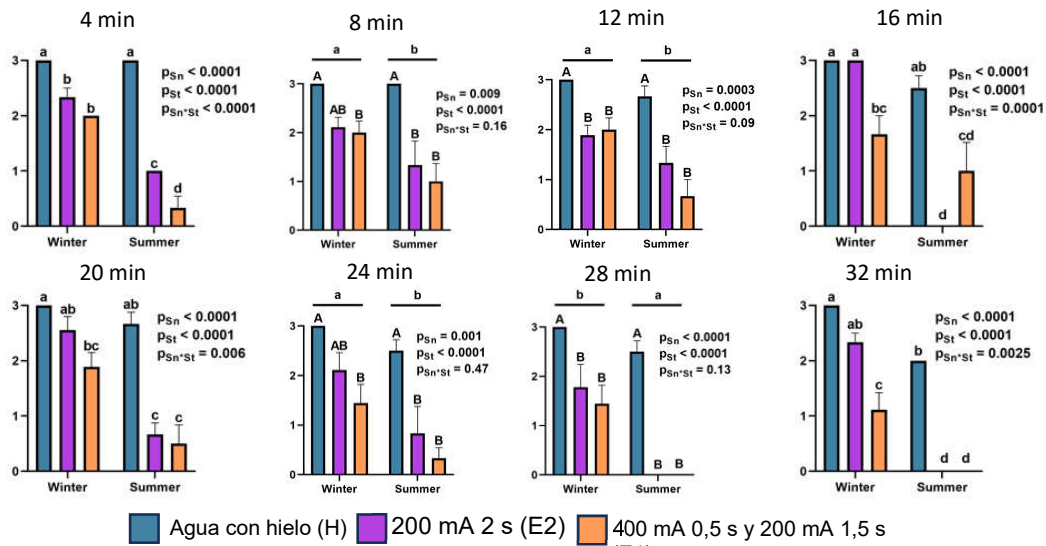
En el gráfico 3 se presentan los resultados de la respuesta al pinchazo en la cola. Se puede observar cómo y los peces con el aturdimiento eléctrico desde el momento inicial dejar de tener respuesta al pinzamiento con la cola en verano, sin embargo en invierno en la valoración que se hizo a los 4 minutos mostraban alguna respuesta. Los peces en aturdimiento en agua con hielo tanto en verano como en invierno mantienen respuesta de pinzamiento en la cola hasta los 20 minutos a partir de ese momento desaparece la respuesta de los peces en época estival, mientras que los de invierno presentan respuesta a l pinzamiento de la cola incluso por encima de los 30 minutos.

En la figura 4 se presenta la respuesta de las truchas al reflejo vestibulo-ocular. Se puede apreciar en la figura que el sistema de aturdimiento por agua con hielo, los peces verano dejar de tener este reflejo a los 12 minutos tras sacarlos del estaque y que en esta época las truchas sometidas a electronarcosis no presentan el reflejo desde el momento inicial. En época estival, se los peces sometidos al aturdimiento E2, a los 28 minutos se parecía que algún pez presenta el reflejo, pero los de E1 en ningún momento, sin embargo los sometidos a agua con hielo no lo pierden en ningún momento de la prueba.



P_{Sn} : Valor P efecto Estación; P_{St}: Valor P efecto Aturdimiento; P_{Sn*St}: Valor P efecto interacción

Figura 4.- Valoración de la respuesta vestibulo-ocular de las truchas sometidas a los sistemas de aturdimiento Agua con hielo (H), 400 mA durante 0,5 s y 200 mA durante 1,5 s posteriores (E1) o 200 mA durante 2 s (E2)



P_{Sn} : Valor P efecto Estación; P_{St}: Valor P efecto Aturdimiento; P_{Sn*St}: Valor P efecto interacción

Figura 5.- Valoración de la recuperación de la capacidad natatoria de las truchas sometidas a los sistemas de aturdimiento Agua con hielo (H), 400 mA durante 0,5 s y 200 mA durante 1,5 s posteriores (E1) o 200 mA durante 2 s (E2)

En la gráfica sobre la recuperación de capacidad natatoria de las truchas después de someterse a aturdimiento y ponerlas a diferentes tiempos a estanques con agua a temperatura ambiente se puede observar que las truchas sacrificadas en invierno independiente de método de aturdimiento puede recuperar la consciencia a los 10 minutos de haberse metido en agua a temperatura ambiente oxigenada independientemente del sistema de aturdimiento incluso tras media hora de encontrarse en agua con hielo aunque la proporción fue baja cuando el aturdimiento fue por el método E1 de dos intensidades de corriente. En época estival después de 24 minutos del aturdimiento por electronarcosis no se produjo ninguna recuperación de la capacidad natatoria.

Parámetros bioquímicos en sangre:

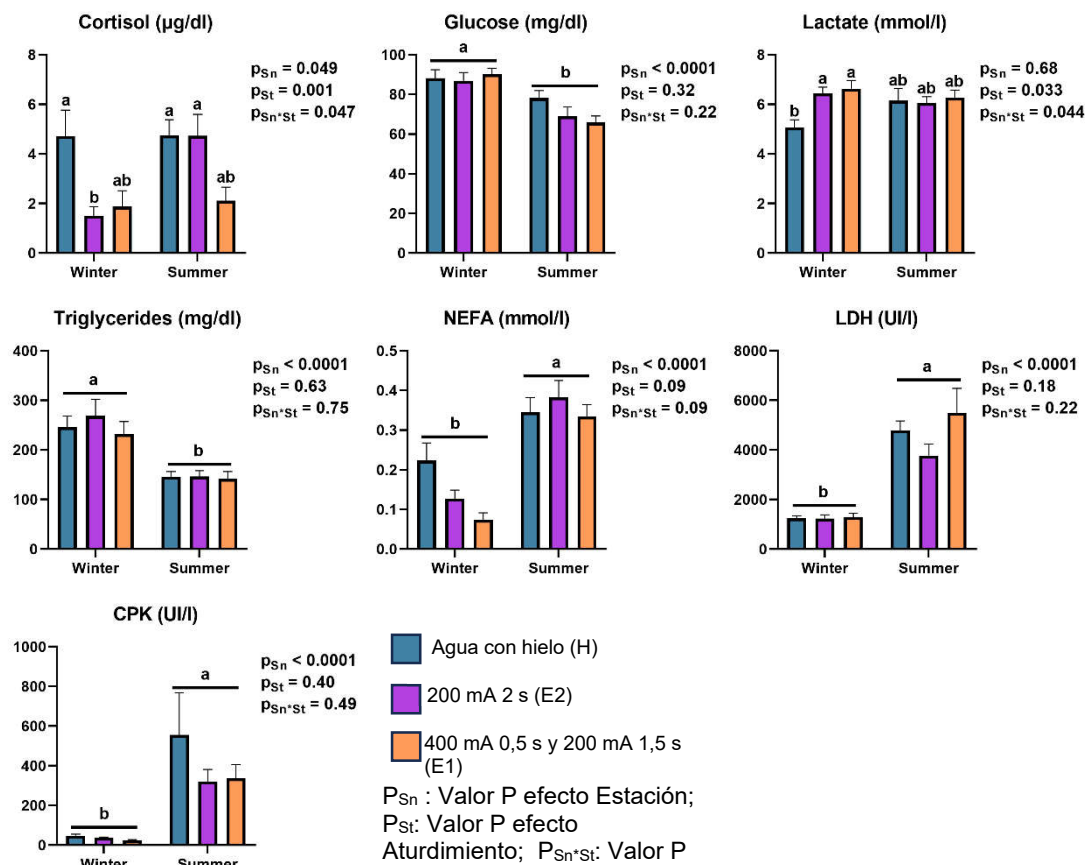


Figura 6.- Respuesta fisiológica de las truchas en función de la época del año y del tipo de aturdimiento

En la figura 6 se puede observar que en relación a la concentración de cortisol en plasma los peces en aturdimiento con agua con hielo mostraron una concentración más elevada tanto en verano como en invierno, en el caso de los peces sometidos al aturdimiento de tipo E2 mostraron en verano una concentración de cortisol elevada, mientras que en invierno no. Las truchas que fueron sometidos con al aturdimiento tipo E1 tanto en verano como en invierno mostraron una concentración muy baja del nivel de cortisol en plasma. En relación con la cantidad de glucosa observamos que en invierno muestran una concentración de glucosa más

elevada los aturridos en invierno que los aturridos en verano, independientemente del sistema de aturdimiento empleado. En cuanto a la Concentración de triglicéridos y de ácidos grasos libres (NEFAs) observamos que en invierno tiene mayor cantidad de triglicéridos que en verano y en cuanto a los ácidos grasos libres es superior en verano que en invierno. Las actividades enzimáticas son inferiores en invierno que en verano independientemente del sistema de aturdimiento, tanto para la LDH como para la CPK.

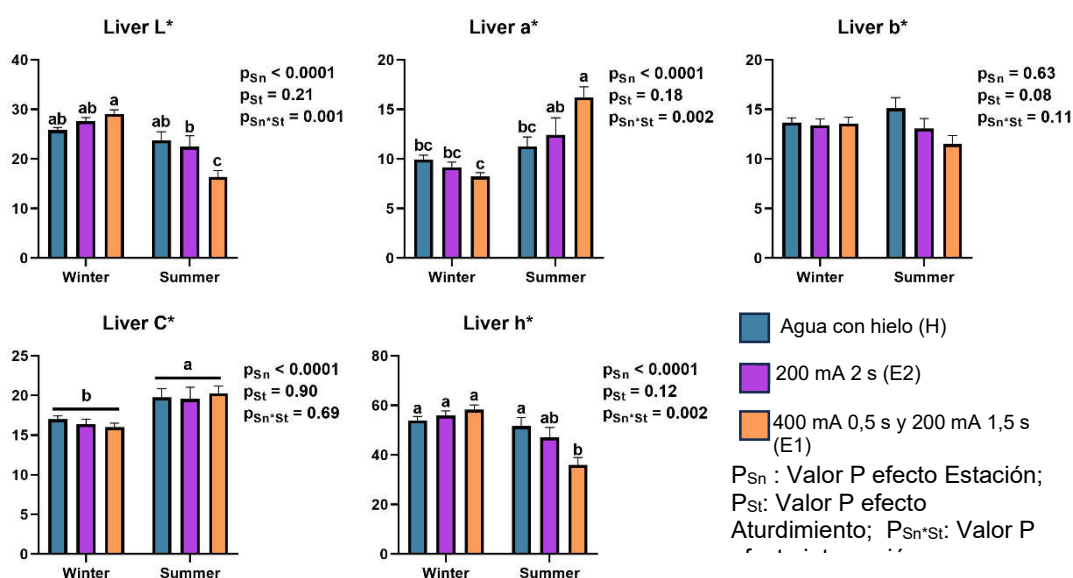


Figura 7.- Parámetros de color hepático de las truchas en función de la época del año y del tipo de aturdimiento

La Figura 7 muestra el resultado de los parámetros de color del hígado. En la gráfica podemos observar la respuesta de la coloración de la piel depende en gran medida de la época del año más que del sistema de aturdimiento. En verano los peces mostraron una tonalidad más oscura los peces sometidos al aturdimiento E1, se observa una menor luminosidad (L*) y un aumento del índice de rojo (a*) y una reducción del tono (h*). En invierno no hay diferencias en la tonalidad de la piel por el sistema de aturdimiento empleado.

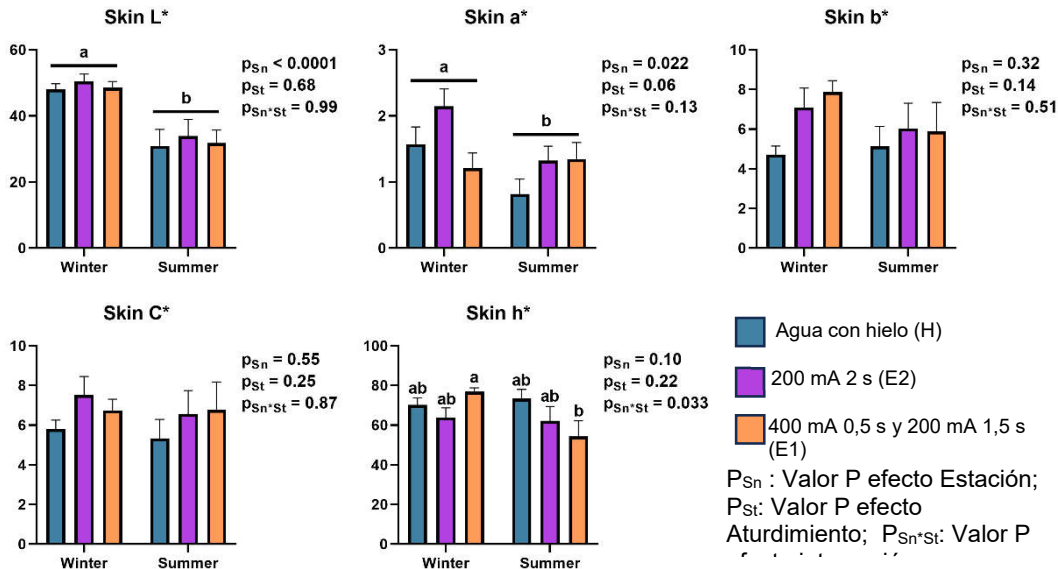


Figura 8.- Parámetros de color de la piel de las truchas en función de la época del año y del tipo de aturdimiento

En la figura 8 se presentan los resultados de la comparación de los parámetros de color de piel en función de la época de año y el sistema de aturdimiento. Podemos observar como el sistema de aturdimiento no tiene efecto sobre el color de la piel, pero sí la época de año. En invierno la piel es más clara por mostrar mayor luminosidad (L^*) y mayor índice de rojo (a^*). En la figura 9 se presentan los resultados de la concentración hepática y muscular de glucógeno.

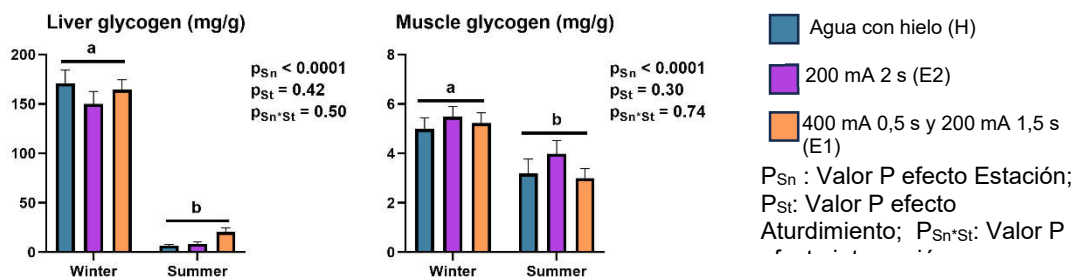


Figura 9.- Concentración hepática y muscular de glucógeno en función de la época del año y del tipo de aturdimiento

El tipo de aturdimiento no tiene ningún efecto sobre la concentración de glucógeno hepático ni muscular. Lo que se observa un claro efecto de la época del año donde en verano mostraron menor concentración de glucógeno en ambas localizaciones.

Parámetros de calidad de carne:

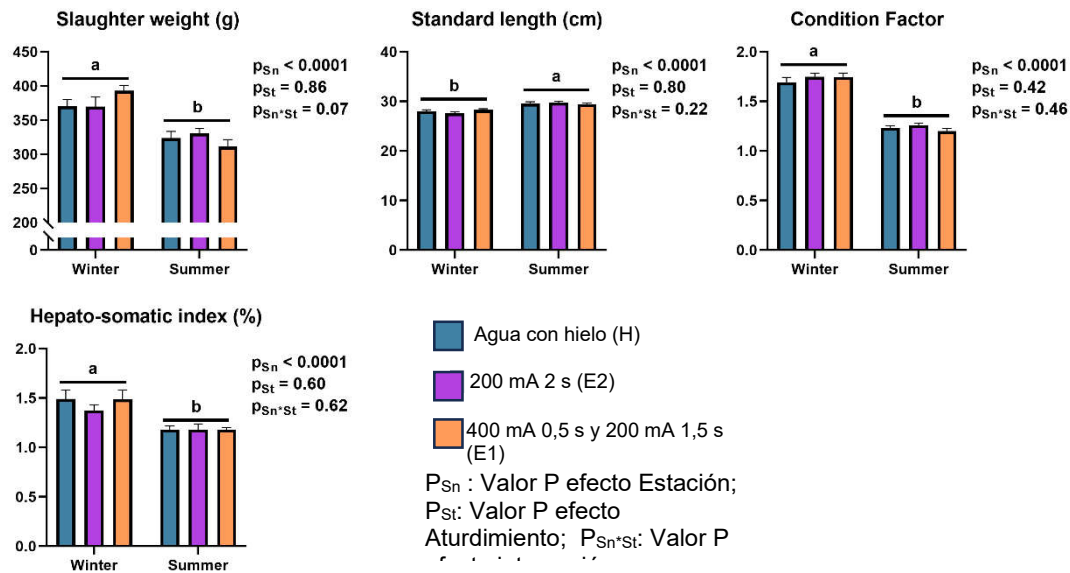


Figura 10.- Peso al sacrificio, longitud, factor de condición e índice hepato-somático en función de la época del año y del tipo de aturdimiento

En la figura 10 se puede observar que aunque en el peso de peces en verano es ligeramente inferior, aunque provenían de la misma piscifactoría unos 25 g menos que los de invierno, sin embargo en cuando al tamaño eran ligeramente más largos. Esto puede ser debido a que en verano los peces dejan de comer por tener una temperatura más alta del agua y provoca un reducción de la condición corporal como se ha observado como en verano el factor de condición es inferior lo mismo que ha sucedido con el hígado. El sistema de aturdimiento no ha provocado una reducción de tamaño corporal ni una reducción del factor de condición, ni del índice hepato-somático.

En la Figura 11 se muestran los resultados de la época del año y sistema de aturdimiento sobre el color de músculo a tiempo inicial 0 horas después de sacrificio. Se observa un efecto significativo de la época del año, donde los peces sacrificados en invierno tienen una coloración más clara por tener más luminosidad (L^*), menos índice de rojo (a^*) y amarillo (b^*), croma (C^*) y mayor tono (h^*). El sistema de aturdimiento no ha provocado ningún tipo de efecto sobre el color de músculo inicial.

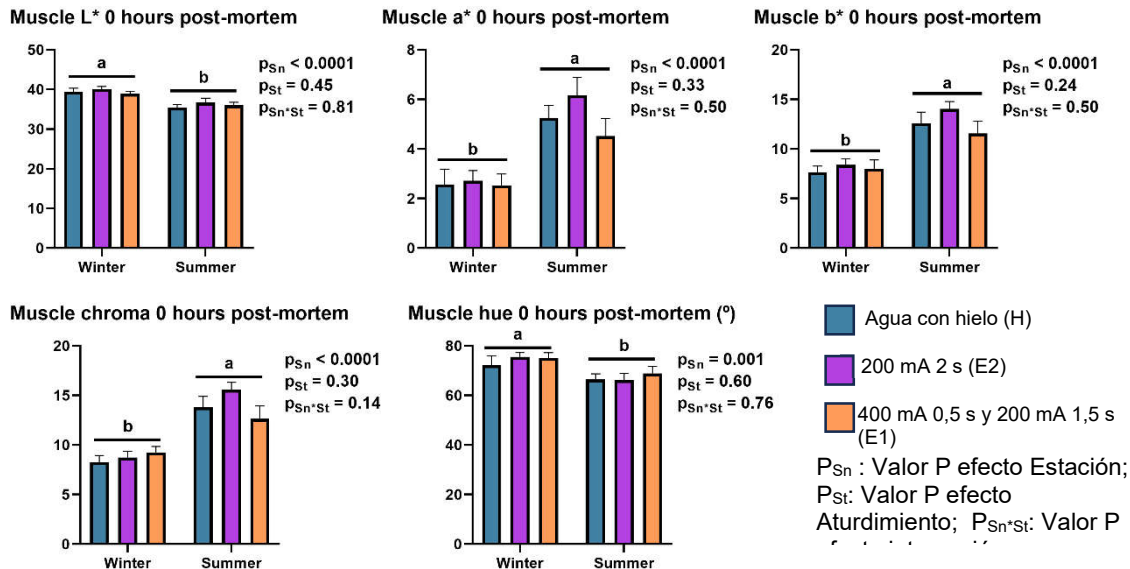


Figura 11.- Parámetros de color del músculo inicialmente a 0h post-mortem de las truchas en función de la época del año y del tipo de aturdimiento

En la figura 12 se presentan los resultados de los parámetros de color del músculo tomados a las 24 horas *post-mortem*. Observamos cómo mantiene el mismo patrón que se ha observado en el momento inicial.

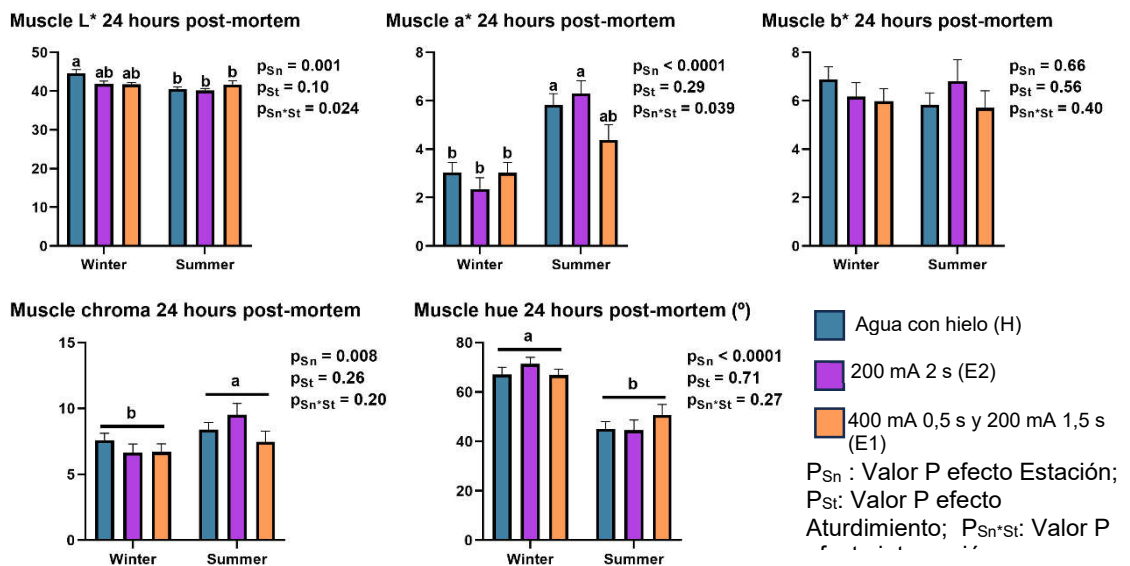


Figura 12.- Parámetros de color del músculo a las 24h *post-mortem* de las truchas en función de la época del año y del tipo de aturdimiento

En la Figura 13 se presentan los valores de pH muscular inicial 0 horas y final 24 horas *post-mortem*. Se puede observar un efecto de la época del año en el pH inicial siendo más elevado



en los peces sacrificados en invierno que los sacrificados en verano y que el sistema de aturdimiento por electronarcosis produjo un mayor pH inicial. A las 24 horas *post-mortem* que observamos sobre el pH por la época de año donde en verano tiene un pH más elevado los peces sacrificados en verano que los sacrificados en invierno, sin haber efecto del tipo de aturdimiento.

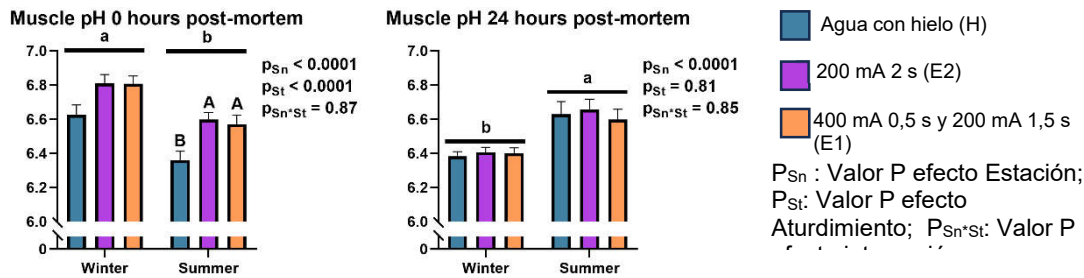


Figura 13.- pH muscular inicial 0 horas y final 24 horas *post-mortem* de las truchas en función de la época del año y del tipo de aturdimiento

La Figura 14 presentan los resultados del establecimiento y posible resolución de *rigor mortis* en las truchas. Se observa una interacción significativa en los peces donde los peces sometidos a aturdimiento de agua con hielo en verano mostraron el establecimiento del *rigor mortis* más temprano, mientras que los de invierno mostraron un establecimiento más tardío. A las 24 horas *post-mortem* se observa un efecto del tipo de aturdimiento donde las truchas sometidas a un aturdimiento tipo E1 (400 mS 0,5 s y 200 mA 1,5 s) tuvieron un menor ángulo de *rigor mortis*.

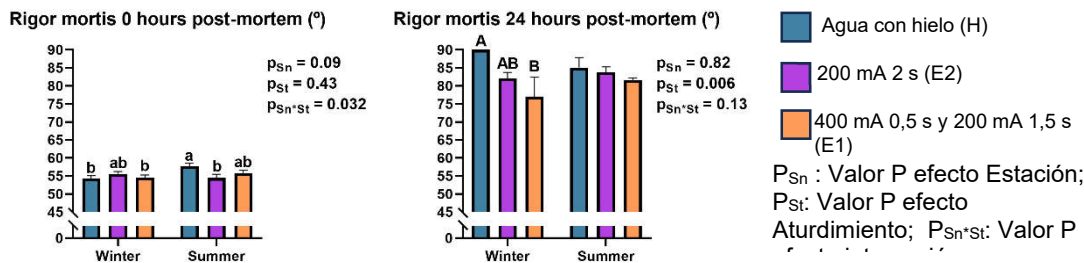


Figura 14.- Ángulo de rigor mortis inicial 0 horas y final 24 horas *post-mortem* de las truchas en función de la época del año y del tipo de aturdimiento

Actividad 4.1 Comunicación

Incluir, para cada una de las actividades en desarrollo o finalizadas, la siguiente información:

El grupo de la Universidad Complutense de Madrid ha presentado una comunicación al XVIII Congreso Nacional de Acuicultura que se celebrará del 21 al 24 de noviembre en el Palacio de Congresos de la ciudad de Cádiz. Titulado: Ayuno pre-sacrificio y su efecto en la respuesta al estrés y la calidad de la carne de truchas arcoíris.

El grupo ULPGC ha presentado una comunicación al XVIII Congreso Nacional de Acuicultura que se celebrará del 21 al 24 de noviembre en el Palacio de Congresos de



la ciudad de Cádiz. Título: MEJORA DEL PROCESO DE SACRIFICIO DE LOS PECES DE CULTIVO: INDICADORES DE BIENESTAR Y CALIDAD DEL PRODUCTO (WELLSTUN)

El IRTA juntamente con el IMEDEA presentó dos ponencias orales del proyecto en la conferencia de la European Aquaculture Society el día 20 de Septiembre de 2023:

Ana Roque, Esther Hoyo Alvarez Maria J Cabrera Alvarez, Edgar Bertomeu y Pablo Arechavala-Lopez 2023 The effects sacrifice and crowding on the heart activity of commercial seabass (*Dicentrarchus labrax*). EAS conference Vienna Austria 18 a 21 de Septiembre de 2023

Esther Hoyo Alvarez Maria J Cabrera Alvarez Edgar Bertomeu Pablo Arechavala-Lopez y Ana Roque 2023 Consciousness indicators and cardiac responses of european seabass to different slaughtering processes. EAS conference Vienna Austria 18 a 21 de Septiembre de 2023

Incidencias

Actividad 5.1 Coordinación, reuniones de proyectos e informes

Se llevaron a cabo reuniones periódicas del proyecto a las cuales asistió cuando necesario también la institución subcontratada.

Actividad 5.2 Organización de la reunión inicial de lanzamiento (Kick-off), de las reuniones periódicas y de la reunión final

El kick off meeting tuvo lugar el día 31 de diciembre de 2021 via zoom.

Actividad 5.3 Seguimiento de los protocolos de ética en experimentación con animales vivos.

EL IRTA cuenta con los protocolos de experimentación animal aprobados por la autoridad competente.

La UCM cuenta con los protocolos de experimentación animal aprobados por la autoridad competente del lugar donde se iban a realizar las pruebas con animales.

Los procedimientos llevados a cabo en esta tarea han sido positivamente informados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (OEBA-ULPGC-35/2020) y autorizados por la Dirección General de Ganadería de la Consejería de agricultura, Ganadería y Pesca del Gobierno de Canarias.



4.3. Adecuación al cronograma de trabajo

Indicar el cumplimiento de los plazos previstos para la ejecución de las actividades. En caso de que no se hayan cumplido los plazos previstos para alguna actividad, indicar las causas.

En relación con al cronograma de trabajo en el grupo de la Universidad Complutense se ha modificado el orden de las pruebas. Se iba a comenzar con la prueba de invierno en el año 2022, como consecuencia de los problemas de gestión económica del proyecto la pruebas de invierno previstas para el comienzo del año 2022 se han pospuesto para comienzos del año 2023, lo que se han desarrollado son las pruebas de verano de 2022, realizando la Tarea 1.3, Determinación de la respuesta de estrés y calidad de la carne de truchas arcoíris sometidas a dos tipos de agrupamiento para el despesque, reducción del volumen de agua o reducción de espacio en el estanque de engorde y dos duraciones de hacinamiento en verano, y la Tarea 1.4, Determinación de la respuesta de estrés y calidad de la carne de truchas arcoíris sometidas a tres tiempos de ayuno pre-sacrificio (24 horas, 5 días o 10 días) en verano.

Las tareas 1.3 y 1.4 de temperatura del agua baja de invierno, se realizaron en diciembre-enero de 2023 donde se llevó a cabo también la Tarea 3.4 : Determinación de la respuesta de estrés y calidad de la carne de truchas arcoíris sometidas a dos tipos de aturdimiento, eléctrico o hielo en invierno, de esa forma se completarán las tareas 1.3 y 1.4. A partir de esta información se a procedido a realizar pruebas en piscifactorías de trucha arcoíris, para validar y verificar los resultados a nivel de explotaciones acuícolas y comprobar que los resultados obtenidos son aplicables a nivel de explotación y permite una mejora del bienestar de las truchas.

El orden verano-invierno de las tareas 1.1 y 1.2 también fue invertida debido a que el proyecto fue aprobado unos meses mas tarde de lo previsto.

4.4. Seguimiento de indicadores de ejecución y evaluación del proyecto

Incluir la valoración, a ser posible cuantificada, de los indicadores contemplados en la memoria científico-técnica.

WP	Indicador de ejecución	Indicador de evaluación
1	1.1. Informe de recepción de los peces y acondicionamiento de instalaciones para las pruebas 1.2. Informe de resultados de los análisis de parámetros de respuesta de estrés y calidad de la carne del pescado	Informe de resultados de los experimentos



	1.3. Informe de resultados de análisis de expresión génica de funciones básicas de respuesta de estrés y de metabolismo energético.	
2	2.1 Listado de los indicadores a validar 2.2 Registros de EEG	Lista de los indicadores validados
3	3.1 Informe de recepción de los peces y acondicionamiento de instalaciones el desarrollo de las pruebas de aturdimiento 3.2. Informe de resultados de los análisis de parámetros de respuesta de estrés y calidad de la carne del pescado 3.3. Informe de resultados de análisis de expresión génica de funciones básicas de respuesta de estrés y de metabolismo energético.	Informe de los resultados de la prueba de aturdimiento.
4		Noticias en mis peces, video corto inscripción al CNA con una presentación de sobre el proyecto Video (paquete de trabajo 2), ç Curso (jornada formativa online) Inscripción a una conferencia internacional de la especialidad con dos presentaciones sobre el proyecto



5		<p>Organización de fechas finales de cada experimento y desplazamientos para ejecución de experimentos y toma de muestras</p> <p>Actas de cada reunión</p> <p>Aceptación de los protocolos experimentales en cada C.A.</p>
---	--	--

4.5. Transferencia de resultados al sector

Indicar las actuaciones dirigidas a la validación y transferencia de resultados a las empresas, incluyendo:

Se llevaron a cabo tres acciones de transferencia al sector:

- 1) Jornada online sobre sacrificio de peces con una inscripción de 39 asistentes

El programa incluyó presentaciones sobre: Bienestar de peces y puntos críticos en el cultivo de lubina y trucha; Presacrificio, aturdimiento y sacrificio de peces; Indicadores de (in)consciencia y confirmación de la muerte; Resultados del proyecto Lubina; Resultados del proyecto Trucha y una mesa redonda.

- 2) Se hizo un video técnico enseñando como observar los indicadores de pérdida de consciencia. Este video estará disponible al canal you-tube del IRTA.

- 3) Transferencia directa a la empresa participantes:

Se han comparado los efectos del aturdimiento mediante shock térmico frente al aturdimiento eléctrico, en ambos casos completándose el proceso con el sacrificio en agua-hielo (1:1, v/v). Las lubinas, con un peso medio de 3,128 kg, fueron aturridas con un prototipo suministrado por la empresa Fish Management Systems.

4.6. Actuaciones de difusión y publicidad de las ayudas

Incluir relación de las actividades de difusión y publicidad (adjuntar información sobre estas actividades o enlaces a páginas web)

<https://www.irta.cat/es/projecte/wellstun-mejora-del-proceso-de-sacrificio-de-los-peces-de-cultivo-indicadores-de-bienestar-y-calidad-del-producto-wellstun/>



http://www.ipacuicultura.com/noticias/en_portada/80560/el_proyecto_wellstun_estudiara_las_practicas_de_sacrificio_en_peces_de_cria_para_mejorarlas_y_asegurar_la_calidad_del_producto_final.html?hash=7ac25eac448b58beeb2f4c9cf4a8d1ca8f0bacde

https://imedea.uib-csic.es/communication_details.php?id=1927&tp=n#.Yxck_3ZByUk

https://twitter.com/hashtag/WELLSTUN?src=hashtag_click

<https://www.ucm.es/otri/plan-nacional-de-acuicultura-y-sector-pesquero-y-acuicultura>

<https://www.mispecies.com/noticias/El-mejor-bienestar-de-los-peces-durante-el-sacrificio-marca-la-calidad-de-su-carne/#.YxclqnZByUk>

<https://www.ucm.es/otri/plan-nacional-de-acuicultura-y-sector-pesquero-y-acuicultura>

<https://transferencia.irta.cat/activitats/jornada-wellstun-sacrifici-de-llobarro-i-truita/#section-352-158>

VIDEO 1

VIDEO 2

4.7. Valoración del coordinador sobre la ejecución del proyecto

Incluir valoración general sobre el desarrollo del proyecto, consecución de objetivos, etc. Recomendaciones y sugerencias.

El proyecto se está desarrollando de acuerdo a lo previsto, sin embargo, la dinamica de trabajo del grupo ha tenido dificultades en el desarrollo debidas a la convocatoria. La convocatoria contempla una cantidad muy pequeña de dinero para viages por partner y por año, pero espera una colaboración a nivel nacional entre 4 a 5 socios y presentaciones y transferencias al sector. Es evidente que la cantidad de dinero asignada a esta partida no es suficiente. Esto obliga a demás que se hagan experimentos repetidos en dos centros porque un socio no cuenta con el dinero para ir a otro centro muestrear y le es mas facil repetir el experimento y tomar su parte de muestras. Creemos que la partida de viages deberia de ser intercambiable con otros conceptos que no sean costos de personal y equipos.

4.8. Conclusiones

Principales conclusiones de las actividades desarrolladas.

En relación a los experimentos realizados con lubina en los diferentes institutos y en la misma empresa participante en el proyecto se puede llegar a las siguientes conclusiones

- 1) El método de sacrificio en hielo sin aturdimiento previo es el menos recomendable de todos los métodos testados. Esta conclusión está apoyada en que en todos casos, las señales indicadoras de perdida de consciencia o de muerte llevaron mas tiempo en



apreciarse, como son pérdida de movimiento de las aletas, pérdida de ventilación, pérdida de señal cardíaca entre otros. A demás el análisis de expresión génica lleva a la misma conclusión. El análisis de frescura también fue peor en peces sacrificados en hielo.

- 2) La frecuencia cardíaca puede ser usada como un proxy para estrés y también para evaluar la eficacia del método de sacrificio.
- 3) Un ayuno de 7 días no afectó la frecuencia cardíaca de la lobina, independientemente de la época del año en que se realizó el ayuno, sin embargo la frescura del pescado se vio alterada en ayunos mayores de 24 horas, debiéndose evitar periodos más largos.
- 4) En el invierno los peces ayunados tardaron mas de 4 horas en perder la señal cardíaca después de ser sacrificados, probablemente debido al bajo metabolismo
- 5) La técnica de ikejime es claramente el método más eficaz para el sacrificio humanitario de los peces, pero el menos operativo.
- 6) El voltaje de 40 V durante 15 s se consideró como el más adecuado para el aturdimiento de las lubinas en el rango de pesos con el que se trabajó. El aspecto externo de las lubinas no fue diferente entre los dos tipos de aturdimiento. Lo observado en el laboratorio en relación a bocas y opérculos abiertos, así como cierto grado de enrojecimiento en la cabeza, no se repitió en la prueba realizada en la granja. Tampoco se detectaron diferencias en los atributos que describen la frescura ni en la evolución del Rigor Mortis. Por último, tampoco se detectaron diferencias en las valoraciones de los atributos utilizados para el perfil sensoria de la lubina tal cual está establecido por el panel de evaluadores de la empresa Aquanaria.

De las Tareas 1.3. y 1.4. desarrolladas por la UCM podemos concluir que la respuesta de estrés en truchas arcoíris tiene una gran dependencia de la temperatura del agua en la que se encuentren. Las técnicas de manejo en truchas que se mantiene bajo condiciones ambientales dependientes del exterior habría que ajustarlas principalmente por la temperatura, aunque otras variables medioambientales habría que tenerlas en consideración. En relación a la técnica de agrupamiento en truchas arcoíris la reducción de volumen de agua produce una menor respuesta de estrés en los peces, aunque en invierno es donde encontramos un mayor efecto. En época estival, las truchas tienen menos reservas de glucógeno hepático y más muscular, por el cambio metabólico que puede producir la temperatura en las truchas.

En relación con el efecto del ayuno, temperaturas de ayuno inferior a 55 ° días sería el recomendado ya que produce una menor respuesta de estrés, aunque el nivel de cortisol es superior en verano que en invierno incluso en peces no sometidos ayuno. En relación a la calidad del producto, lo que más afecta no es el ayuno sino la temperatura en la que los animales son sometidos al ayuno.

De la tarea 3.4 desarrollada por la UCM podemos concluir que dentro de los sistemas de aturdimiento, la aplicación de hipotermia produce una pérdida de inconsciencia muy retardada y que depende de la temperatura de donde proceden los animales. En relación con la respuesta de estrés las truchas sometidas a hipotermia como método de aturdimiento muestran una gran respuesta de estrés sobre todo en época de invierno y sin embargo en verano el aturdimiento a 200 mA y en hielo mostró el mismo efecto.

En relación con la calidad de la carne la calidad se encuentra afectada por el sistema de aturdimiento aunque a las 24 horas tras el sacrificio no se encontro efecto del método de aturdimiento.

SECRETARIA GENERAL DE PESCA



DIRECCIÓN GENERAL DE ORDENACIÓN PESQUERA
Y ACUICULTURA
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE ACUICULTURA,
COMERCIALIZACIÓN PESQUERA Y ASUNTOS
ESTRUCTURALES

CORREO ELECTRÓNICO

comerpm@mapa.es