



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

EFFECTOS DE LA SUSTITUCIÓN TOTAL DE HARINA DE PESCADO CON
HARINA DE SOYA (*GLYCINE MAXIMA*) Y POLVO DE *SPIRULINA* EN
JUVENILES DE ESPECIES ACUÍCOLAS DE IMPORTANCIA COMERCIAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

PRESENTA:
BIÓL. GERARDO HERNANDEZ FLORES

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTORAL: DR. ARMANDO GARCÍA ORTEGA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO A.C.
UNIDAD MAZATLÁN
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

DRA. RUTH PEDROZA ISLAS
UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

DR. DOMENICO VOLTOLINA LOBINA
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MÉXICO, D. F. (ENERO) 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó con fondos del programa PAPIIT
(proyectos TB200112 y RR290112) de la Universidad
Nacional Autónoma de México.

Resumen

Se elaboraron 4 alimentos (40% proteína) sustituyendo la harina de pescado por mezcla harina de soya y polvo de *Spirulina* (3:1), se adicionó proteasa (Pr), fitasa (Fi) y levadura (Le) en combinaciones para lograr 4 tratamientos de la siguiente manera: D1 = Pr+Fi, D2 = Pr+Fi+Le, D3 = Fi+Le, D4 = Pr+Le. Como alimento control (Co) se utilizó un alimento comercial. Se alimentaron 15 crías de tilapia por tratamiento (0.47 ± 0.02 g) durante 60 días. Se evaluaron parámetros de crecimiento y excreción de nitrógeno (N) y fósforo (P) al medio. Posteriormente 65 crías de trucha (2.8 g) en una granja comercial durante un total de 170 días en dos etapas (día 1-75 =E1, días 75-170 =E2). En E1 se utilizaron D1, D3 y Co; en E2 se utilizaron D1 y Co. Se evaluaron parámetros de crecimiento, excreción de N y P, así como de respuesta inmune no específica. En el laboratorio se alimentaron crías de trucha (1.8 ± 2 g) durante 60 días con D1, D3 y Co para determinar (día 30) la excreción de P y adicionalmente (día 60) P y proteína en suero sanguíneo. En tilapia, no se observó una reducción en crecimiento con el uso de harinas vegetales, la digestibilidad aparente de la proteína fue elevada (< 85 %) y se redujo la excreción de P al medio. En trucha, el crecimiento no disminuyó en E1, sin embargo en E2 se redujo en comparación con Co. Las descargas de N fueron similares entre tratamientos pero se redujo la cantidad de P excretada en ambas etapas. Los parámetros de respuesta inmune no específica no se afectaron, con excepción de la actividad de lizoenzima en E1, que aumentó con alimentos a base de harina vegetal pero se le atribuye a un periodo de aclimatación a los componentes de la dieta pues en E2 se normalizó.

Indice

Contenido

Resumen	III
Indice	IV
Introducción.....	1
Antecedentes.....	8
Pregunta de investigación	12
Hipótesis.....	12
Objetivos.....	13
General.....	13
Particulares.....	13
Materiales y Métodos	14
Diseño Experimental.	14
Zona de trabajo con trucha “Amanalco de Becerra”	16
Formulación de las dietas.....	18
Pruebas de alimentación.....	20
Parámetros determinados en organismos.....	23
Coeficiente de Digestibilidad Aparente de la Proteína.	24
Consumo de oxígeno y excreción de fósforo y nitrógeno.....	25
Fósforo en heces	26
Extracción de lípidos en intestino, proteína en intestino y músculo:	26
Pruebas inmunológicas.	26
Suero sanguíneo.....	26
Actividad de la lisozima.....	27
Proteína en suero sanguíneo:	27
Fósforo en suero sanguíneo:.....	27
Actividad explosiva de los macrófagos	27
Proteína en moco:.....	28
Trucha Laboratorio.....	29
Análisis estadístico.	30
Resultados.....	31
Tilapia.	31
Trucha en granja Amanalco.....	39
Fósforo excretado por orina y branquias, proteína y fósforo en suero sanguíneo.	52
Discusión	55

Tilapia	55
Índice de digestibilidad aparente de la proteína	57
Oxígeno consumido.....	58
Nitrógeno excretado	58
P en agua y heces	60
Lípidos y proteína en los organismos.....	61
Trucha en granja Amanalco.....	63
Nitrógeno y Fósforo excretado	65
P en heces	66
Proteína en músculo	67
Lisoenzima.....	67
Proteína en suero sanguíneo	69
Fósforo en suero sanguíneo.....	70
Macrófagos.....	71
Mucosa	72
Trucha en Laboratorio.....	75
Conclusiones.....	78
Referencias Bibliográficas.....	80
Anexo 1.....	90
Anexo 2.....	91

Introducción

La acuicultura es el sector de producción de alimento que a nivel mundial presenta el mayor crecimiento anual con un promedio del 10% desde 1984 (FAO, 2012). Su tendencia en la figura 1 es de crecimiento relativamente estable en comparación con la pesca extractiva que se observa “estancada” como se observa. Se estima que para mantener el nivel actual de consumo *per capita*, la producción mundial por cultivo necesitará llegar a 80 millones de toneladas para el año 2050 (Subasinghe y Currie, 2005). Sirven como ejemplos de esta tendencia la tilapia (el segundo grupo más importante de peces cultivados a nivel mundial) y la trucha arcoíris, que han presentado un incremento en su producción desde 1999 y en México desde 2006 (Figura 2.1 y Figura 2.2 respectivamente).



Figura 1. Producción acuicultura y pesca de captura (FAO, 2012).

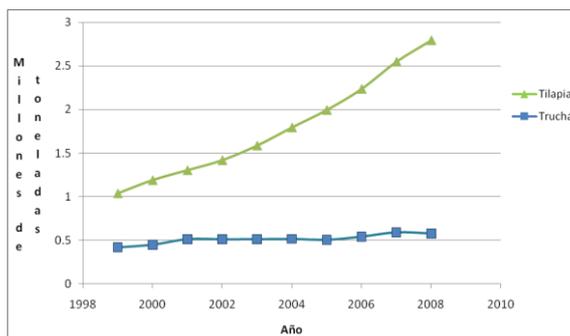


Figura 2.1 Producción mundial de tilapia y trucha arcoíris (FAO, 2012)

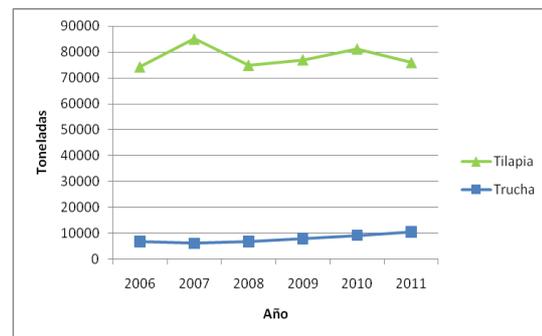


Figura 2.2 Producción en toneladas de tilapia y trucha arcoíris en México (CONAPESCA, 2011).

Como parte del crecimiento de la actividad, la demanda por alimentos para organismos acuáticos se ha incrementado. Por ejemplo se reporta que la industria de salmónidos es una de las más grandes que involucra acuicultura intensiva y que demanda un porcentaje significativo de las reservas globales de harina de pescado (Hart et al., 2010). Esto conlleva a problemas asociados a los alimentos utilizados para la engorda de los organismos debido a que la fuente de proteínas (harina de pescado) utilizada en las formulaciones es un ingrediente costoso y con alta demanda, además que el mal uso de los alimentos que la contienen puede llevar a problemas ambientales.

Los efectos de los desechos de acuicultura en el ambiente acuático son inmediatos y amplios (Cho y Bureau, 1997). Considerando que el alimento es la principal fuente de contaminación en acuicultura, el utilizar harina de pescado como principal ingrediente conlleva a un deterioro producido por la descarga y la descomposición de los nutrimentos sobre la calidad del agua. La harina de pescado contiene grandes cantidades de fósforo en forma de hidroxiapatita (figura 3) provenientes de huesos molidos (Richie y Brown, 1996; Coloso et al., 2003; Sarker et al., 2011) que al no ser asimilados por el organismo que los consume, son vertidos al medio y pueden llegar a desencadenar procesos de eutrofización (Lanari et al., 1998; Liebert y Portz, 2005). Se estima que aproximadamente sólo el 20% del fósforo de las dietas comerciales es asimilado por la trucha y el restante 80% se descarga al medio acuático (Cheng et al., 2004). Este elemento es importante en los organismos pues es un componente de los ácidos nucleicos, del tejido óseo, de las membranas celulares, hormonas y escamas y está directamente relacionado con las reacciones celulares productoras de energía (Skonberg et al., 1997; Lellis et al., 2004); sin embargo, en peces la asimilación de fósforo disuelto en el medio acuático es insignificante, por lo que se requiere de fuentes alimenticias para satisfacer las necesidades de este elemento (Cao et al., 2007). Cabe mencionar la deficiencia de este elemento en peces puede producir crecimiento pobre, mineralización deficiente y un decremento en la resistencia a patógenos (McDaniel et al., 2005). Se estima que en la dieta los niveles óptimos de fósforo para trucha arcoíris son de 4 – 6 g / kg (Riche, y Brown, 1996) y se reporta que los alimentos comerciales actualmente

contienen de 10 a 14.3 g / kg (Satoh et al., 2003; Sarker et al., 2011) por lo que los alimentos comerciales exceden los requerimientos para trucha.

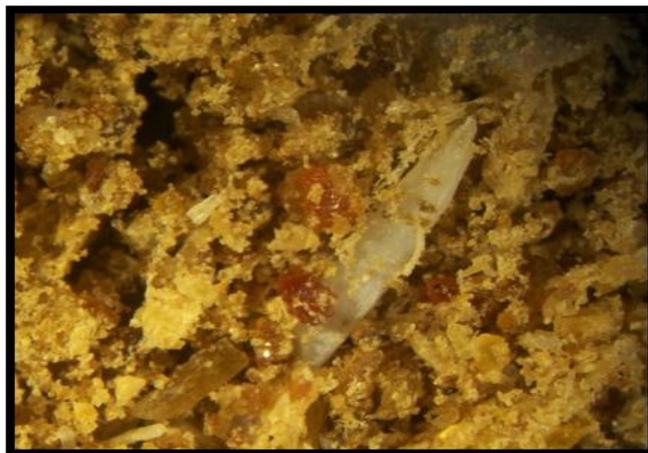


Figura 3. Escamas y restos de huesos presentes en harina de pescado vistas en un microscopio.

Por este motivo los alimentos para trucha son responsables de aportar grandes cantidades de fósforo al medio ya que la parte de los alimentos que no es digerida es excretada en forma sólida como heces y en forma soluble en desechos de metabolismo (amonio, urea, fosfato) (Cho y Bureau, 1997). En particular los peces descargan en: forma sólida (heces en trucha de 3 a 5 g / día/ 200 g de peso corporal) y disuelta (orina en trucha aproximadamente 0.334 mL / h /100 g de peso corporal) (Guillaume et al., 2004; Dalsgaard et al., 2009). El fósforo promueve el crecimiento de algas y afecta la calidad del agua, estimulando procesos de eutroficación (Riche y Brown, 1996; Skonberg et al., 1997; Satoh et al., 2003) pues es considerado uno de los nutrientes limitantes para este proceso en cuerpos de agua dulce (Sarker et al., 2011). Debido a la eutroficación se pueden llegar a presentar floraciones de microalgas que causan un deterioro en la calidad del agua y muertes de organismos (Wang y Wang, 2009).

Adicionalmente, existen problemas con respecto a su disponibilidad de la harina de pescado debido a que es el principal ingrediente en los alimentos de acuicultura por su aporte de proteínas altamente digeribles y bien balanceadas

(Ostaszewska et al., 2005; Biswas et al., 2007). La obtención de la materia prima para la harina de pescado implica la extracción de peces, que como recurso fluctúa, mientras que la demanda por los alimentos de acuicultura continua incrementándose (Tacon y Metian, 2008; Hernández et al., 2012).

El incremento en los costos de los alimentos en producción intensiva de organismos acuáticos, la cantidad de descargas producidas por la actividad y el deterioro del medio ambiente son razones importantes para considerar como una prioridad la búsqueda de fuentes de proteína que puedan sustituir total o parcialmente a la harina de pescado (Oliva-Teles y Gonçalves 2001; Kaushik et al., 2004). Actualmente, las opciones más viables son las proteínas de origen vegetal (Davies et al., 1990; Richter et al., 2003; Liebert y Portz, 2007; Uyan et al., 2006; Santigosa et al., 2008).

Para poder evaluar una nueva fuente de proteína es necesario abarcar ciertos criterios que permitan concluir que su uso es viable. Como primer paso es necesario determinar la cantidad, la calidad y disponibilidad de los nutrimentos que lo componen, (Köprücü y Özdemir, 2005). En este sentido, las harinas vegetales presentan dos problemas: un perfil de aminoácidos con ciertas deficiencias y la presencia de antinutrientes.

Un antinutriente es una sustancia, que por sí sola o a través de elevados niveles de sus productos metabólicos en sistemas vivos, interfieren con la utilización del alimento por el organismo (Liebert y Portz, 2005). Se dividen principalmente en: 1) factores que afectan la utilización y la digestión de las proteínas (inhibidores de proteasa, taninos y lectinas) y 2) factores que afectan la utilización mineral (fitatos, oxalatos, glucosinolatos, antivitaminas, saponinas, fitoestrógenos, entre otros) (Rumsey et al., 1994; Kaushik et al., 1995; Francis et al., 2001; Denstadli et al., 2006; Yamamoto et al., 2010).

Entre los antinutrientes comúnmente presentes en harinas vegetales se encuentra el fitato (Z-hexafosfatos de mio-inositol). Este puede quelar iones divalentes y trivalentes como Ca, Mg, Zn, Cu y Fe haciéndolos indisponibles. También se ha comprobado que los fitatos pueden formar complejos proteína-fitato que reducen la disponibilidad de las proteínas. Se estima que en promedio la harina

de soya contiene 10-15 g / Kg de fitato (Francis et al., 2001). Las lectinas o fitohemaglutininas que se encuentran en semillas de leguminosas son capaces de acoplarse a los carbohidratos formando complejos glico-conjugados presentes en las membranas que son responsables de la ruptura del metabolismo en el intestino delgado y de daños morfológicos en las vellosidades (Hart et al., 2010). Los taninos son complejos secundarios de variadas estructuras químicas que se dividen en hidrolizables y condensados, son responsables de interferir con procesos digestivos ya sea por unirse con enzimas o por unirse a componentes de la dieta como proteínas o minerales. Las saponinas incrementan la permeabilidad de las células de mucosa en el intestino delgado e inhiben el transporte activo de nutrientes, aunque las saponinas difieren en efectividad (Francis et al., 2001).

Entre los ingredientes de origen vegetal, la harina de soya es una de las más prometedoras por su contenido de proteína (35-50%), su precio accesible y la estabilidad de su producción, por lo cual es en la actualidad utilizada en piensos para peces omnívoros de agua dulce, en los cuales sustituye hasta el 50% de la harina de pescado (Denstadli et al., 2006; Azaza et al., 2009).

Una posible fuente adicional de proteína vegetal son las microalgas. Se trata de organismos fotosintéticos microscópicos que han sido considerados en la actualidad para ser utilizados en acuicultura gracias a su composición proximal y a que pueden ser cultivados en espacios pequeños. *Spirulina* sp es una de las microalgas más comunes en cuerpos de agua alcalina tropicales. Su tasa de crecimiento bajo condiciones de cultivo es mayor que para cualquier cultivo de plantas terrestres y es cercana a la de microorganismos como las levaduras y bacterias. Su corto ciclo de vida le permite en un tiempo corto duplicar su cantidad de biomasa (Olvera-Novoa et al., 1998). Actualmente se utiliza en mezcla con otras fuentes de proteína o como suplemento para alimentos (Santigosa et al., 2008, Hernández-Flores et al., 2012). El polvo de *Spirulina* puede contribuir al crecimiento de los organismos porque contiene un alto porcentaje de proteína, que alcanza aproximadamente el 66.6 % (Olvera-Novoa et al., 1998; Hernandez-Flores et al, 2012), vitaminas E, B12 y biotina

así como una importante cantidad de ácidos grasos especialmente n-3 y n-6. También posee pigmentos como clorofila, ficobiliproteínas, es una fuente de tiamina, niacina, piridoxina y cianocobalamina con altos niveles de calcio, pantotenato, ácido fólico, inositol, B-caroteno y tocoferol (Olvera-Novoa et al., 1998).

Por sí solos, la harina de soya y el polvo de *Spirulina* presentan deficiencias en ciertos aminoácidos, por lo que resultan insuficientes para satisfacer los requerimientos nutricionales de algunas especies de peces, pero si son mezclados pueden completar el perfil de aminoácidos esenciales, por lo cual representan una alternativa como sustituto de la harina de pescado en alimentos y para mejorar la asimilación de los nutrientes en los alimentos y contrarrestar el efecto de antinutrientes, se utilizan suplementos como proteasa, fitasa y levadura.

Las proteasas están representadas por una enzima gástrica, la pepsina, y cuatro enzimas pancreáticas: tripsina, quimiotripsina, colagenasa y elastasa. Son complementarias en su modo de acción, de modo que cada una es activa sobre enlaces peptídicos bien definidos y diferentes. Según la secuencia de los aminoácidos en las cadenas peptídicas, la hidrólisis concluirá con aminoácidos libres o con residuos peptídicos de diferentes tamaños que serán hidrolizados, a veces, de manera incompleta, por peptidasas (Guillaume et al., 2004).

La fitasa aumenta la disponibilidad del elemento al igual que su asimilación, por lo que se logra una reducción en la emisión de fósforo al medio junto con un incremento en el crecimiento de los organismos (Lanari et al., 1998; Cao et al., 2007).

Los probióticos se definen como preparaciones de células microbianas o componentes microbianos de células que tienen un efecto benéfico en la salud y bienestar del hospedero (Panigrahi et al., 2005). Las levaduras han sido poco estudiadas en acuicultura, pero se supone que poseen propiedades inmunoestimulantes debido a sus complejos componentes de carbohidratos y

contenido de ácidos nucleicos, además de favorecer la absorción de nutrientes (Oliva-Teles y Gonçalves 2001; Lara-Flores et al., 2003; Abdel-Tawwab et al., 2008). Poseen la ventaja de ser las únicas fuentes de proteína unicelulares presentes en cantidades considerables en el mercado. Constituyen una buena fuente de proteínas y son ricas en vitamina E y en las del grupo B (Guillaume et al., 2004).

Cuando se pretende alimentar a organismos con materias alternativas se debe balancear correctamente los nutrientes en el alimento para obtener un crecimiento adecuado: esto implica verificar que las proteínas sean digeridas y que los lípidos y carbohidratos sean utilizados para energía (Cho y Bureau, 1997). Durante los años se ha reforzado el concepto que las deficiencias o excesos nutricionales pueden dañar los complicados y delicados mecanismos de operación en el mantenimiento del bienestar de un organismo (Kiron et al., 1995). La posibilidad de utilizar una nueva fuente de proteína dependerá de respuestas fisiológicas como el crecimiento, respuesta inmune y la descarga de nutrientes al medio (principalmente nitrógeno y fósforo) de los organismos que la consumen.

Antecedentes

En general las semillas de leguminosas (principalmente soya) se han utilizado como ingrediente en alimentos debido a su alto contenido de proteína (Olvera, et al., 1988). Existe una gran cantidad de trabajos referentes a sustituciones de harina de pescado por harina de soya (Refstie et al., 1997; Refstie et al., 2000; Drew et al., 2005; Ostaszewska et al., 2005) y, aunque en menor cantidad, por polvo de *Spirulina* (El-Sayed et al., 1994; Mustafa et al., 1994; Olvera-Novoa et al., 1998).

Una gran parte de los autores que trabajaron con soya como sustituto coinciden en que el sustituir la harina de pescado con elevados porcentajes de harinas vegetales genera problemas de crecimiento en los organismos que los consumen. Rumsey et al. (1994) y Biswas et al. (2007) concluyeron que para evitar crecimiento deficiente es necesario utilizar hasta un 40 % de harina de soya como sustituto en tilapia. Por otro lado Heikkinen et al. (2006) reportan un incremento en la tasa de conversión del alimento en trucha arcoíris por la inclusión no mayor a 45 % de harina de soya en alimentos. Aunque también es posible sustituciones elevadas como en los trabajos de Tacon et al. (1983) y Smith et al. (1988) quienes reportaron que se puede sustituir aproximadamente 75 % de proteína de harina de pescado por harina de soya sin efectos adversos en el crecimiento o la utilización del alimento cuando se alimenta a truchas arcoíris de un peso mayor a 30 g. En 2008 Yue y Zhou reportaron que es posible sustituir el 60 % de harina de pescado por harina de soya suplementada con aminoácidos en crías de tilapia, pues en porcentajes más elevados el crecimiento se ve afectado.

Por otra parte la adición de altos porcentajes de productos vegetales causa una reducción en la palatabilidad y aceptabilidad del alimento lo que ha sido evidenciado en salmónidos (Satoh et al., 2003). Es bien conocido que la palatabilidad en un alimento puede afectar la tasa de ingestión, Refstie et al. (1997) demostraron que en trucha arcoíris puede presentar una adaptación cualitativa de sustituciones de hasta 40% en dietas en un periodo de 7 días, mientras que los resultados en experimentos de crecimiento demuestran que una adaptación a sustituciones de 60% ocurre hasta el segundo mes de alimentación. Sarker et al. (2011) reportan que una completa sustitución o una

reducción en la cantidad de harina de pescado, combinada con el uso de fuentes alternas de proteína han sido evaluadas con éxito en juveniles de salmónidos.

En el caso de la microalga *Spirulina* la cantidad de trabajos es menor que con harina de soya; sin embargo destacan las investigaciones de Mustafa et al. (1994) quienes observaron un incremento en la biomasa al suplementar el alimento con un 2 % de polvo de *Spirulina* en pargo rojo y Nandeesha et al. (1998) quienes reportaron que es posible una sustitución de 100% sin afectar crecimiento en carpa. Olvera-Novoa et al. (1998) reportaron resultados positivos en crecimiento de crías de tilapia con 40 % de polvo de *Spirulina* como sustituto de la harina de pescado.

Son pocos los trabajos en los cuales se han utilizado estos dos ingredientes mezclados como sustitutos. Entre ellos destaca Hernandez-Flores et al (2012) quienes reportaron que mezclas de harina de soya y polvo de *Spirulina* generan crecimientos en trucha arcoíris similares a los generados al utilizar alimentos comerciales. Esto coincide con lo reportado por Gomes et al (1995) quienes no encontraron diferencias en la tasa de crecimiento específico de los organismos al combinar fuentes de proteína vegetal, por lo que la utilización de mezclas de fuentes vegetales para sustituir harina de pescado es una opción viable.

Como se ha mencionado, la problemática asociada a las harinas vegetales radica en la dificultad de utilizar altos porcentajes de sustitución debido a la presencia de antinutrientes, que producen alteraciones fisiológicas (Refstie et al., 2000; Heikkinen et al., 2006; Sealey et al., 2009). Moyano et al. (1999) demostraron la sensibilidad de la tilapia a inhibidores de proteasa presentes en alimentos vegetales, a pesar de sus hábitos herbívoros. Richter et al. (2003) reportaron una disminución en el crecimiento de tilapia alimentada con inclusiones mayores a 10 % de hojas de moringa principalmente por la presencia de antinutrientes. En el caso de sustituciones con harina de soya, se ha observado actividad inmunológica en forma de antígenos y alérgenos pues se produce una hipersensibilidad que se manifiesta en reacciones gastrointestinales creando problemas en el proceso digestivo. Estos

desórdenes son provocados principalmente por proteínas globulares: glicina fl-conglicinina (Rumsey et al., 1994).

En salmónidos, se ha comprobado que la digestibilidad de proteína cruda de fuentes vegetales es generalmente menor que la de harina de pescado (Drew et al., 2005). Por ello es necesario incrementar la disponibilidad de nutrimentos provenientes de estas fuentes por lo que se ha adicionado al alimento proteasa que actúan sobre las proteínas. De acuerdo a Drew et al. (2005) son pocos los trabajos en los cuales se evalúa el efecto de proteasas en especies como los salmónidos, sin embargo mencionan que este efecto se ha estudiado ampliamente en cerdos y pollos donde se ha observado una mejora en la digestibilidad y eficiencia del alimento.

Uno de los suplementos cuyo efecto se encuentra documentado es la fitasa microbiana en alimento para peces, pues se ha demostrado que incrementa significativamente la biodisponibilidad de fósforo (Cheng y Hardy, 2003; Liebert y Portz, 2005) así como la del nitrógeno unido a un fitato; de esta manera se reducen las descargas de fósforo al medio acuático (Forster et al., 1999; Cao et al., 2007; Sarker et al., 2011). Cho & Bureau (1997) sugieren que se adicione fitasa en las dietas que contienen niveles muy bajos de harina de pescado o productos animales.

Se han utilizado diversos agentes químicos, polisacáridos, extractos de plantas y nutrientes en alimentos de peces para que actúen a manera de inmunoestimulantes. Actualmente se trabaja en la suplementación de alimento para promover la salud en los peces y se enfoca principalmente en los β -glucanos (Welker et al., 2007). Se ha comprobado que la levadura en alimentos para alevines de tilapia genera efectos positivos en crecimiento debido a la presencia de ciertos nutrientes como β -glucanos (Lara-Flores et al., 2003); también se ha observado una relación directa entre el crecimiento de los organismos y la concentración de levadura presente en el alimento (Abdel-Tawwab et al., 2008). Oliva-Teles y Gonçalves (2001) sustituyeron durante 12 semanas parte de la harina de pescado por levadura de cerveza en dieta para juveniles de *Dicentrarchus labrax* concluyendo que es posible sustituir hasta un 50% de la harina de pescado sin generar efectos negativos en el crecimiento y que la sustitución con un 30% de levadura mejora la eficiencia del alimento así

como la utilización de la proteína. Oliva Teles et al. (2006) obtuvieron buen crecimiento con el 23% de sustitución con levadura y Fournier et al. (2006) incorporaron 17.4 % de levadura sin afectar significativamente la tasa de crecimiento de la trucha arcoíris y la eficiencia de la dieta, aunque en otros estudios sobre el efecto de la sustitución de harina de pescado por levadura se ha demostrado que se puede afectar el crecimiento (Rumsey et al. 1991), posiblemente por la escasa palatabilidad del alimento a causa de la inclusión de la levadura.

Pregunta de investigación

¿La utilización de una mezcla de polvo de *Spirulina* y harina de soya como sustituto de harina de pescado suplementada con proteasa, fitasa y levadura es suficiente para tener un alimento que genere un crecimiento de tilapia y trucha arcoíris similar al alimento comercial y que reduzca significativamente las emisiones de nutrimentos al medio?

Hipótesis

Se ha observado que una sola fuente de proteína vegetal en los alimentos puede provocar problemas en el organismo debido a la disminución en la cantidad y calidad de los aminoácidos que contiene y la presencia de antinutrientes, por lo que una mezcla de varias fuentes de proteína vegetal generarán un mejor aprovechamiento y digestibilidad de los nutrimentos.

Objetivos

General

Evaluar el efecto de dietas elaboradas con mezclas de polvo de *Spirulina* sp. y harina de soya (*Glycine maxima*) suplementadas con fitasa, proteasa y/o levadura en juveniles de tilapia (*Oreochromis* sp.) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Particulares

- Determinar el crecimiento en juveniles de tilapia y de trucha arcoíris con dietas con sustituciones totales de harina de pescado por mezclas de polvo de *Spirulina* y harina de soya adicionadas con proteasa, fitasa y levadura.
- Determinar el consumo de oxígeno de juveniles de tilapia.
- Determinar la excreción de fósforo a través de excretas y orina de juveniles de tilapia y trucha arcoíris.
- Determinar la cantidad de compuestos nitrogenados excretados por juveniles de tilapia y trucha arcoíris.
- Determinar la respuesta inmune no específica en juveniles de trucha arcoíris.

Materiales y Métodos

Diseño Experimental.

Se realizaron 3 pruebas de alimentación con las diferentes especies utilizando dietas experimentales sustituyendo el total de harina de pescado por harina de soya y polvo de *Spirulina*. Las pruebas con tilapia se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Producción Acuícola de la FES-Iztacala (UNAM). Las pruebas con trucha arcoíris se llevaron a cabo en la Granja “Los Alevines” en el municipio de Amanalco, Estado de México. De igual manera las pruebas para determinar P excretado por trucha se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Producción Acuícola de la FES-Iztacala.

Obtención de los organismos.

Tilapia

Los alevines de tilapia se obtuvieron del centro acuícola “Zacatepec” en el municipio de Zacatepec, Morelos. Los organismos se transportaron en bolsas de plástico con oxígeno hasta las instalaciones del laboratorio de producción acuícola de la FES Iztacala. Dentro de las instalaciones se colocaron en peceras de 200 L durante 30 días para evaluar su estado de salud y durante este tiempo se alimentaron con alimento comercial (Nutripec-Purina, alimento con 42% de proteína y 10% de grasa).

Trucha

Los alevines de trucha arcoíris se obtuvieron del centro acuícola “El Zarco” en Ocoyoacac, Estado de México. Los organismos fueron transportados en bolsas de plástico con oxígeno sobre una cama de hielo para mantener una temperatura aproximada de 5 °C hasta llegar a las instalaciones de la granja trutícola “Los Alevines”. Una vez ahí, se colocaron en tinas de 1000 L en una zona destinada a cuarentena durante 40 días. Durante este tiempo se les alimentó con alimento comercial y se observaron a los organismos en busca de signos de enfermedad.

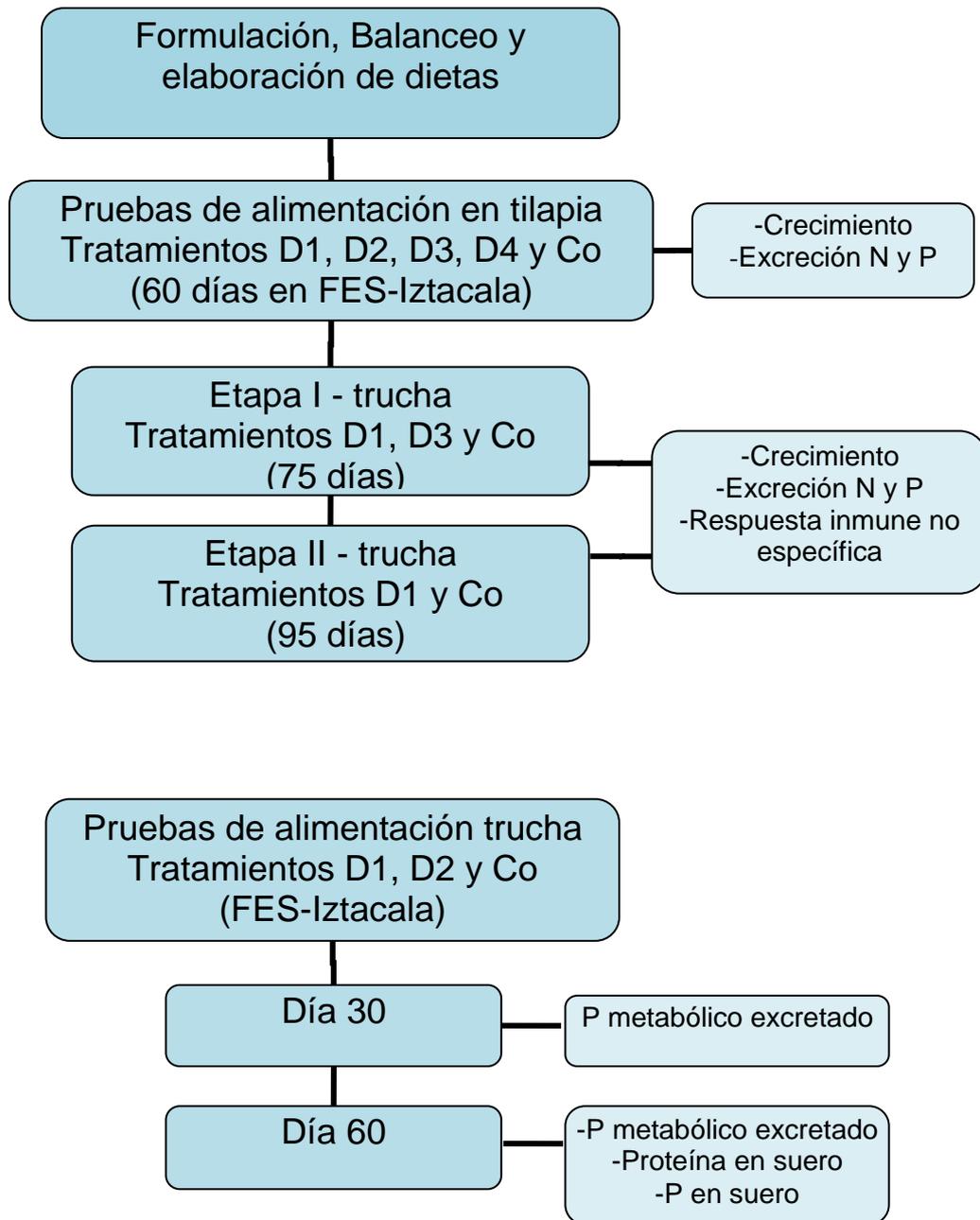


Figura 4A. Diagrama de flujo en orden cronológico de pruebas realizadas en organismos.

Zona de trabajo con trucha “Amanalco de Becerra”



Figura 4b. Municipios que colindan con Amanalco de Becerra.

El Municipio de Amanalco, está registrado como delegación número 007 del Estado de México y pertenece a la Región XV Valle de Bravo, situándose su Cabecera Municipal en las coordenadas 19° 15' de latitud norte y 100° 01' de longitud oeste, a una altitud de 2,320 m.s.n.m. Limita con los municipios (figura 4b) de Villa Victoria y Villa de Allende al norte, con Valle de Bravo y Temascaltepec al sur, con Almoloya de Juárez y Zinacantepec al este, y con Donato Guerra y Valle de Bravo al oeste.

Predomina el clima templado subhúmedo, la temperatura media anual es de 13.4 °C, con una máxima de 29.7 °C y una mínima de 0.5 °C. Según la Estación Amanalco la temperatura mínima media mensual es de 3.1 °C y se da durante el invierno debido a las heladas y algunas nevadas; mientras que la temperatura máxima media mensual es de 25.5 °C y se da durante la primavera.

La precipitación promedio total anual es de 1,214.4 mm, y alrededor del 76% de la lluvia total del año y la temporada de vientos fríos provenientes del norte y del Pacífico se presentan en el otoño.

Hidrológicamente el territorio de Amanalco se ubica dentro de la parte alta y media de la cuenca Valle de Bravo-Amanalco, y se considera como zona de

recarga hídrica ya que en el Municipio existen 445 manantiales, con un gasto total de 2,096.05 L.P.S., y que generan anualmente un volumen de 66´101,032.8 litros de agua según la Secretaria del Medio Ambiente.

La hidrografía del Municipio se complementa con la presa Corral de Piedra, la laguna Capilla Vieja, y 13 arroyos que conforman los dos principales ríos: el río Amanalco y el río Molino – Los Hoyos.

Formulación de las dietas.

Tilapia

El alimento para tilapia se elaboró de acuerdo con los resultados de trabajos previos en los cuales se utilizó una sustitución de harina de pescado por una mezcla de 75 % de harina de soya y 25 % polvo de *Spirulina* (Hernández-Flores et al., 2012), y se evaluaron estos alimentos sin los suplementos. El alimento se balanceó para obtener un 40 % de proteína mediante el cuadro de Pearson. Se utilizó este porcentaje de acuerdo con Siddiqui et al. (1988) quienes determinaron que es el adecuado para crías de tilapia (*Oreochromis niloticus*) con un peso menor a 40 g. Los alimentos se suplementaron con proteasa (RONOZYME® ProAct, países bajos) (Pr), fitasa (RONOZYME® phytases, países bajos) (Fi) y levadura (Pronat ultra) (Le) en combinaciones para lograr 4 tratamientos de la siguiente manera: D1 = Pr+Fi, D2 = Pr+Fi+Le, D3 = Fi+Le, D4 = Pr+Le (Tabla 1). Un quinto tratamiento de alimento comercial se utilizó como control (Co). Para minimizar la oxidación de los lípidos durante el almacenamiento, las dietas se sellaron en bolsas plásticas y se almacenaron a -20 °C hasta su uso (Azaza et al., 2009).

Trucha

En trucha arcoíris, los tratamientos administrados se obtuvieron del trabajo previo de Hernández-Flores et al. (2012) así como de los resultados de este trabajo con tilapia. Se eligieron las dietas Pr + fit (D1) y Fit + Lev (D3), pues en tilapia generaron los mejores crecimientos en los organismos. Aunque no se trate de la misma especie ni los mismos hábitos alimenticios, se esperó que se presentara una respuesta fisiológica similar. Como alimento control se utilizó una marca comercial (Co) de alimento para trucha (Purina).

El porcentaje proximal se ajustó de acuerdo a los requerimientos de nutrimentos reportados por la NRC (1993).

Tabla 1. Formulación de los alimentos (g/Kg).

Ingredientes (g)	Tratamiento				
	D1	D2	D3	D4	Co
Harina de Pescado	0	0	0	0	
Harina de Soya	450	450	450	450	
Polvo de <i>Spirulina</i>	150	150	150	150	
Aceite de Hígado de Bacalao	50	50	50	50	
Lecitina de Soya	50	50	50	50	
Mezcla de Vitaminas y Minerales	40	40	40	40	Alimento Comercial
Dextrina	100	100	100	100	
Gluten	83.6	83.6	83.6	83.6	
α - Celulosa	74.8	59.8	60.6	60.6	
Fitasa	0.8	0.8	0.8	0	
Proteasa	0.8	0.8	0	0.8	
Levadura	0	15	15	15	

Tabla 1.1. Composición proximal de los alimentos.

	D1	D2	D3	D4	Co
Proteína (%)	40 \pm 0	40 \pm 3	45 \pm 1	38 \pm 2	41 \pm 2
Fósforo (%)	0.56 \pm 0.08	0.38 \pm 0.01	0.56 \pm 0.15	0.52 \pm 0.09	0.36 \pm 0.04
Ceniza (%)	6 \pm 0.2	4 \pm 0.4	4 \pm 0.4	5 \pm 0.5	11 \pm 0.5

Pruebas de alimentación.

Tilapia:

Se aplicaron un total de 4 tratamientos y un control (con 3 repeticiones para cada uno), que se probaron en el interior del laboratorio en tanques de 15 litros cada uno con un sistema de filtración interna, por un periodo de 50 días. Cada 10 días los organismos de cada tanque se pesaron para registrar la biomasa y ajustar la cantidad de alimento suministrado. Se utilizaron 10 individuos juveniles por unidad experimental que fueron seleccionados aleatoriamente y de los cuales se registró la talla (longitud total y longitud patrón Figura 4c) y peso inicial (0.47 ± 0.02 g). En los días que se pesaron los organismos no se alimentaron. La densidad de siembra recomendada para organismos de esta talla es de 1 organismo / litro (FAO, 2008-2012), y en este experimento se utilizó una densidad inicial de 0.6 organismos / litro.

La cantidad de alimento suministrado diariamente por tanque fue del 7% de la biomasa total distribuido en 2 raciones al día (9 y 15 hrs). Se alimentaron a los organismos manualmente hasta que visualmente alcanzaron el punto de saciedad, que se consideró cuando el pez no consumía ni buscaba más alimento. El alimento no consumido se colectó y pesó. Diariamente se revisaron los tanques por posibles decesos, los peces muertos fueron removidos y pesados para recalcular las raciones.

Tabla 2. Parámetros del agua en pruebas con tilapia.

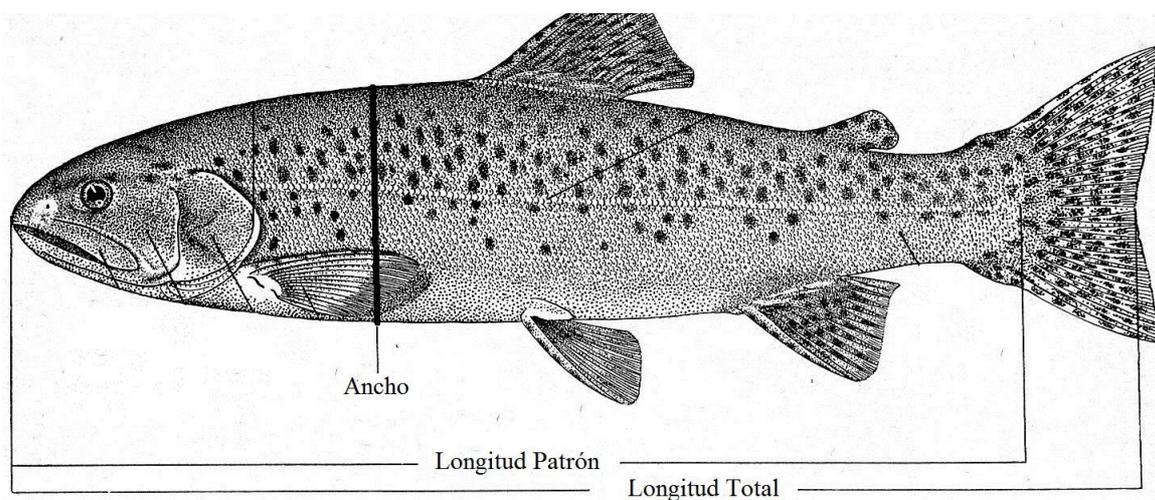
Oxígeno disuelto (mg / L)	5.25±0.1
Temperatura (°C)	22.3±0.2
pH	8.66±0.03

Trucha:

La cantidad de alimento suministrada diariamente a los organismos fue de 7% de la biomasa corporal en peso húmedo y se repartió en dos porciones al día (10 y 16 hrs). En trucha arcoíris se requieren 15 horas para vaciar un 1% de biomasa corporal en húmedo de alimento, por lo que de acuerdo a la curva de evacuación del 80-90 % requieren de 6 horas, el final de las cuales corresponde con el regreso del apetito (Riche et al., 2004). Durante 170 días, cada 15 días se pesaron a los organismos para reajustar la cantidad de alimento suministrado y registrar el crecimiento. En los días que se pesaron los organismos no se alimentaron.

Durante los primeros 75 días (**E1**), se administraron 2 dietas experimentales (D1 y D3) y una control (por triplicado). Los organismos se alimentaron manualmente hasta que visualmente alcanzaron el punto de saciedad (que se consideró cuando el pez no consumía ni buscaba más alimento), el alimento que no fue consumido se colectó y pesó. Los organismos se mantuvieron en tanques de 500 litros y cada uno contuvo 65 peces con un peso inicial de 2.8 g. El flujo de agua se revisó una vez al día para asegurar un flujo similar en todos los tanques. El fotoperiodo fue natural a lo largo del experimento y varió de acuerdo a la duración del día. El alimento no consumido se colectó y pesó. Diariamente se revisaron los tanques por posibles decesos, los peces muertos fueron removidos y pesados para recalcular las raciones.

Figura 4c. Medidas morfométricas tomadas de los organismos (Lagler et al. 1984).



Después de 75 días, los organismos se transfirieron a estanques de concreto circulares de 10 m de diámetro por un metro de profundidad (Volumen aproximado= 78,500 L) con flujo de agua de 120 L / min. En cada estanque se albergaron 200 individuos con un peso inicial de 12.8 ± 0.2 g durante 95 días (E2). De acuerdo a los resultados obtenidos en E1, donde se mantuvieron en las tinas de fibra de vidrio, se eligió la dieta que generó mejor crecimiento en los organismos (D1) y se utilizó un alimento comercial para trucha (Purina) como dieta control. Los organismos se alimentaron con un 5% de la biomasa corporal húmeda. Se le dio la misma atención de alimentación y pesado a los organismos que en E1.

Tabla 3. Parámetros del agua en pruebas con trucha.

Oxígeno disuelto (mg / L)	6.97 ± 0.05
Temperatura (°C)	14.3 ± 5
pH	7.4 ± 0.2

Parámetros determinados en organismos

Las variables de respuesta determinadas en las distintas etapas se resumen en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Pruebas realizadas a los organismos

	Tilapia	Trucha E1	Trucha E2	Trucha Lab
Ganancia en peso	X	X	X	X
Tasa crecimiento específico	X	X	X	X
Tasa de ingestión	X	X	X	--
Tasa conversión del alimento	X	X	X	--
Tasa conversión de la proteína	X	X	X	--
Supervivencia	X	X	X	--
Factor de condición	--	X	X	X
Coefficiente aparente digestibilidad	X	--	--	--
Consumo O ₂	X	--	--	--
Nitrógeno excretado	X	X	X	--
Fósforo excretado	X	X	X	X
Fósforo en heces	X	X	--	--
Lípidos en intestino	X	--	--	--
Proteína en intestino	X	--	--	--
Proteína en musculo	X	--	X	--
Actividad de la lisoenzima	--	X	X	--
Proteína en suero	--	X	X	X
Tabla 3.1 continuación.				
Fósforo suero	--	X	X	X
Actividad explosiva de los macrófagos	--	X	X	--
Proteína en moco	--	--	X	--

Parámetros de crecimiento y alimento.

Ganancia en Peso GP (g) (Adelizi et al., 1998):

$$GP = [(Peso \text{ final organismos} - Peso \text{ inicial organismos}) / Peso \text{ inicial organismos}] * 100$$

Tasa de Crecimiento Específico TCE (%) (Refstie et al., 1997):

$$TCE = [(\ln \text{ Peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{número de días de alimentación}] * 100$$

Tasa de Ingestión Ti (Mundheim et al., 2004):

$$Ti = [\text{Alimento ingerido en MS (materia seca, g)} / \text{Pez} / \text{Día}]$$

Tasa de Conversión del Alimento (Adelizi et al., 1998)

$$TCA = [GP \text{ (g)} / \text{Alimento Consumido (g)}]$$

Tasa de Conversión de la Proteína (Adelizi et al., 1998)

$$TCP = [GP / \text{Consumo de Proteína (g)}]$$

Factor de Condición (K) (Ricker, 1975):

$$K = ((\text{Peso organismo g} / (\text{Longitud total cm})^3) -) * 100$$

Coeficiente de Digestibilidad Aparente de la Proteína.

Para obtener el Coeficiente de Digestibilidad Aparente de la Proteína en el alimento se utilizó como marcador óxido de cromo se agregó a las dietas (1%) en el momento de su elaboración. Con las dietas adicionadas con cromo se alimentaron a los organismos de la manera como se menciona en la sección de “pruebas de alimentación” con la diferencia que 30 minutos después se colectaron las heces, que se secaron a 60 °C durante 24 horas, pulverizaron y almacenaron para su utilización en determinación de proteína por Micro Lowry descrita en el producto “Total Protein kit, Micro Lowry, Petersons modificación” (Sigma, St. Louis, MO) utilizando 10 mg de muestra. La cantidad de cromo

presente en heces se determinó por la técnica de Furukawa y Tsukahara (1966) utilizando 50 mg de muestra.

Para determinar el Coeficiente de Digestibilidad Aparente de la proteína se utilizó la siguiente fórmula (Gutierrez et al., 2009):

$$\text{CDA \%} = 100 [1 - (\text{Cf} / \text{Ci}) (\text{Mi} / \text{Mf})]$$

Donde Ci y Cf son las concentraciones (%) del nutriente y Mi y Mf son las concentraciones (%) del marcador inerte (Cr_2O_3) en la dieta ingerida y las heces producidas respectivamente.

Consumo de oxígeno y excreción de fósforo y nitrógeno.

Al finalizar las pruebas de alimentación de tilapia, se pesaron e introdujeron aleatoriamente 10 organismos de cada tratamiento en recipientes individuales sellados que contenían agua con concentraciones conocidas de oxígeno disuelto (O_i), fósforo y nitrógeno conocidas.

Después de 30 minutos se midió la concentración de oxígeno final (O_f) en los recipientes con un oxímetro (YSI 85, YSI Incorporated, Ohio, EUA) y se analizaron muestras de agua para determinar la cantidad excretada de N y P de acuerdo a la técnica del manual HACH 380 N Ness para N y 480 P React. Mo para P (HACH, Loveland, CO) usando un espectrofotómetro (HACH DR 2800).

El oxígeno consumido y el nitrógeno y fósforo excretados se calcularon por diferencia entre los valores finales y los iniciales.

En el caso de trucha, cada 15 días durante todo el experimento se colectaron muestras de agua de cada uno de los tanques. Una hora después y en recipientes diferentes se colectaron muestras nuevamente. Las muestras se transportaron en una hielera al laboratorio donde se determinaron las concentraciones de fósforo y nitrógeno presentes.

Fósforo en heces

La recolección de heces de los organismos se hizo manualmente con la ayuda de una red 30 min después de alimentarlos como ya fue mencionado. Estas se deshidrataron, pulverizaron y analizaron para determinar la cantidad de fósforo presente mediante el método 10127 Test N Tube Vials (HACH, Loveland, CO) con la modificación de utilizar como muestra 0.01 g de heces deshidratadas agregando 5 ml de agua destilada para disolverlas. Las muestras tratadas se usaron para determinar por espectrofotometría (HACH DR 2800) la cantidad de P presente.

Extracción de lípidos en intestino, proteína en intestino y músculo:

Al final de las pruebas de alimentación se eligieron aleatoriamente organismos de cada tratamiento que fueron sacrificados con una concentración de 200 mg / l de Tricaina metanosulfonato (MS-222). Una vez sacrificados, se obtuvieron muestras de intestinos y de músculo para cada tratamiento para determinar los respectivos porcentajes de lípidos y de proteínas.

Los lípidos se determinaron por el método descrito por Bligh y Dyer (1959) y la cantidad de proteína se determinó mediante técnica Micro Lowry descrita en el producto "Total Protein kit, Micro Lowry, Petersons modificación" (Sigma, St. Louis, MO).

Pruebas inmunológicas.

Suero sanguíneo

Una vez concluidas las fases de alimentación en tinas de fibra de vidrio y estanques de concreto, se obtuvieron muestras de la vena caudal de organismos de cada tratamiento. La sangre obtenida se refrigeró por 3 horas a 2 °C y después se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Se decantó el suero sanguíneo y se almacenó a -40 °C hasta su utilización (Welker et al. 2007).

Actividad de la lisoenzima

La prueba para determinar la actividad de la lisoenzima presente en suero sanguíneo se basó en la lisis de bacterias gram positivas *Micrococcus lysodeikticus* (Lifilizado; Sigma, St. Louis, MO) sensibles a la lisoenzima (Kiron et al. 1995). Se agregaron 100 μ l de suero sanguíneo a 1900 μ l de *M. lysodeikticus* en suspensión acuosa (0.2 mg mL⁻¹ en 0.05 M NaH₂PO₄ a 25 °C) (Caruso et al., 2002). Se registraron 3 lecturas de absorbancia en una longitud de onda de 530 nm con espectrofotometro (HACH DR 2800), a los 30 segundos, 4.5 min y 20 min después de agregar el suero sanguíneo. Las unidades de actividad de la lisoenzima (U) se definen como la cantidad de enzima que causa un decremento en la absorbancia de 0001 min L⁻¹.

Proteína en suero sanguíneo:

La determinación de la concentración de proteína en suero se realizó utilizando 100 μ L de muestra con la misma técnica usada para el músculo.

Fósforo en suero sanguíneo:

El fósforo en suero sanguíneo se determinó utilizando 50 μ l con el mismo método de fosforo en heces.

Actividad explosiva de los macrófagos

Se realizó al final de 75 días y 170 para determinar la actividad respiratoria “explosiva” de los macrófagos del riñón, los riñones disectados se colocaron en medio Leibovitz L-15 suplementado con 0.1% de suero fetal bovino (Burrells et al. 1999). Una vez aislados se cultivaron los macrófagos durante 3 días y la actividad se determinó con la reducción del colorante azul nitrotetrazolium (NBT) como lo describen Chung y Secombes (1988).

Proteína en moco:

Se determinó al finalizar los 170 días de prueba con la técnica descrita por Yokoyama et al. (2006). Constó en elegir aleatoriamente 6 peces de cada tratamiento, coleccionar en un área de 1 cm² con un hisopo estéril la mucosa cutánea para inmediatamente suspenderla en 1 ml de solución salina fosfatada (pH = 7.2) y centrifugada (2000 g, 10 min a temperatura ambiente). La proteína se determinó como en los casos anteriores.

Fósforo excretado por orina y branquias, proteína y fósforo en suero sanguíneo.

En el laboratorio de producción acuícola de la FES-Iztacala se realizó un complemento al proyecto. Al finalizar todas las pruebas se consiguieron truchas arcoíris de un peso inicial de 1.8 ± 2 g. Los tratamientos D1, D3 y Co se administraron (ración = 7% biomasa por tanque) por triplicado a 20 organismos que se mantuvieron en tanques de 100 litros durante 60 días en un sistema de recirculación. Los organismos se alimentaron a las 8:00 y 17:00 horas.

En el día 30 se realizó una prueba para determinar el fósforo excretado por organismos cada dos horas durante 14 horas, iniciando a las 6:00 am. Se pesó e introdujo 1 organismo por tanque (3 por tratamiento) en recipientes de 250 ml (con una concentración inicial conocida de fósforo disuelto) durante 40 minutos. Posteriormente se obtuvo una muestra del agua del recipiente y se analizó para determinar el fósforo disuelto mediante la técnica 480 P React. Mo para P (HACH, Loveland, CO) y se analizó como se describió previamente.

En el día 60 de alimentación, cada dos horas durante 6 horas se realizó el mismo procedimiento que en el día 30, con la diferencia que se extrajo sangre a organismos sacrificados (con una concentración de 200 mg/l de Tricaina metanosulfonato, MS-222). La sangre se procesó como se menciona previamente en el texto, y se analizó para proteína y fósforo de igual manera.

Tabla 4. Parámetros del agua en pruebas con trucha en laboratorio.

Oxígeno disuelto (mg / L)	7.16 ± 0.06
Temperatura (°C)	14.7 ± 0.2
pH	9.3 ± 0.06

Análisis estadístico.

Los datos referentes a crecimiento, excreción de P y N, extracción de lípidos, digestibilidad de la dietas y respuesta inmunológica obtenidos a los largo de las pruebas de alimentación se analizaron con ANDEVA de una variable. Las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, se evaluaron con la prueba de Tukey con nivel de significancia $P < 0.05$ para cada grupo de comparaciones. En el caso de resultados de E2 (truchas en Amanalco) se utilizó la prueba de T de student para muestras independientes para determinar diferencias significativas. Los resultados se presentan como medias \pm ES (error estándar de la media), De encontrarse, distintas letras indican diferencias significativas. Las pruebas de ANDEVA y de diferencias se realizaron con el software Minitab ver. 15 (Minitab Inc., PA, EUA).

Resultados

Tilapia.

Las ganancias en peso y la tasa de crecimiento específico que se obtuvieron con los cuatro tratamientos no resultaron diferente del tratamiento Co (Figura 5 y Tabla 5 respectivamente). La misma falta de diferencia se observó para las tasas de ingestión, de conversión del alimento y eficiencia de la proteína (tabla 5). En todos los tratamientos la supervivencia superó el 80 %. En la figura 6 se observa que a los 50 días el crecimiento de peces alimentados con alimento comercial no incrementa. Los coeficientes de digestibilidad aparente de la proteína en los tratamientos con proteína vegetal superaron el 90 % sin diferencias significativas entre dietas (figura 7).

El consumo de oxígeno de los organismos no varió entre tratamientos (Figura 8). En la figura 9 se observa que las dietas experimentales muestran una tendencia a una mayor excreción amoniacal que con dietas a base de harina, aunque la diferencia no resultó estadísticamente significativa ($P < 0.05$). En la figura 10 se observa que la excreción de fósforo no mostró una diferencia significativa entre los tratamientos, mientras que el fósforo presente en heces disminuyó significativamente con los tratamientos D2, D3 y D4 en comparación con los demás tratamientos (Figura 11).

En cuanto a los lípidos en intestino, se observó un incremento con los alimentos de proteína vegetal que resultó significativo ($P < 0.05$) para los tratamientos D3 y D4 en comparación a Co (figura 12). La cantidad de proteína en intestino húmedo mostró una tendencia a valores mayores en los tratamientos con proteína vegetal pero solo fue significativo en el tratamiento D4 en comparación con Co (figura 13). Los valores medios de proteína en músculo fueron ligeramente superiores con harinas vegetales que con Co, aunque no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre ellos (Figura 14).

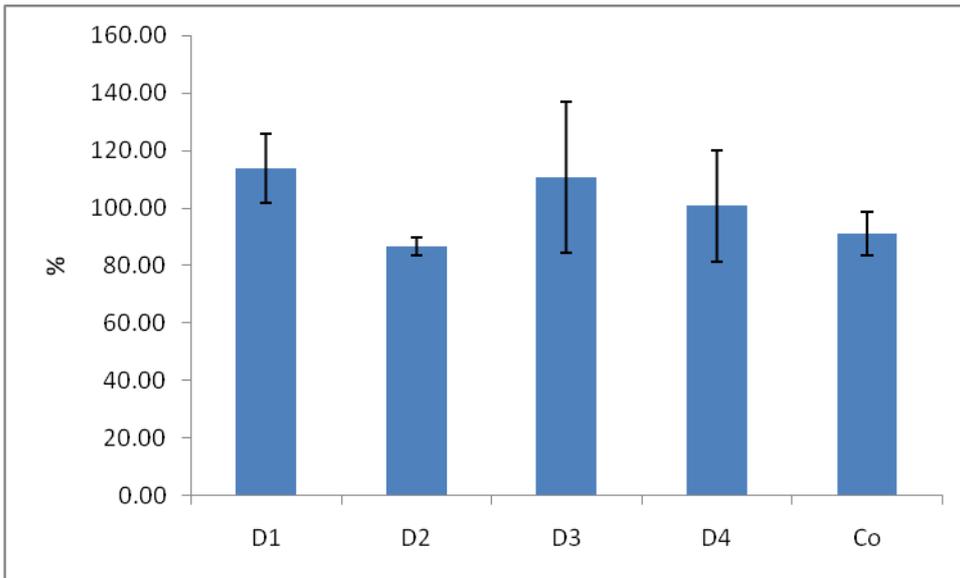


Figura 5. Ganancia en peso de las tilapias alimentadas con distintos tratamientos durante 60 días (No se observaron diferencias significativas a este nivel ($p < 0.05$)).

Tabla 5. Parámetros de tilapia alimentadas con distintos tratamientos. Los datos son las medias de los tratamientos \pm Error estándar. De encontrarse, distintas letras en la misma línea horizontal indican diferencias significativas.

	D1	D2	D3	D4	Co
TCE	1.51 \pm 0.11	1.25 \pm 0.04	1.46 \pm 0.24	1.38 \pm 0.19	1.29 \pm 0.08
Ti	0.025 \pm 0.001	0.022 \pm 0.001	0.026 \pm 0.004	0.024 \pm 0.002	0.021 \pm 0.001
TCA	0.5 \pm 0.03	0.4 \pm 0.06	0.5 \pm 0.03	0.4 \pm 0.03	0.4 \pm 0.09
TCP	0.86 \pm 0.1	1.02 \pm 0.1	0.86 \pm 0.1	0.98 \pm 0.1	0.94 \pm 0.1
SUR	80 \pm 7	84 \pm 4	91 \pm 2	91 \pm 2	84 \pm 2

TCE= Tasa de Crecimiento Específico; Ti = Tasa de ingestión; TCA = Tasa de conversión del alimento; TCP = Tasa de conversión de la proteína; SUR = Supervivencia; TCE = $[(\ln \text{Peso Final} - \ln \text{peso inicial}) / \text{Número de días de alimentación}] * 100$; Ti = $[\text{Alimento ingerida en MS (materia seca, g)} / \text{Pez} / \text{Día}]$; TCA = $[\text{GP (g)} / \text{Alimento Consumido (g)}]$; TCP = $[\text{GP} / \text{Consumo de Proteína (g)}]$

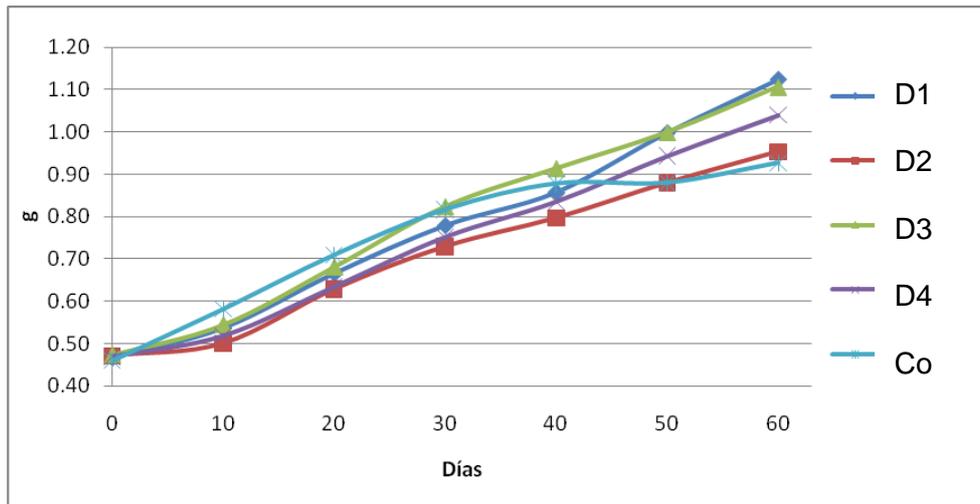


Figura 6. Crecimiento (g) de las tilapias alimentadas con dietas con sustitución completa de la harina de pescado con una mezcla de harina de soya y polvo de *Spirulina*.

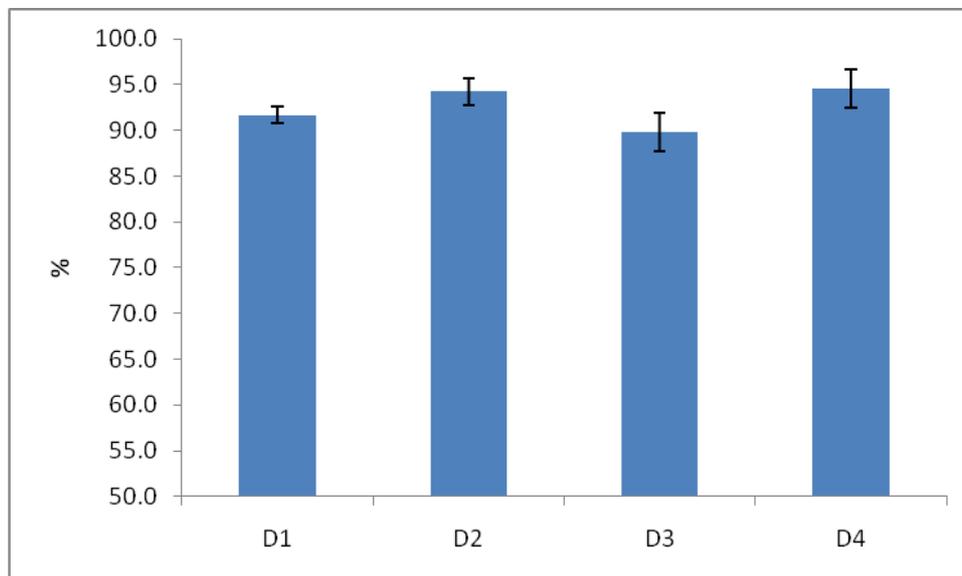


Figura 7. Coeficiente de Digestibilidad Aparente de la Proteína (no se observaron diferencias significativas a este nivel ($p < 0.05$)).

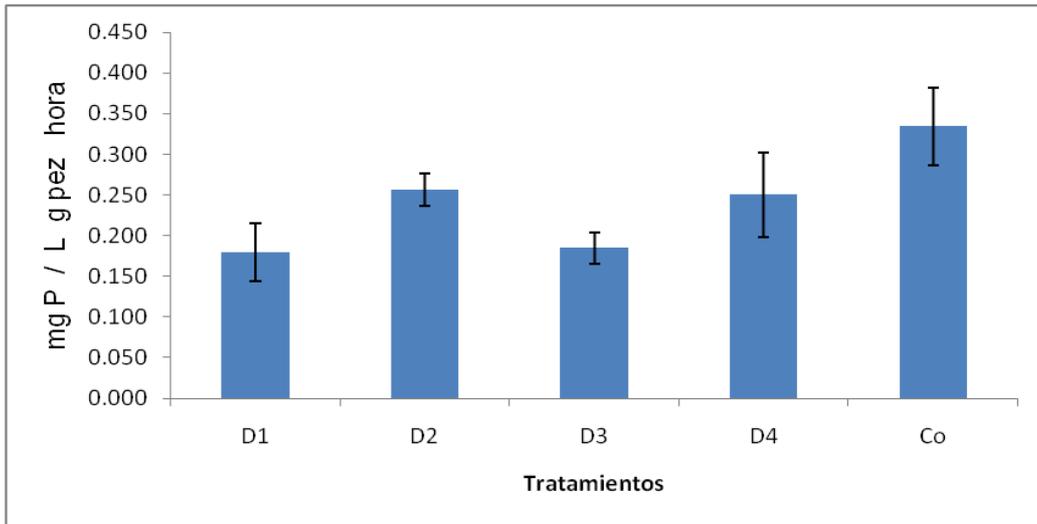


Figura 10. Fósforo excretado por juveniles de tilapia (no se observaron diferencias significativas a este nivel ($p < 0.05$)).

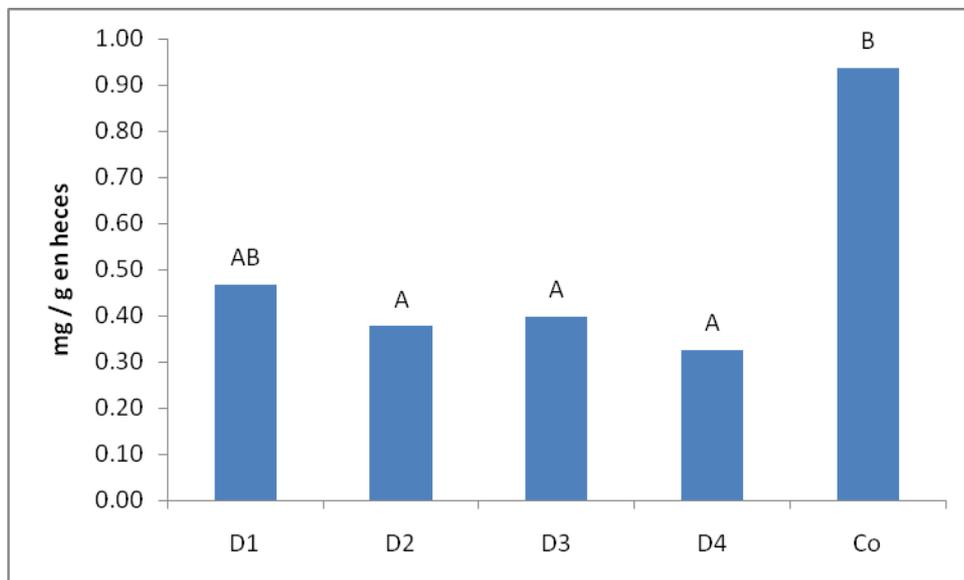


Figura 11. Fósforo en heces de tilapia alimentada con los distintos tratamientos

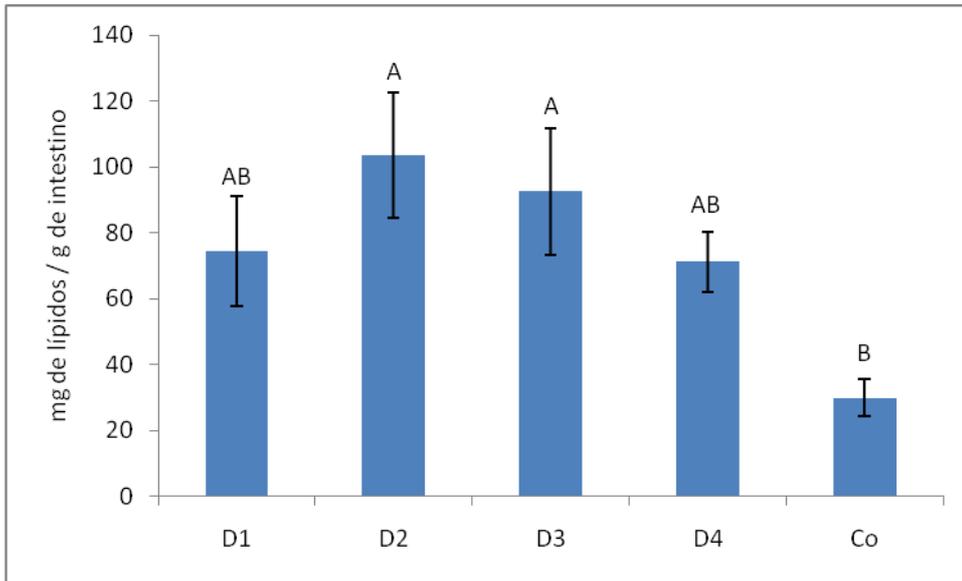


Figura 12. Lípidos en intestino húmedo de tilapia.

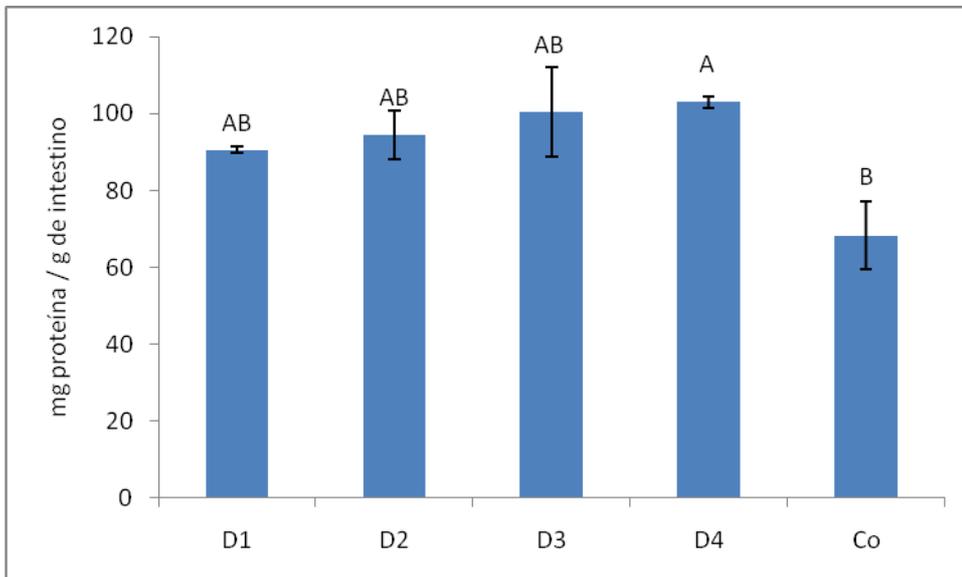


Figura 13. Proteína en intestino húmedo de tilapia.

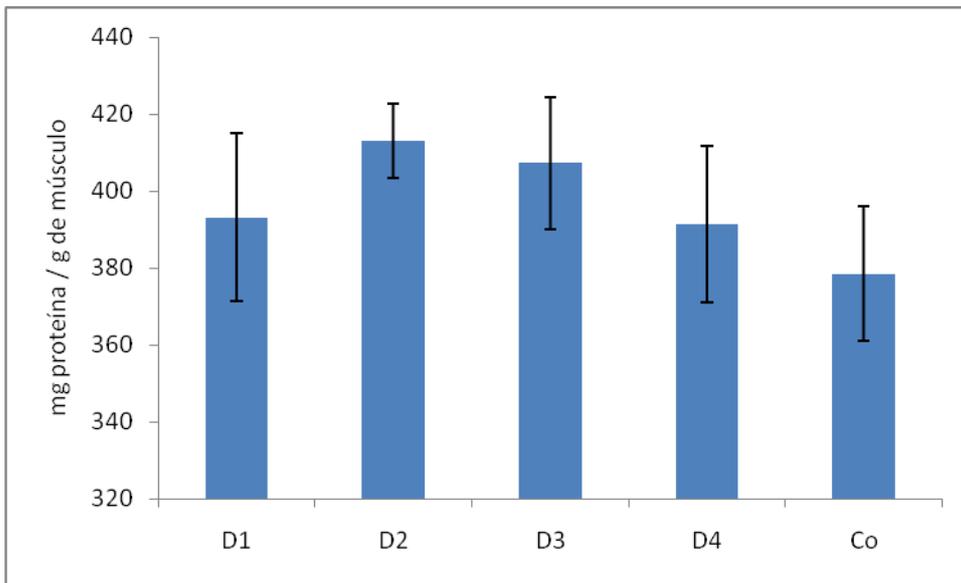


Figura 14. Proteína presente en filete de tilapia (no se observaron diferencias significativas a este nivel ($p < 0.05$)).

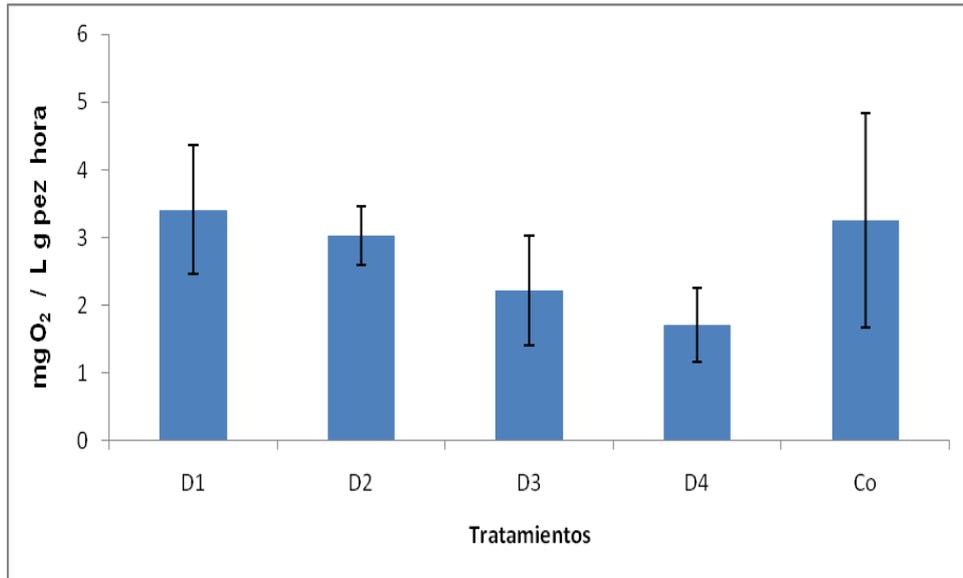


Figura 8. Oxígeno consumido por tilapias (no se observaron diferencias significativas a este nivel ($p < 0.05$)).

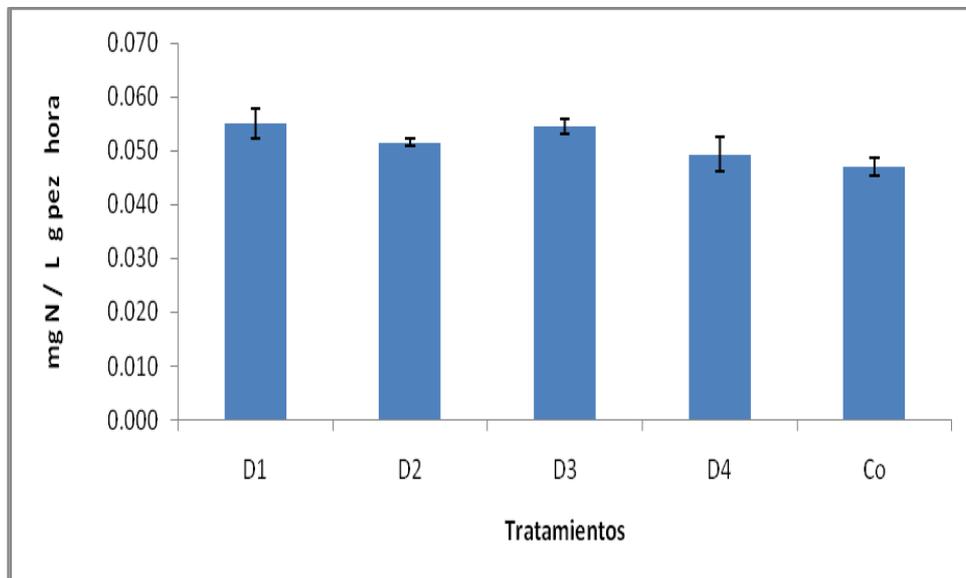


Figura 9. Nitrógeno amoniacal excretado por juveniles de tilapia (no se observaron diferencias significativas a este nivel ($p < 0.05$)).

Trucha en granja Amanalco

Con respecto al crecimiento registrado en los organismos, se puede observar que durante los primeros 75 días (E1) las medias de la ganancia en peso (Figura 15) y de la tasa de crecimiento específico (tabla 4) de organismos alimentados con harinas vegetales fueron similares al tratamiento Co. Sin embargo en la segunda etapa (E2) se observa un incremento estadísticamente significativo en las medias de ganancia en peso (Figura 16) y tasa de crecimiento específico (Tabla 6) de los organismos alimentados con Co. En cuanto a los resultados de tasa de ingestión, tasa de conversión del alimento y tasa de eficiencia de la proteína (tabla 6) se observa la misma tendencia que en los casos anteriores: en E1 los valores son similares entre los tratamientos pero en E2 el tratamiento Co muestra un incremento en comparación con D1. La supervivencia de los organismos del tratamiento E3 fue la menor de todos los tratamientos, en E2 los organismos con el tratamiento Co obtuvieron el menor porcentaje de supervivencia.

El factor de condición se mantuvo por debajo de 1.5 en todos los tratamientos (figura 19) al final de E1 y en E2 (figura 20) se ubicó en valores cercanos a 1.4 para los tratamientos D1 y Co.

Con respecto a la excreción de nutrimentos al medio se presentaron fluctuaciones en nitrógeno y fósforo que coinciden con los aumentos de flujo por fenómenos meteorológicos (Figura 21 y Figura 22). En el fósforo descargado al medio a través de heces de trucha alimentadas con tratamientos a base de harinas vegetales (figura 23) se observó una reducción estadísticamente significativa ($P < 0.05$) que es aproximadamente 6 veces menor al registrado con el alimento control.

La cantidad de proteína en músculo de organismos alimentados con D1 fue similar con el tratamiento Co (figura 24).

La actividad de la lisoenzima en E1 (figura 25) fue menor en organismos alimentados con dietas con alto contenido de proteína vegetal en comparación con Co, sin embargo en E2 la actividad fue similar en organismos alimentados con los distintos tratamientos (figura 26)

El porcentaje de proteína presente en suero sanguíneo fue mayor en E1 en organismos alimentados con el tratamiento Co (figura 27), sin embargo la diferencia entre los tratamientos fue menor en E2 entre los tratamientos (figura 28). El porcentaje de fósforo en suero sanguíneo en E1 (figura 29) fue similar en los tratamientos con excepción de Co que mostró un leve incremento, en E2 el tratamiento Co superó estadísticamente ($P < 0.05$) a D1 en este parámetro (figura 30).

La actividad explosiva de los macrófagos mostró el menor valor en organismos alimentados con D3 y el mayor con D1 en E1 (figura 31), en E2 mostró un valor muy similar entre tratamientos (figura 32).

El porcentaje de proteína en moco mostró un ligero aumento (no significativo) en el tratamiento D1 (figura 33).

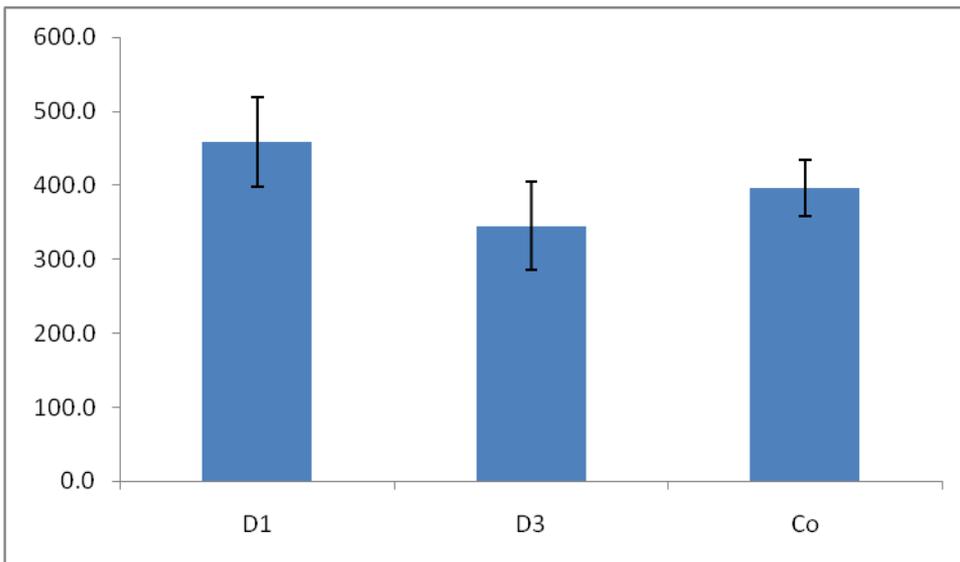


Figura 15. Ganancia en peso de truchas alimentadas con distintos tratamientos durante 75 días (no se observaron diferencias significativas a este nivel ($p < 0.05$)).

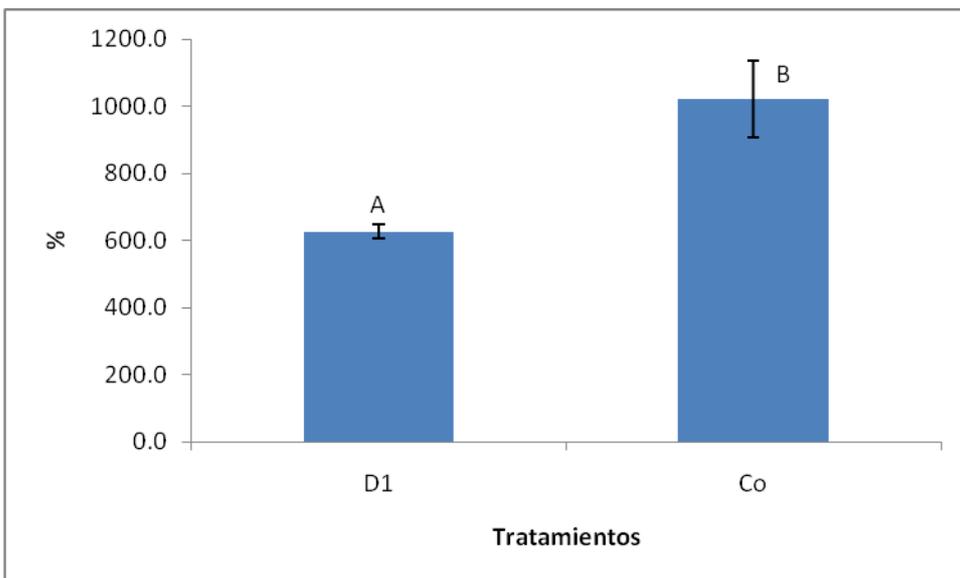


Figura 16 . Ganancia en peso de truchas alimentadas con distintos tratamientos durante 95 días (días de experimentación 75-170).

Tabla 6. Parámetros relacionados al alimento de truchas alimentadas con distintos tratamientos. Los datos son las medias de los tratamientos \pm Error estándar. De encontrarse, distintas letras en la misma fila horizontal indican diferencias significativas.

		D1	D3	Co
TCE	E1	2.3 \pm 0.1	2 \pm 0.2	2.1 \pm 0.1
	E2	2.1 ^a	--	2.5 \pm 0.1 ^b
Ti (g/pez/día)	E1	0.19 \pm 0.01	0.18 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01
	E2	0.83 ^a	--	1.17 ^b
TCA	E1	0.95 \pm 0.08	0.80 \pm 0.06	0.81 \pm 0.06
	E2	1.19 ^a	--	1.39 ^b
TCP	E1	2.1 \pm 0.02	2.1 \pm 0.01	1.8 \pm 0.01
	E2	3 ^a	--	3.5 ^b
SUR (%)	E1	84 \pm 2	67 \pm 21	78 \pm 5
	E2	70	--	50

Ti = Tasa de ingestión; TCA = Tasa de conversión del alimento; TCP = Tasa de conversión de la proteína; SUR = Supervivencia; E1= Primeros 75 días; E2= Segundos 95 días; TCE = $[(\ln \text{Peso Final} - \ln \text{peso inicial}) / \text{Número de días de alimentación}] * 100$; Ti = [Alimento ingerida en MS (materia seca, g) / Pez / Día]; TCA = [GP (g) / Alimento Consumido (g)]; TCP = [GP / Consumo de Proteína (g)]

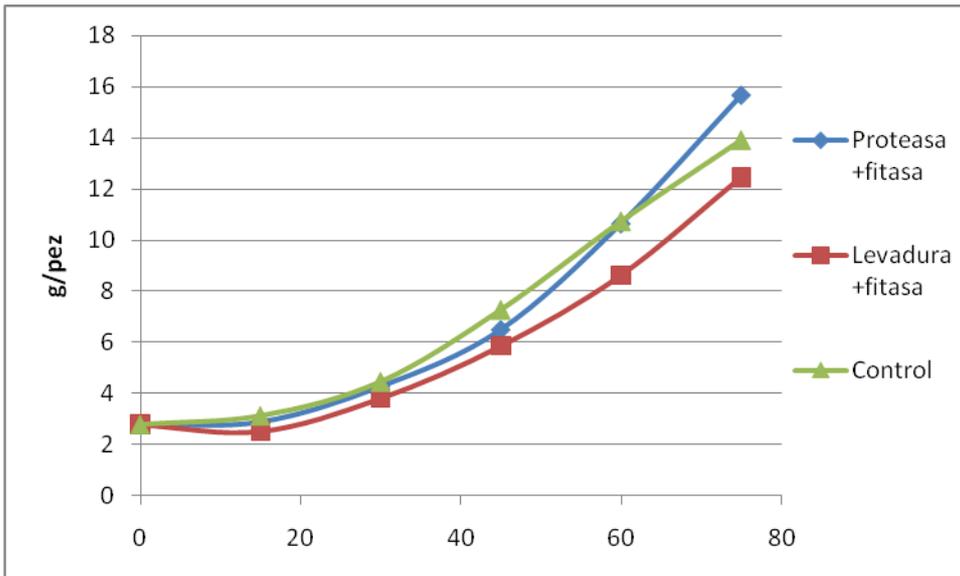


Figura 17. Peso de los truchas alimentados con distintos tratamientos durante 75 días.

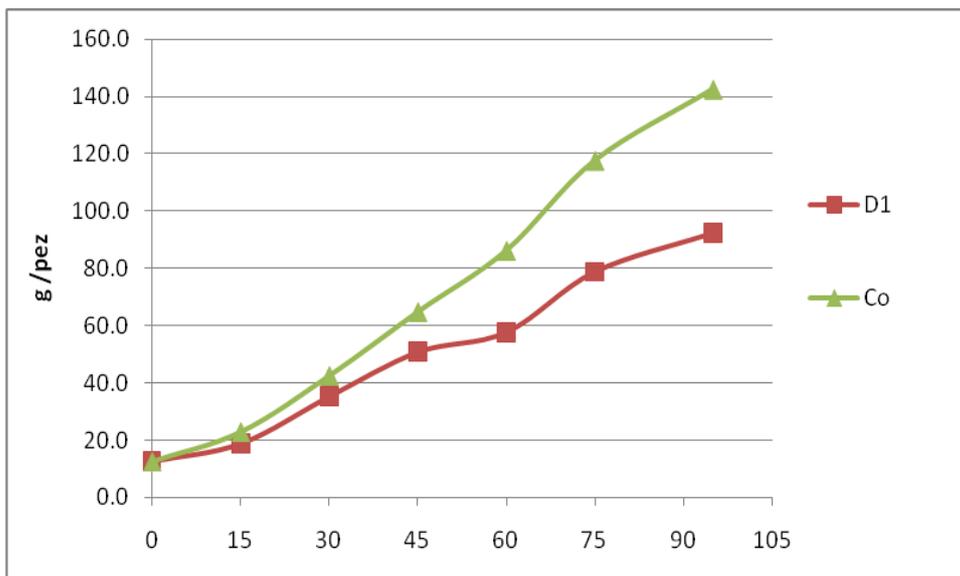


Figura 18. Peso de los truchas alimentados con distintos tratamientos durante 95 días (días de experimentación 75-170).

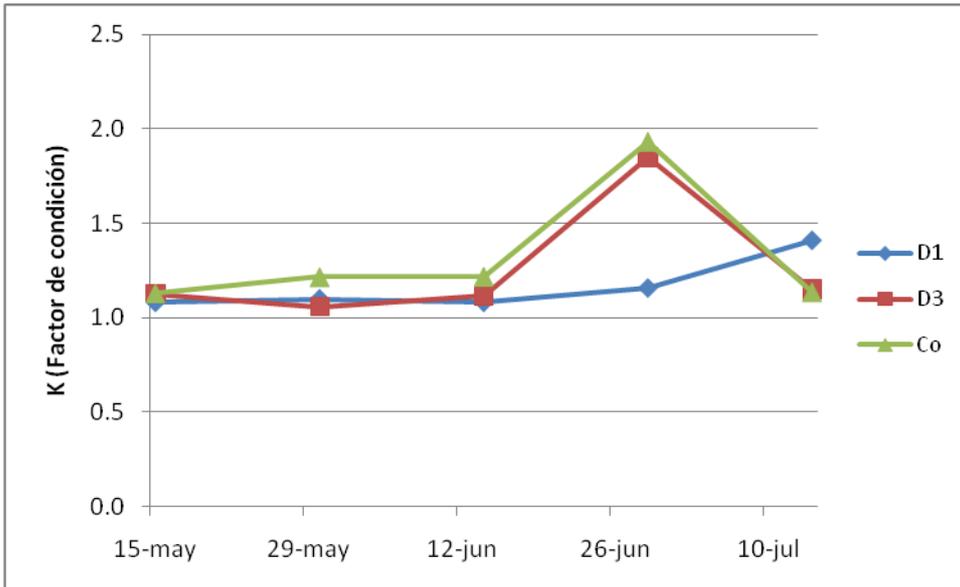


Figura 19. Factor de condición de truchas alimentadas con diferentes tratamientos durante 75 días.

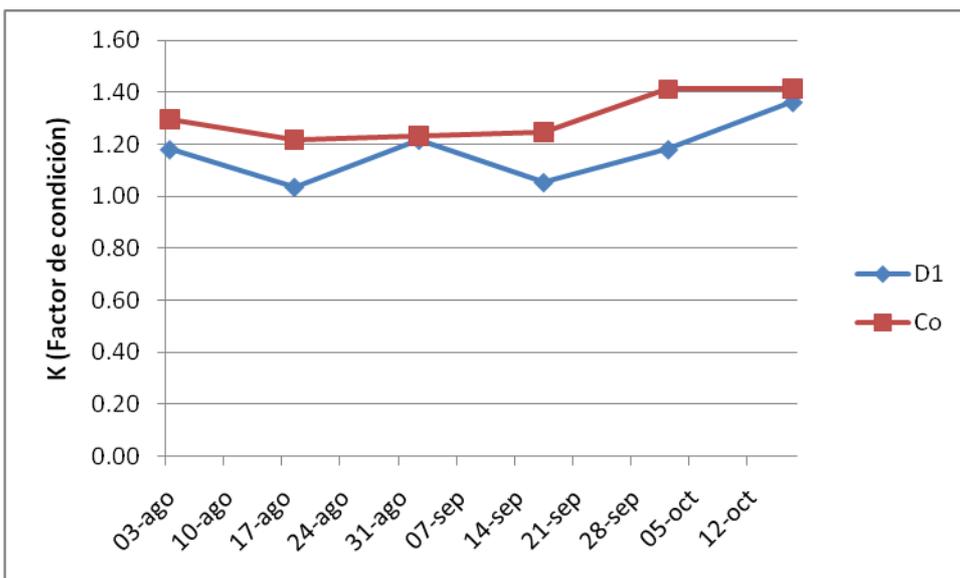


Figura 20. Factor de condición de truchas alimentadas con diferentes tratamientos durante 95 días (días de experimentación 75-170).

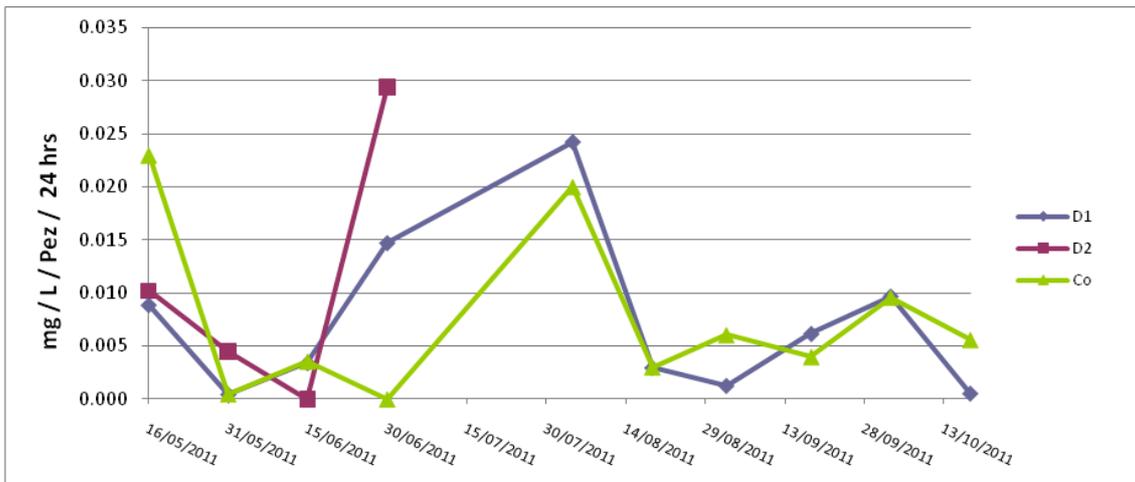


Figura 21. Nitrógeno amoniacal excretado por organismos alimentados con distintos tratamientos durante 170 días.

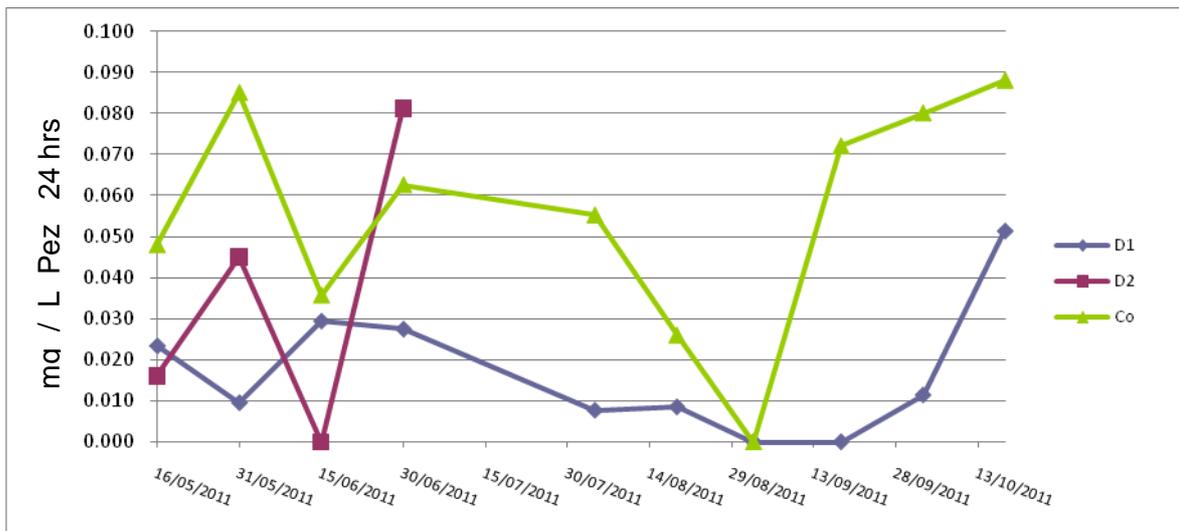


Figura 22. Fósforo excretado por organismos alimentados con distintos tratamientos durante 170 días..

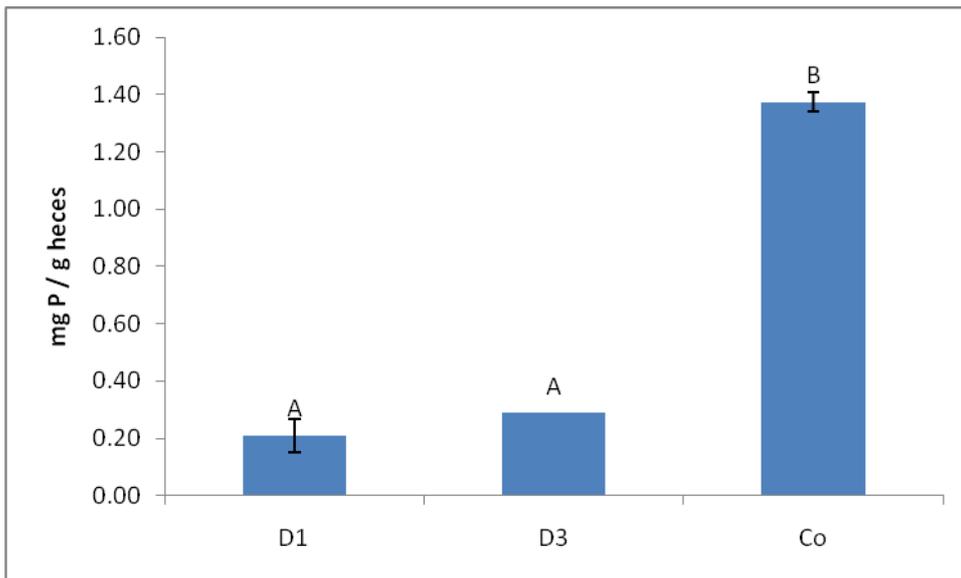


Figura 23. Fósforo en heces de organismos alimentados con distintos tratamientos al final de 75 días.

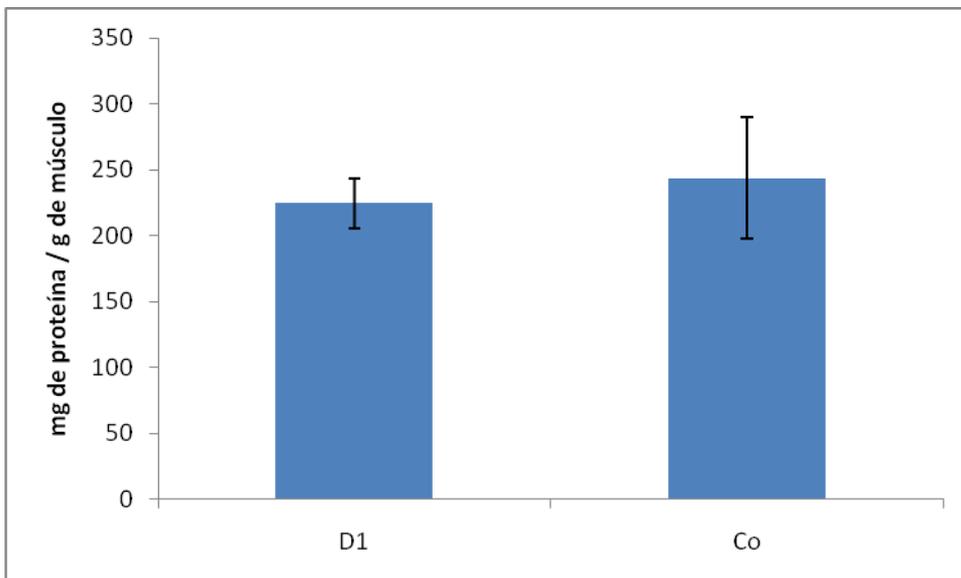


Figura 24. Proteína en músculo organismos alimentados con distintos tratamientos al final de 170 días (no se observaron diferencias significativas a este nivel ($p < 0.05$)).

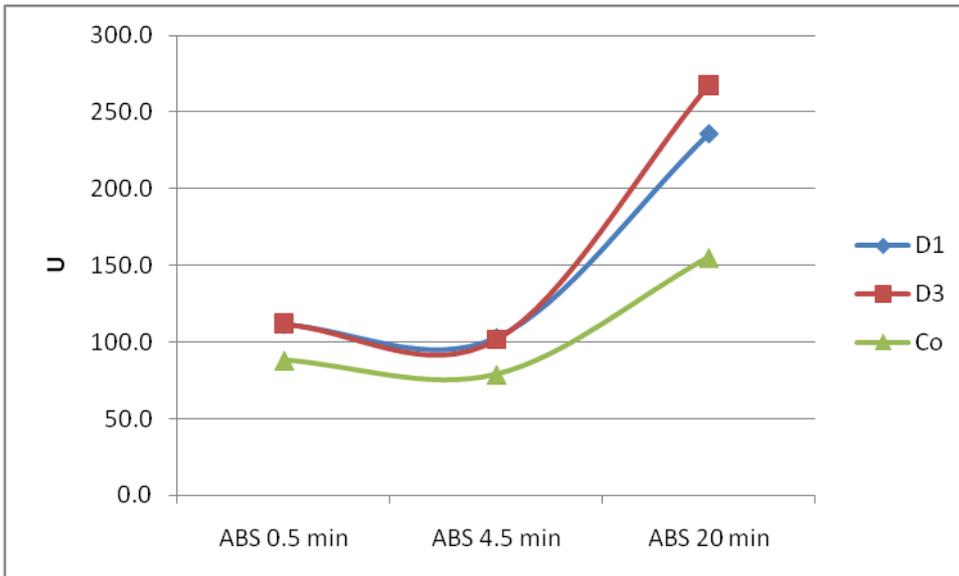


Figura 25. Actividad de la lisozima presente en suero sanguíneo de truchas alimentadas con distintos tratamientos durante 75 días.

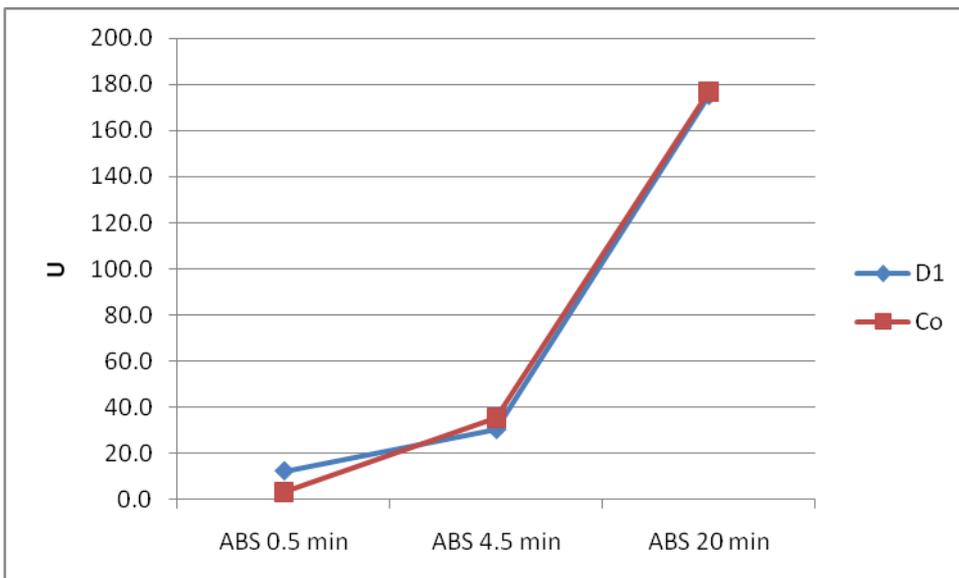


Figura 26. Actividad de la lisozima presente en suero sanguíneo de truchas alimentadas con distintos tratamientos durante 95 días (días de experimentación 75-170).

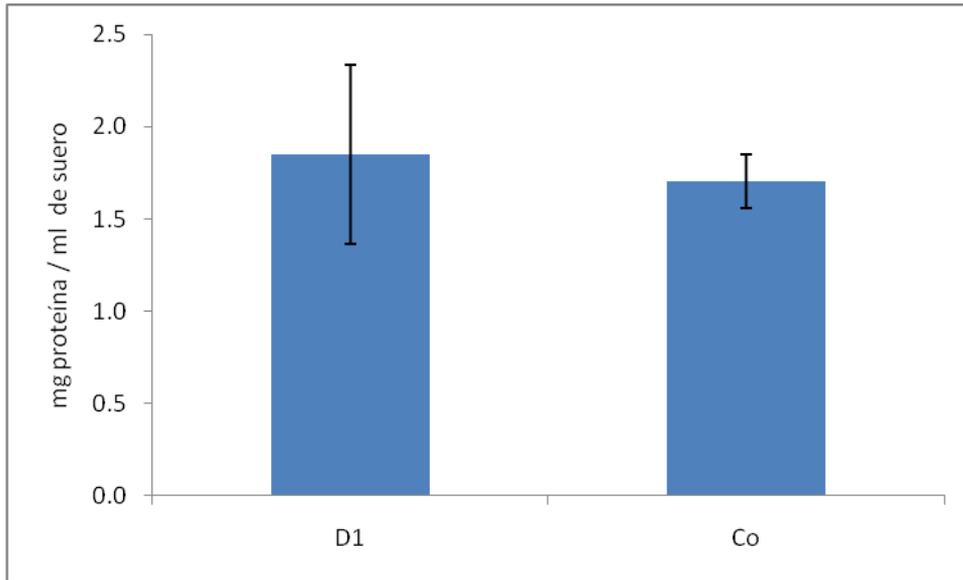


Figura 27. Proteína presente en suero sanguíneo de truchas alimentadas con distintos tratamientos durante 75 días (no se observaron diferencias significativas a este nivel ($p < 0.05$)).

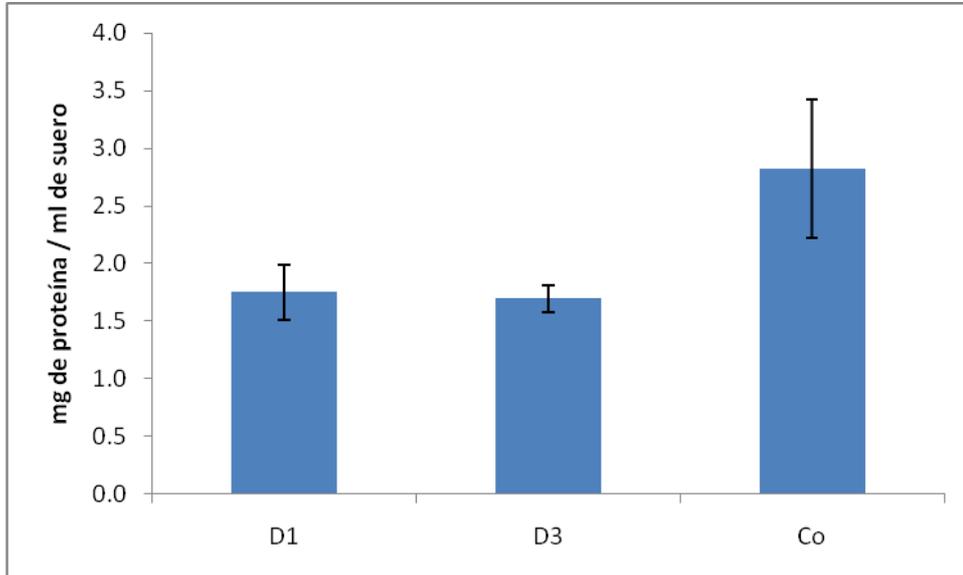


Figura 28. Proteína presente en suero sanguíneo de truchas alimentadas con distintos tratamientos al final de 95 días (días de experimentación 75-170) (no se observaron diferencias significativas a este nivel ($p < 0.05$)).

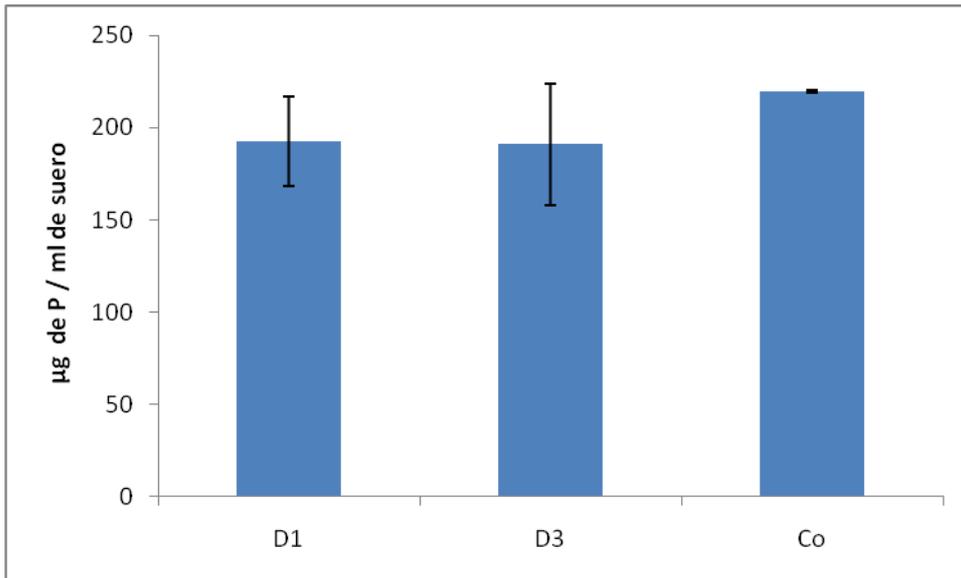


Figura 29. Fósforo presente en suero sanguíneo de truchas alimentadas con distintos tratamientos durante 75 días (no se observaron diferencias significativas a este nivel ($p < 0.05$)).

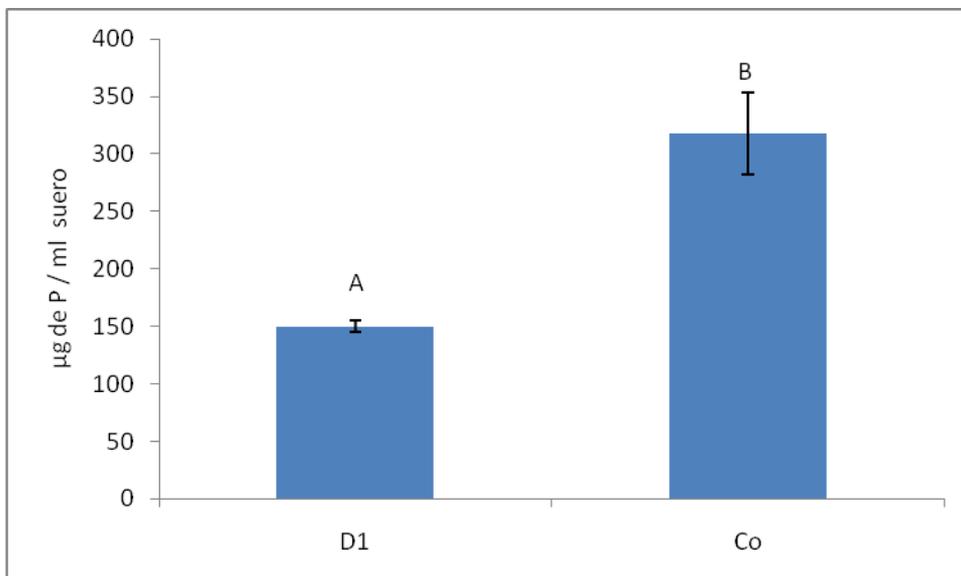


Figura 30. Fósforo presente en suero sanguíneo de truchas alimentadas con distintos tratamientos al final de 95 días (días de experimentación 75-170)

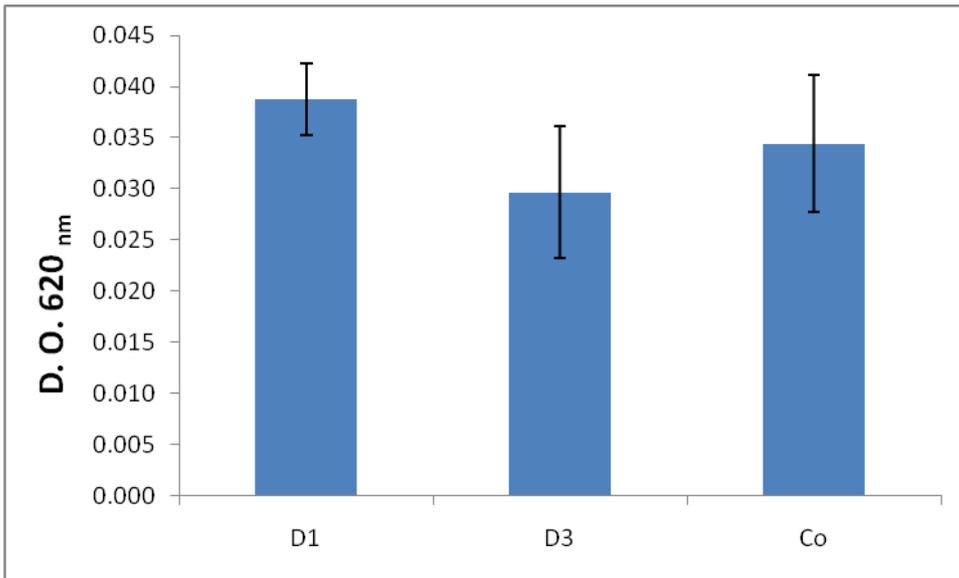


Figura 31. Actividad explosiva de los macrófagos presente en suero sanguíneo de truchas alimentadas con distintos tratamientos durante 75 días (no se observaron diferencias significativas a este nivel ($p < 0.05$)).

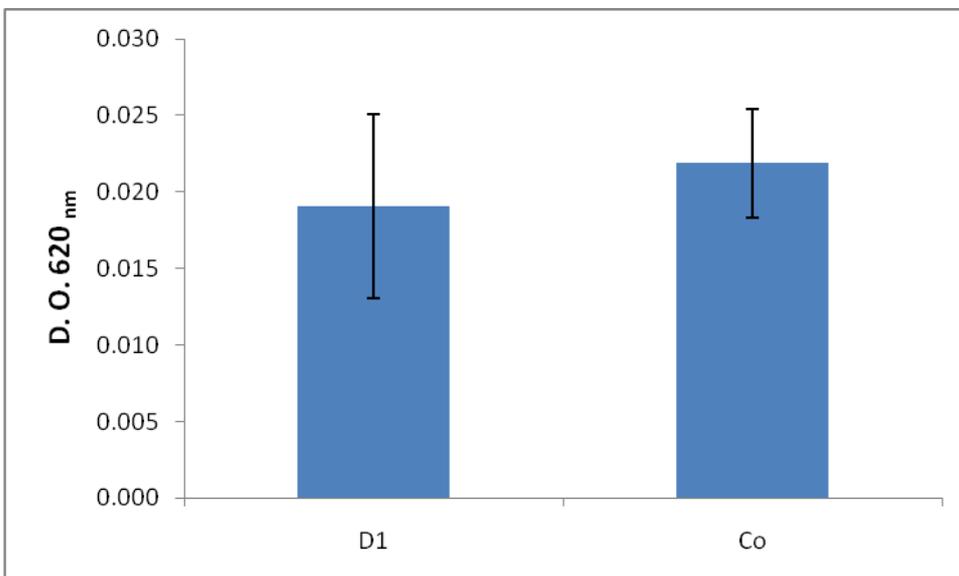


Figura 32. Actividad explosiva de los macrófagos presente en suero sanguíneo de truchas alimentadas con distintos tratamientos durante 95 (días de experimentación 75-170) (no se observaron diferencias significativas a este nivel ($p < 0.05$)).

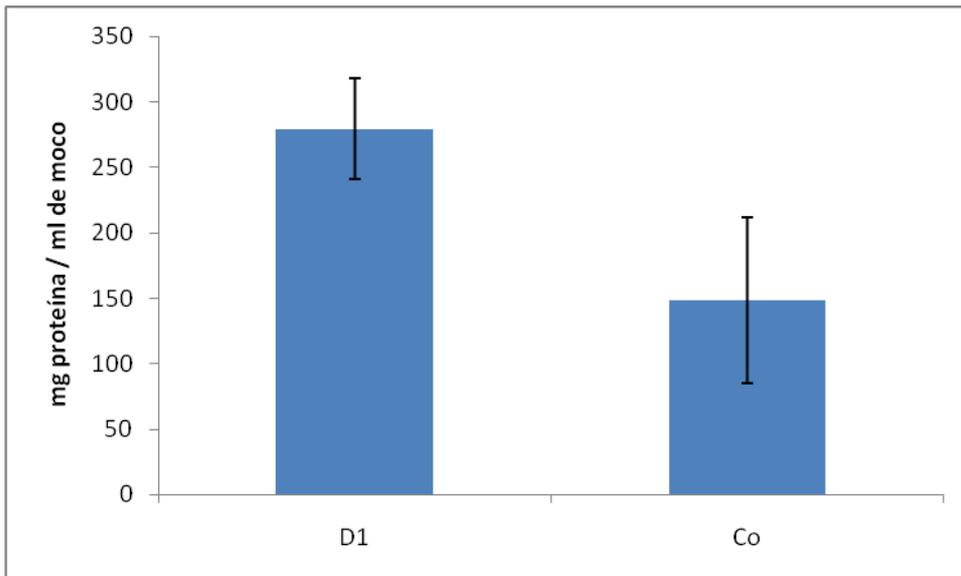


Figura 33. Proteína en moco de truchas alimentadas con distintos tratamientos durante 95.

Fósforo excretado por orina y branquias, proteína y fósforo en suero sanguíneo.

Como medida extra, se determinó GP, TCE y K en los organismos mantenidos en el laboratorio para corroborar su adecuado desarrollo (tabla 7).

Tabla 7. Parámetros de crecimiento de organismos alimentados durante 60 días con distintos tratamientos. Los datos son las medias de los tratamientos \pm Error estándar. No se encontraron diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.

	D1	D3	Co
GP	204.2 \pm 24.6	192.3 \pm 25.3	277.6 \pm 20.4
TCE	1.44 \pm 0.17	1.39 \pm 0.12	1.73 \pm 0.07
K	1 \pm 0.1	1	1.1 \pm 0.1

GP = Ganancia en peso; TCE = Tasa de crecimiento específico; K = Factor de conversión; GP = [(Peso final organismos – Peso inicial organismos) / Peso inicial organismos] * 100; TCE = [(ln Peso Final – ln peso inicial) / Número de días de alimentación] * 100.

A los 30 días se observó un incremento en los valores del fósforo excretado por la mañana, mientras que por la tarde (16:00 hrs aproximadamente) se observó un decremento y estabilización en el fósforo excretado por los tratamientos D1 y Co (Figura 34). Los organismos alimentados con D3 parecen mostrar la tendencia contraria a los demás tratamientos. A los 60 días los valores de D1 y Co muestran similares comportamientos y D3 nuevamente supera a ambos tratamientos (figura 35).

Los valores de proteína en suero sanguíneo de los organismos aumentan después de ser alimentados y se comportan de manera similar entre los tratamientos (figura 36).

Los valores de fósforo en suero sanguíneo de organismos de las dietas con proteína vegetal aumentan con el tiempo después de ser alimentados, y con Co aumentan al ser alimentados pero tienden a disminuir con el tiempo (figura 37).

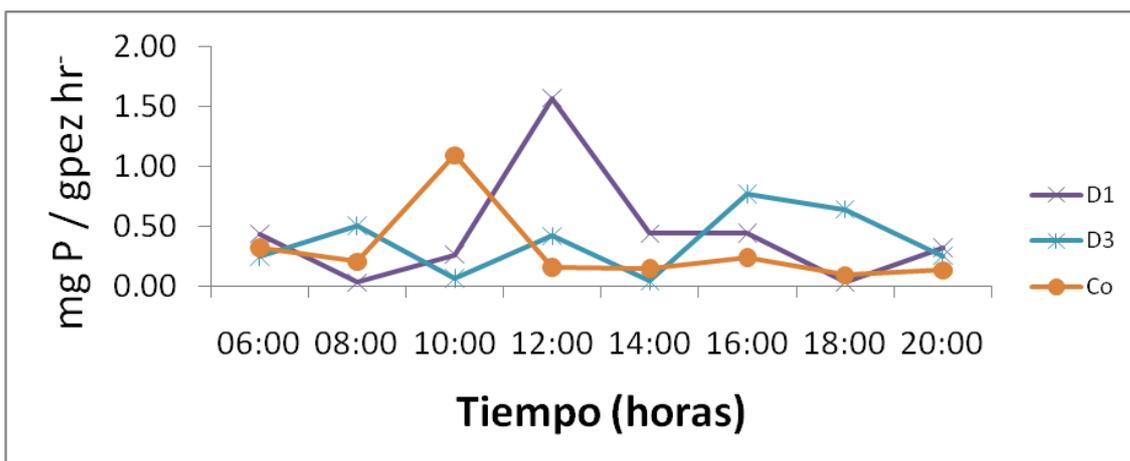


Figura 34. Fósforo excretado por organismos a los 30 días de ser alimentados con distintos tratamientos.

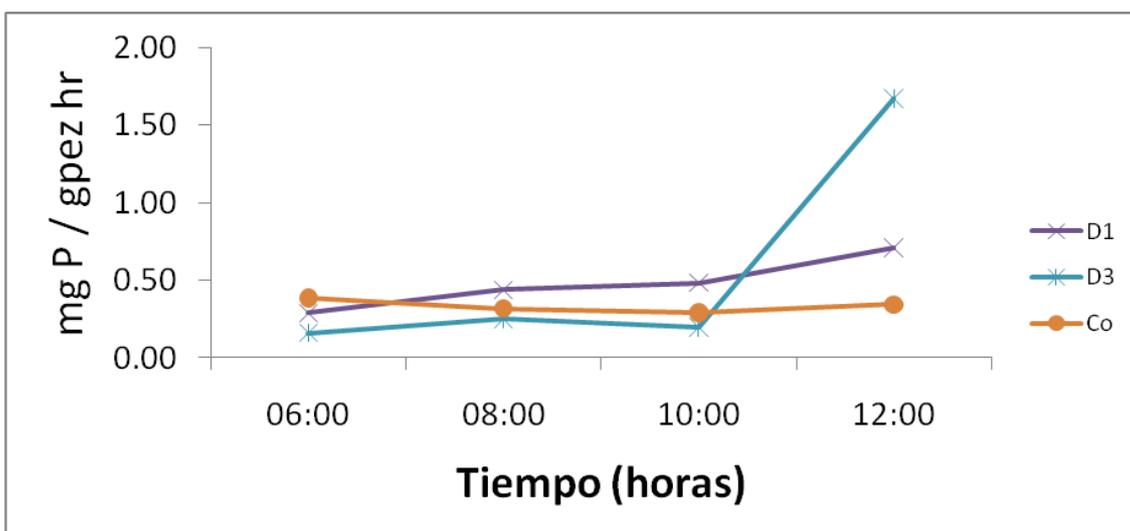


Figura 35. . Fósforo excretado por organismos a los 60 días de ser alimentados con distintos tratamientos.

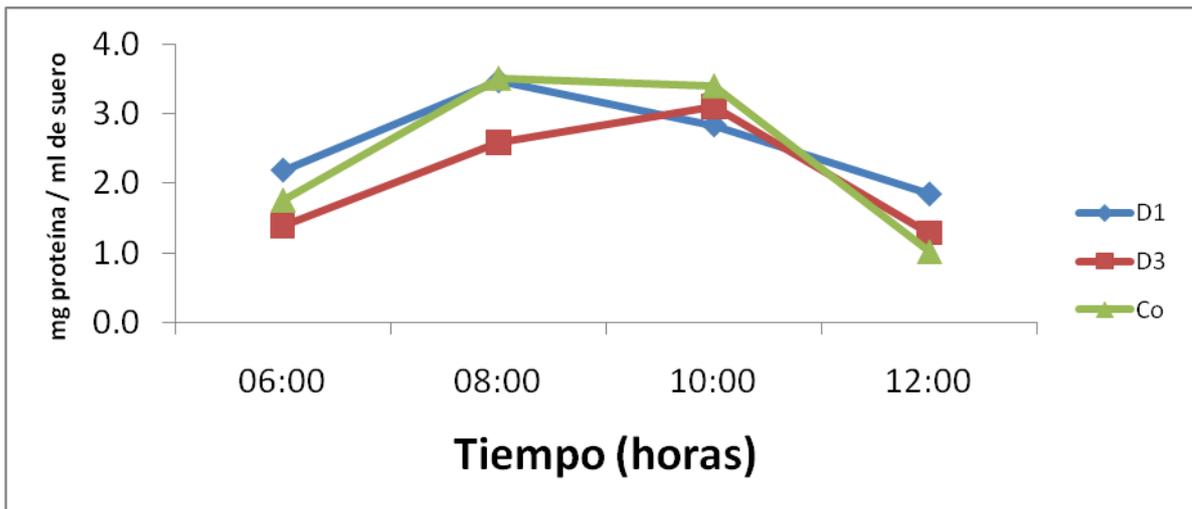


Figura 36. Proteína en suero sanguíneo de organismos a los 60 días de ser alimentados con distintos tratamientos.

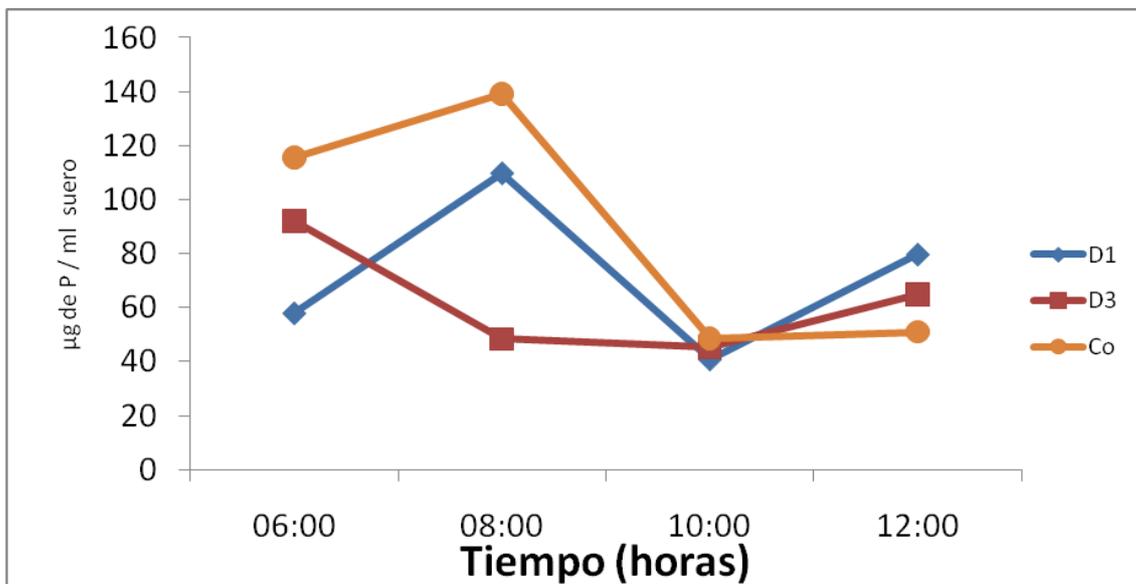


Figura 37. Fósforo en suero sanguíneo de organismos a los 60 días de ser alimentados con distintos tratamientos.

Discusión

Tilapia

El crecimiento de los organismos depende de la calidad del alimento que ingieren, la frecuencia, el estadio de madurez y de las condiciones ambientales. Normalmente, la ventaja de utilizar harina de pescado es que posee una elevada palatabilidad y digestibilidad para los peces (Yousif et al., 1996) lo cual se refleja en crecimientos óptimos para la producción de peces. Las harinas vegetales pueden generar bajos valores de tasa de ingesta (Ti) y como resultado los peces no obtienen suficientes nutrimentos para mantener funciones metabólicas y crecer (Santiago et al., 1988). Sin embargo en este trabajo el crecimiento no se vió reducido significativamente con el uso de harinas vegetales. Esto posiblemente se debe a varios factores como por ejemplo la suplementación con enzimas (proteasa y fitasa), así como probióticos que mejoraron la digestibilidad de nutrimentos. Estos resultados se pueden comparar con los de Hernández-Fores et al. (2012) quienes utilizaron una dieta similar sin complementos y obtuvieron un menor desempeño en comparación con los tratamientos control, por lo cual se puede inferir una mejoría en la asimilación por la adición de suplementos.

En algunas especies de peces el alimento retenido en el estómago se acumula en la región fúndica, en donde entra en contacto con células secretoras de ácido localizadas en la cara ventral de la mucosa, mientras que la tilapia posee la habilidad de pasar el alimento directamente del esófago al píloro y de ahí a los intestinos sin la necesidad de que permanezca mucho tiempo en la región fúndica. Sin embargo en tilapia se ha reportado que este proceso puede ser una desventaja ya que el alimento entrante al intestino no recibe los beneficios de la hidrólisis y mezcla original (Riche et al., 2004). Al suplementar con elementos que favorecen la digestión es posible que se haya superado esta desventaja de los procesos digestivos en tilapia, debido a que no se presentaron diferencias en los parámetros de crecimiento.

Se han reportado valores (Siddiqui et al., 1988) de TCE similares en tilapias con un peso inicial de 0.8 g alimentadas con 40 % de proteína a los obtenidos en este trabajo (tabla 5). De igual manera para TCP los valores son similares a

los reportados por Yousif et al. (1996) que obtuvieron valores en los rangos de 1.54-0.77 utilizando sustituciones de harina de pescado por datil. Los valores en este experimento se pueden deber a el uso de organismos de una talla pequeña y al corto tiempo de experimentación, tomando en cuenta que los peces pueden pasar por un periodo de aclimatación a un nuevo alimento. Mientras el organismo se acostumbra, la tasa de ingestión es reducida y por ende el crecimiento se ve influenciado. Una sugerencia es alimentar a los organismos con los tratamientos días antes de comenzar las pruebas.

Algunos autores como Richter et al. (2003) han expuesto a lapsos de tiempo similares obteniendo valores comparables a los obtenidos en este trabajo al incluir durante 7 semanas hojas de moringa en alimento de tilapia resultando en ganancias en peso dentro de los rangos de 269 -168 %. Otros autores que han trabajado con sustituciones de alimento en tilapia como por ejemplo, Yue y Zhou (2008) quienes utilizaron harina de semilla de algodón obteniendo resultados muy similares en TCA 1.4 a 1.2, aunque sus datos de TCE y TEP superan a los de este trabajo (4.1 a 3.8 y 2.4 a 2.2 respectivamente). Esto se puede deber ala fuente de proteína y posiblemente también a la etapa de desarrollo pues trabajaron con tilapias de un peso inicial de 6.2 g y por un periodo de 8 semanas. La misma explicación puede aplicarse a Olvera-Novoa et al. (1998) quienes alimentaron tilapias con un peso inicial de 0.2 g durante 9 semanas con inclusiones de hasta un 100% de *Spirulina*, obteniendo valores de TCE de 4.7 a 1.2, TCA de 1.03 a 3.64, TCP 2.02 a 0.85. De igual manera Martinez-Palacios et al (1988) alimentaron tilapia mossambica de un peso inicial de 0.37g con sustituciones de hasta 47.22% harina de semilla de *Canavalia ensiformis* obteniendo TCE 3.09 a 2.56, Ti (mg/día) y 27 a 23 mg/día en sustituciones, TCA obtuvo 0.95 en tratamientos control y en las sustituciones 1.55 a 0.96,

Como se pude observar con los trabajos de otros autores, los valores de Ti, TCA y TCP varían considerablemente dependiendo de la etapa en la que se encuentre el organismo al cuál se alimenta, el tiempo de exposicion al alimento y el tipo de alimento.

Para poder evaluar el efecto de los alimentos en algunos parámetros utilizados en inmunología, era necesario la extracción de sangre. Desafortunadamente el tamaño de los organismos no permitió la extracción y análisis de la sangre.

Índice de digestibilidad aparente de la proteína

La digestibilidad se define como la porción consumida de un nutrimento orgánico que es “aparentemente absorbida” por el organismo y que no ha sido extraído en heces (Rodehutschord et al., 2000).

La principal preocupación al utilizar harinas vegetales es la presencia de antinutrientes que bloquean la absorción de minerales y proteínas reduciendo su biodisponibilidad (Azaza et al., 2009). Se ha reportado que de 5-6 g de ácido fítico /kg de dieta puede reducir el crecimiento de trucha arcoíris (Richter et al., 2003). En los resultados referentes a la digestibilidad aparente de las proteínas se observan valores superiores al 90% para los tratamientos con alta concentración de proteína vegetal (Figura 7). Esto se puede deber a la adición de suplementos (proteasa y fitasa) que aumentaron la disponibilidad de las mismas para los organismos favoreciendo su capacidad de digestión. Esto al contrarrestar el efecto de los antinutrientes (como ácido fítico), favoreciendo la digestión con proteasas y adicionar probióticos que liberan enzimas. También influyó en gran medida el bajo pH en el estómago de peces con hábitos herbívoros, el cual permite extraer los nutrimentos de la célula vegetal sin romper la pared celular. Este proceso es muy sencillo y rápido para la tilapia considerando que su estómago tiene el menor valor de pH entre los peces, con valores cercanos a 1 (Olvera Novoa et al., 1998). Otros autores realizaron pruebas de digestibilidad de harinas vegetales en peces obteniendo valores menores a los obtenidos en este experimento. Cabe destacar que no se observó una combinación de suplementos que favoreciera la digestión o el crecimiento, con lo cual en el periodo de tiempo de alimentación es posible utilizar alguna de estas combinaciones. Yue y Zhou (2008) sustituyeron harina de pescado por harina de semilla de algodón obteniendo valores de 92 % en su tratamiento control y 83 % con las sustituciones; de igual manera Azaza et al. (2009) reportan valores de digestibilidad de proteína en los rangos de 89.8 - 81.4 % en tilapia utilizando harina de *Vicia faba* (haba) como sustituto de harina

de pescado. Martínez-Palacios et al. (1988) utilizaron semilla de *Canavalia ensiformis* para alimentar tilapia y obtuvieron en su tratamiento control un valor más bajo (85%) que en sus tratamientos con sustituciones (93-91%). Olvera et al. (1988) alimentaron tilapias durante 58 días con sustituciones con harina de semilla de *Sesbania* y obtuvo la misma tendencia que el autor anterior, pues los organismos alimentados con el tratamiento control mostraron un valor de digestibilidad menor (88%) que los tratamientos con sustituciones (91- 83), aunque no con todos los tratamientos.

Oxígeno consumido

Diversas son las razones por las cuales puede incrementarse el consumo de oxígeno en organismos. Por ejemplo, en trucha arcoíris se ha reportado un incremento en la producción de O_2^- de leucocitos en la parte anterior del riñón (Panigrahi et al., 2005) que corresponde con una suplementación de levadura hasta por 20 días en comparación con tratamientos control. Aunque se suplementaron dietas con levadura, este aumento en el consumo de oxígeno no se observó en los resultados de este trabajo. También se ha reportado que un incremento en el consumo de oxígeno puede deberse a el costo metabólico de la digestión y la asimilación de los nutrientes de los alimentos (Acción dinámica específica) (McDaniel et al., 2005; Sánchez-Ávila, 2012). Esto pues la mitocondria produce aproximadamente el 90% de la energía en células animales. La eficiencia de la alimentación y la función mitocondrial están ligada por el concepto de energía de alocación por lo que se ha comprobado la relación entre la eficiencia de la alimentación, crecimiento y respiración (función mitocondrial) (Eya et al. 2011).

En la figura 8 se observa que no hubo diferencias significativas en el oxígeno consumido por organismos alimentados con los distintos tratamientos. Esto indica que los organismos con cualquiera de los tratamientos no presentan dificultades en el proceso digestivo, por lo que su utilización no representa: A) Un costo energético extra que perjudicara el crecimiento, B) un consumo extra de oxígeno que pudiese afectar en cultivos con altas densidades.

Nitrógeno excretado

Existe una relación directa entre la cantidad de nitrógeno excretado y la cantidad de proteína cruda presente en el alimento (Davidson et al. 2013) y en general el nitrógeno disuelto excretado corresponde del 50-60% del total del nitrógeno ingerido (Cho & Bureau, 1997). Por tanto, elevados niveles de amoníaco / amonio son el resultado de incrementar la cantidad de proteína en la dieta, sin embargo la fuente de proteína no tiene un efecto significativo sobre la producción de amonio (Brunty et al., 1997). Wright (1993) reporta que los peces excretan del 60-95% del nitrógeno de la dieta en forma de amonio y que por cada kilogramo de alimento consumido producirán 19.5 g de $\text{NH}_3\text{-N}$ y posiblemente hasta 300 g de $\text{NH}_4\text{-N}$.

Debido a que en este trabajo se formularon las dietas para que fueran isoprotéicas, los niveles de nitrógeno al medio no se redujeron a causa de los diferentes tratamientos. Parte de la importancia de conocer la cantidad de nutrimentos que se adicionan al agua por peces radica en la posibilidad de diseñar eficientemente sistemas de reutilización de agua. Los niveles totales de nitrógeno amoniacal pueden ser un factor limitante para el reuso del agua, debido a que en niveles elevados puede reducir la vitalidad de los peces y/o el crecimiento o en casos extremos causar la muerte. El conocimiento de la excreción de nitrógeno al medio permitirá minimizar desechos de proteína, reducir costos y producción de amonio (Brunty et al., 1997) reflejándose en un beneficio económico (productor) y un menor aporte al deterioro de la calidad ambiental. Las descargas de nitrógeno también afectan a los cultivos intensivos de peces, pues el agua que se utiliza generalmente no pasa por procesos de filtración y seguramente ha recorrido por varias granjas, acumulando nutrimentos (como N) cada vez que circula por una granja pues la acuicultura por si misma es dependiente de la buena calidad del agua (Cho y Bureau, 1997).

Una preocupación con harinas provenientes de organismos unicelulares es la alta concentración de ácidos nucleicos, (de 5-12% en levaduras y 8-16% en bacterias). En levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) el nitrógeno del ácido nucleico está presente principalmente en forma de RNA y representa aproximadamente del 20-25% del nitrógeno. En humanos y la mayoría de los animales monogástricos, un exceso en ácidos nucleicos en la dieta resulta

tóxico, debido a que la capacidad de excretar ácido úrico es limitada, llevando a la deposición de ácido úrico en el cuerpo y a posibles desórdenes metabólicos. Sin embargo, no se ha encontrado dicho efecto en peces debido a su hígado altamente activo (Oliva-Teles y Gonçalves, 2001), como tampoco se encontró un aumento en la excreción de nitrógeno amoniacal.

P en agua y heces

Se ha reportado que la digestibilidad del fósforo y su retención es mayor en peces alimentados con dietas de proteína de plantas en comparación con dietas a base de harina de pescado (Davidson et al. 2013).

Aunque los valores de fósforo excretado por branquias y orina en el caso de los alimentos con harinas vegetales son ligeramente menores en comparación al que contiene harina de pescado la reducción no resultó estadísticamente significativa (figura 10). Esto en parte coincide con la literatura, pues atribuyen una disminución en las emisiones al uso de harinas vegetales, que contienen menos fósforo que las animales (Sarker et al., 2011). Sin embargo la tabla 1 indica que los alimentos con proteína vegetal contienen cantidades similares de fósforo. Esto implica que si bien los alimentos contienen cantidades similares de P, la disponibilidad y asimilación del mismo difieren causando una mayor proporción de P no asimilado y presente en las heces de los organismos alimentados con la dieta control (Fig. 11).

En particular, el uso de fitasa + proteasa (D1) no reduce significativamente el P en heces, a diferencia de cuando se adiciona levadura. Al parecer la levadura + proteasa tienen un mejor efecto para aumentar la asimilación de P como se observa en el D4, que la fitasa + proteasa (D1). Los resultados indican que la levadura por sí misma, o suplementada con fitasa logra incrementar la asimilación del P en trucha arcoíris que es alimentada con harinas vegetales.

Otro factor que favorece la reducción en emisiones en tilapia a diferencia de otros peces, es que la tilapia posee un sistema digestivo adecuado para digerir la materia vegetal. Los resultados en cuanto a fósforo en tilapia indican que una combinación adecuada de fuentes de proteína alternativas (suplementadas) a la harina de pescado son una opción para reducir la dependencia de harina de pescado como fuente principal de proteína, pero

también disminuir emisiones de fósforo al medio sin influenciar negativamente el crecimiento de los organismos (Sato et al., 2003).

Lípidos y proteína en los organismos

Un incremento en la cantidad de lípidos de la dieta tiene un efecto marcado sobre la proteína en el alimento pues se ha demostrado que incrementar la cantidad de lípidos reduce cuantitativamente la necesidad de harina de pescado necesaria para generar crecimiento satisfactorio en trucha arcoíris (Reinitz. y Hitzel, 1980) además de aumentar el contenido de lípidos en los organismos. La cantidad de lípidos presentes en intestino de los organismos aumentó en peces alimentados con tratamientos que contienen altas concentraciones de harina vegetal, aunque solamente de manera significativa para los tratamientos D2 y D3 (Figura 12). Esto podría deberse a la interacción fitasa-levadura, pues solo en dietas donde se encontraba esta combinación el incremento fue significativo. Probablemente la presencia de estos 2 suplementos en combinación favorezca la asimilación de lípidos en tilapia. Eya et al. (2011) reportan que para adultos de trucha arcoíris alimentados con alimento comercial durante 16 semanas, el porcentaje de lípidos en vísceras es de 10-11 %, que son valores similares a los porcentajes obtenidos en este trabajo. Por otro lado, Reinitz y Hitzel (1980) encontraron una relación inversa entre la cantidad de lípidos presentes en el alimento y los porcentajes de humedad y lípidos totales en trucha arcoíris. Aunque en este trabajo se presentó un incremento en comparación con organismos alimentados con tratamiento Co, el incremento no es elevado cuando se compara con lo reportado por la literatura. Generalmente los altos niveles de lípidos en la composición de los organismos se asocian con decrementos en la calidad de la salud aunque pudiese resultar favorable aumentar la cantidad de lípidos en el momento de transición del criadero a instalaciones de producción.

Se presentó un incremento en la cantidad de proteína de intestino en organismos alimentados con dietas que contenían levadura como suplemento (figura 13) y aumentó significativamente en organismos del tratamiento D4. Esto se debe probablemente a que la levadura funciona como probiótico que se adhiere a la pared del intestino (Sánchez-Ávila, 2012), posiblemente el uso de levadura aumento la cantidad de flora intestinal en los organismos lo cual se vería reflejado en un incremento en la cantidad de proteína presente en comparacion a el tratamiento Co.

Existe una relación directa sobre la cantidad de lípidos y cenizas presentes en los organismos con respecto al tipo de harina y tratamiento con el cual son alimentados los organismos (Olvera et al., 1988). En general, se ha reportado en tilapia valores de proteína en muestra húmeda de músculo en el rango de 16.1-12.4% (Martinez-Palacios et al. 1988; Yousif et al., 1996; Azaza et al., 2009), equivalente aproximadamente a 60-46% en materia seca. Estos valores resultaron más elevados que los encontrados en este trabajo. Reinitz y Hitzel (1980) reportan que en trucha arcoíris la retención de proteína en músculo no difiere significativamente por los niveles de proteína digestible e índice de energía en la dieta.

Por los resultados obtenidos en crecimiento y excreción de N y P, es posible asegurar que en el caso de tilapia los alimentos que generan el mejor crecimiento, reducen las descargas de fósforo al medio y no afectan la supervivencia son los tratamientos D1 y D3. Aunque se sugiere atender recomendaciones como: un tiempo más prolongado de exposición a los alimentos con el objetivo de observar los efectos más detalladamente sobre exposiciones prolongadas. El experimentar por más tiempo y obtener organismos de mayor talla ayudaría a extraer sangre y realizar pruebas sobre parámetros inmunológicos. De esta manera obtener una visión más integral sobre los efectos de las sustituciones de harina animal por vegetal.

Trucha en granja Amanalco

La falta de diferencias en crecimiento que se registró durante el primer experimento se debe posiblemente a una mayor resistencia o capacidad para digerir y asimilar el alimento de los peces en etapas tempranas en comparación con organismos de mayor edad. Esto podría explicar porque organismos de mayor talla (E2) presentan una reducción significativa en los valores de GP y TCE (figura 16 y tabla 6) en tratamientos con harinas vegetales en comparación con alimento Co. Al parecer el utilizar altas concentraciones de sustitución en el alimento y por un lapso de tiempo prolongado afecta el crecimiento de los organismos. Lo publicado por Francesco et al. (2004) concuerda con los resultados de este experimento pues reportó una reducción significativa en crecimiento a los 120 días de organismos alimentados con una sustitución a base de harinas vegetales en comparación con el alimento a base de harina de pescado. Otros autores (Refstie et al., 1997) han encontrado que cuando se reemplaza 40 % o más de proteína proveniente de harina de pescado por proteína de harina de soya en dietas para trucha arcoíris, el crecimiento se reduce comúnmente por la presencia de antinutrientes. Por otra parte, (Burrels et al., 1999) reportaron que al alimentar a truchas arcoíris durante 7 semanas con altas concentraciones de soya (80 %) la ganancia en peso, tasa de crecimiento específico se reducen significativamente ($p < 0.001$); la TCE con alimento comercial es de 3.8 % y con soya 2.7.

En los parámetros de tasa de ingestión, tasa de conversión del alimento y tasa de conversión de la proteína se muestra la misma tendencia que en GP y TCE. En E1 no se muestran diferencias y en E2 el tratamiento Co supera al tratamiento D1 (Tabla 6). Es importante mencionar que el crecimiento depende en gran medida de cantidad y calidad de alimento que un organismo consume, siendo la palatabilidad uno de los factores que influyen la ingestión. La harina de pescado contiene un alto grado de palatabilidad para la mayoría de los peces, que se ve disminuida al sustituirla por harina de soya en alimento para trucha. Adicionalmente, las harinas de soya que no han sido extraídas con alcohol, comúnmente presentan un sabor amargo que ha sido reportado por provocar respuestas en trucha arcoíris cuando se mide electrofisiológicamente

(Refstie et al., 1997). La falta de sabores en alimentos han demostrado reducir la tasa de ingestión cuando se utilizan como alimentos para salmónidos. Por ello, parte de la reducción en el crecimiento puede explicarse parcialmente por la baja palatabilidad de la harina de soya, causada por una falta de sabor o un sabor diferente al de la harina de pescado. Se ha demostrado que una adaptación a sustituciones de 60 % de sustitución de harina de pescado por harina de soya en trucha arcoíris se logra después de 2 meses de alimentación (Refstie et al., 1997). Sin embargo Dabrowski et al. (1989) demostró que con sustituciones del 100 % de harina de pescado por harina de soya de truchas arcoíris durante 177 días se reduce la ganancia en peso (peso inicial de 1 g) en un 18 % en comparación con organismos alimentados con alimento comercial. Murai et al. (1989) concluyeron que cuando se presentan diferencias en la utilización de proteína de soya pueden atribuirse a el tamaño del organismo, pues truchas arcoíris mayores a 10 g están “mejor adaptadas gastrointestinalmente” a la digestión de proteína de soya, sin embargo esto no coincide con lo observado en el experimento ya que las diferencias en el crecimiento entre los organismos de distintos tratamientos se observaron en organismos mayores a 10 g. Heikkinen et al. (2006) observaron tasas de crecimiento similares con 80 % de sustitución en comparación con alimento comercial. Esto contradice la hipótesis de que al sustituir harina de pescado por harina de soya en alimentos se reduce el crecimiento de trucha arcoíris, aunque estos autores reportan que los cambios típicos histológicos en la parte distal del intestino se volvieron aparentes hasta después de alimentar 18 semanas con harina de soya. Las vacuolas de absorción de células epiteliales en los pliegues simples de la mucosa se arreglaron en forma redondeada e irregular donde se sustituyó 45 % de harina de pescado. Altas concentraciones de harina vegetal en la dieta de organismos acuáticos han demostrado una condición patológica conocida como enteritis sub-aguda no-infecciosa en la parte distal de los intestinos como una consecuencia directa de alimentar con harina de soya, con glicinina y b-conglicinina como posibles alérgenos responsables por la inflamación provocada (Braverfjord and Krogdahl, 1996).

En salmónidos la digestibilidad de la proteína y la disponibilidad de los aminoácidos se reducen por la presencia en altas concentraciones de actividad de inhibidores de la tripsina. En trucha arcoíris uno de los mecanismos para contrarrestar los efectos de inhibidores de la tripsina es el aumento de la secreción de proteasas (Kaushik et al., 1995), aunque debido a sus hábitos carnívoros la digestibilidad de proteínas vegetales es menor que las animales (Drew et al., 2005).

Por todo esto, se cree que las harinas de soya contengan una cantidad de antinutrientes, de alguna manera pueden llegar a afectar el crecimiento de trucha arcoíris después de una exposición prolongada (120 días o más) como se observa en los resultados (Tabla 6, figura 16 y 18). Es necesario desarrollar pruebas que permitan observar específicamente en qué momento y qué es lo que se ve afectado en los organismos.

El factor de condición sirve para poder conocer el estado en el cual se encuentra un organismo. Por lo general, en el caso de los salmónidos, el factor de condición de un organismo en buenas condiciones se encuentra dentro del rango 1.2-1.4 (Barnham y Baxter, 2003). En este trabajo los organismos en E1 obtuvieron un valor cercano a 1.2 y en E2 a 1.4 (figura 19 y figura 20) por lo que se considera que los organismos no muestran signos en su complexión de características de la desnutrición. Francesco et al (2004) reportaron un valor similar de 1.2 para truchas alimentadas con mezclas de harinas vegetales durante 157 días. El factor de condición se complementa con los datos de ganancia en peso, pues de esta manera se puede reconocer organismos bien alimentados y sanos; así como deficiencias en crecimiento que corresponderían a problemas como desnutrición, anemia y sobrepeso.

Nitrógeno y Fósforo excretado

Los niveles de nitrógeno excretado por los organismos dependen enteramente de la cantidad de proteína presente en el alimento, sin importar la fuente de la cual provenga (Brunty et al., 1997, Davidson et al., 2013). Es por ello que no se observaron diferencias en el tiempo con este parámetro durante el experimento (Figura 21), pues las dietas estaban formuladas isoprotéicamente. Estos resultados no coinciden con lo reportado por Oliva-Teles et al. (2006), que

concluyeron que la excreción de amonio incrementa con la inclusión en la dieta de levadura. La disminución en el nitrógeno puede ayudar a la disminución en los procesos de eutroficación, sin embargo en estudios recientes se ha concluido que para mitigar la eutroficación en aguas continentales el fósforo es el que debe ser reducido (Wang y Wang, 2009). El fósforo proveniente de las truchas presente en el agua es principalmente excretado en forma sólida vía heces, o disuelto vía orina (Lellis et al., 2004). De los resultados obtenidos se puede observar en el caso de la trucha arcoíris, el fósforo soluble en el agua disminuyó en comparación con Co (Figura 22) hasta casi el final del experimento. El ligero incremento en el P registrado en el agua se relaciona con el decremento de la cantidad de P presente en suero sanguíneo y se observa al final de E2. Esto es una muestra de que la exposición prolongada a fuentes de proteína vegetales en trucha, reduce la asimilación de P y aumenta su excreción. Aunque queda por esclarecer cuáles son los mecanismos específicos responsables de esto.

Por otra parte el abrupto descenso en los valores puede deberse al aumento en la cantidad de agua debido a la temporada de lluvias, pues aumentaba el flujo de agua al sistema y con ello la rapidez del intercambio de agua en los estanques era mayor. Inclusive una alteración en los datos por parte de los organismos pues Sarker et al. (2011) reporta que el fósforo soluble en agua puede ser absorbido directamente por organismos resultando afectado el valor real emitido. Adicionalmente se plantea el hecho de no haber tomado en cuenta la actividad microbiana sobre la concentración de fosfatos solubles en agua.

P en heces

El fósforo fecal es principalmente fósforo no digerido, como tejidos duros de las harinas o fósforo con fitato (Lellis et al., 2004). El fósforo en heces se redujo significativamente en organismos alimentados con mezclas de harinas vegetales (figura 23). Esto podría deberse a que en teoría las harinas vegetales contienen menos fósforo que la harina de pescado (Sarker et al., 2011). Otro factor importante fue el aumento de la disponibilidad de fósforo en los alimentos vegetales marcada debido a la adición de fitasa en las dietas.

También se ha descrito que la levadura es capaz de producir fitasa que beneficia al organismo. Los resultados son altamente favorables pues se reduce aproximadamente en un 83 % la cantidad presente en heces, que se traduce en aproximadamente 20 g de P / ton / día. Sin embargo, parte de la literatura no coincide con estos resultados pues autores como Riche y Brown (1996) reportan que la adición de fitasa en alimentos puede incrementar la cantidad de fósforo presente en heces. Estos resultados son importantes pues al igual que en el caso de la tilapia, se observa una reducción en la excreción de fósforo por heces aun cuando la trucha posee hábitos alimenticios más restringidos que la tilapia.

Proteína en músculo

La proteína en músculo se puede ver influenciada por el estado del organismo. Generalmente organismos que se encuentran con deficiencias recurren a las reservas de proteína para compensar grados de desnutrición. En este trabajo los valores de proteína en músculo (Figura 24) son un poco mayores a los reportados por Sánchez-Ávila (2012), quien reporta valores dentro del rango de 12 a 19% en truchas después de 60 días de alimentación. Al parecer la mezcla de proteína utilizada en este trabajo no influyó significativamente el porcentaje de proteína presente en músculo. Esto puede deberse a lo que reportan Reinitz y Hitzel (1980) quienes observaron en trucha arcoíris que la retención de proteína en músculo no difiere significativamente por los niveles de proteína digestible e índice de energía en la dieta.

Lisoenzima

La lisoenzima es parte de el sistema inmune no específico (Fevolden et al., 2002; Røed et al., 2002). Es una enzima lítica que se encuentra involucrada en la defensa en contra de virus, neoplasma, bacterias y posiblemente hongos (Alexander e Ingram, 1992) (ver anexo 1). En este estudio en E1 se presentó un ligero incremento en la actividad lisoenzimática en los organismos alimentados con harinas vegetales en comparación con Co, sin embargo en E2 la actividad fue similar (Figura 25 y figura 26). Los niveles de actividad han mostrado variar de acuerdo a la temporada, nivel de madurez sexual, sexo, estimulación

antigénica y transporte, que resulta en un incremento en la concentración. En este último caso los niveles se correlacionan con el grado de estrés (Alexander e Ingram 1992; Røed et al., 2002) y esto influye directamente sobre el crecimiento, reproducción, respuesta inmune y calidad de la carne en los organismos. Se reporta que una exposición a estrés agudo causa un incremento en la actividad de la lisoenzima, mientras que una exposición prologada tiene un efecto negativo (Fevolden et al., 2002). Esto podría explicar en parte el incremento en actividad de lisoenzima en E1, pues organismos más pequeños son más propensos al estrés de la manipulación en una granja. De hecho, Fevolden et al. (1993) sugieren que bajo ciertas circunstancias, la actividad de la lisoenzima es un indicador más estable que el cortisol sobre el nivel de estrés en peces, basándose en la observación de organismos con alto estrés dónde se observaron elevados niveles de lisoenzima y bajos de cortisol. Sumado al estrés por manejo, el incremento en E1 de los tratamientos con harinas vegetales se puede deber a una respuesta por parte de los mecanismos de defensa del organismo ante un alimento nuevo o a los factores antinutricionales presentes en harinas vegetales. Pues se ha comprobado que el organismo reconoce ciertos componentes en la harina de soya como alérgenos (Braverfjord y Krogdahl, 1996). Se sugiere que un incremento en la actividad de la lisoenzima, como se observa en este trabajo, es una compensación adaptativa desasociada del cortisol que tendería a fortalecer la resistencia innata como respuesta ante un alimento diferente. Lo que podría explicar los elevados niveles de lisoenzima en E1 (figura 28) pues la trucha es un organismo carnívoro que al ingerir alimentos vegetales pudo desencadenar una respuesta inmune y el hecho que en E2 no se observaron diferencias importantes indicaría que el organismo ya reconoce el nuevo alimento. Después de 20 minutos, en E1 se presenta un ligero incremento que supera a los demás tratamientos. El incremento en la actividad lisoenzimática se puede deber a una estimulación por probióticos (Panigrahi et al., 2005), D3 contiene levadura y este incremento puede deberse a los glucanos con enlaces β -1,3 y β -1,6 que son la principal estructura en la pared celular de levaduras y micelas. Se ha demostrado que estos polisacáridos son poderosos activadores de mecanismos de respuesta inmune no específica en peces (Engstad et al.,

1992) por lo que se cree que la levadura pudo tener un efecto sobre la actividad lisoenzimática. La diferencia en la actividad de la lisoenzima de organismos más pequeños (E1) en comparación con organismos mayores (E2) puede deberse a que los organismos pequeños necesitan una mayor respuesta por parte del sistema inmune que cuando son de tallas mayores. Grinde et al. (1988) mencionan que un incremento en la actividad lisoenzimática es beneficioso, pues bajo condiciones de cultivo se manejan altas densidades de peces, que pueden provocar un incremento en el estrés y carga bacteriana, con lo cual las bacterias oportunistas pueden producir enfermedades.

Proteína en suero sanguíneo

En el experimento E1 la cantidad de proteína en suero sanguíneo fue ligeramente aunque no significativamente mayor en organismos alimentados con harina de pescado (Figura 27), mientras que en E2 no se observaron diferencias entre tratamientos (Figura 28). Esto no concuerda con lo reportado por Rumsey et al. (1994) quien menciona que la concentración total de proteína en plasma de peces alimentados con dietas que contienen harina de soya generalmente muestra un valor más elevado comparado con organismos alimentados con alimentos a base de harina de pescado. Los resultados obtenidos en E1 son ligeramente inferiores a los reportados por Řehulka (2000), quien obtuvo porcentajes de 4.8 a 3.3 % de proteína en suero sanguíneo, cabe destacar que esta diferencia pudo deberse a que trabajó con truchas de un peso inicial de 178 g. En otros estudios se ha observado un incremento en la inmunoglobulina (una proteína) presente en el plasma y se cree que tienen relación con que las macromoléculas de las proteínas presentes en soya cruzaron la barrera del intestino, creando un efecto de hipersensibilidad similar al previamente demostrado en pollos y cerdos. Es importante señalar que en el suero se encuentran varios componentes con diversas funciones como hidrolasas y lisoenzimas, complementos lectinas e inmunoglobulinas, (Alexander e Ingram, 1992), pese a que no se presentó un incremento en la proteína en suero sanguíneo con dietas con harinas vegetales. Las lectinas e inmunoglobulinas se encargan de respuestas inmunes como la fosfatasa alcalina es una enzima lisosomal que se ha

sugerido posee un rol en el pez durante las primeras etapas de la curación de heridas. Se ha sugerido que los elevados niveles de fosfatasa en células de mucosa, son debido a condiciones de vida estresantes en los organismos (Fast et al., 2002). Al no haber una reducción en los niveles de proteína, es un indicador de un nivel adecuado de componentes protéicos (enzimas) circulando por el organismos, el cual puede favorecer a la buena salud del organismo.

Fósforo en suero sanguíneo.

Cuando los peces son alimentados con fósforo que excede sus requerimientos, los niveles de fósforo en suero sanguíneo pueden no responder a las concentraciones presentes en la dieta. Se ha sugerido que los niveles de fosfatos en sangre tienden a reflejar ingestión reciente más que el estado de fósforo con el que el pez cuenta, adicionalmente, existe la falta de una respuesta consistente a las concentraciones de fósforo en suero sanguíneo por ingestión de dieta. Sin embargo, se ha demostrado que fluctuaciones en estos niveles se deben a un amplio rango de factores como la temperatura, salinidad y estado de salud. Todos estos factores hacen difícil de establecer un “valor rango” para deficiencias en niveles de fósforo en trucha arcoíris (Skonberg et al., 1997). Por ello la importancia de realizar pruebas con tratamientos control para obtener valores específicos para la zona y las condiciones en donde se trabaja. Skonberg et al. (1997) obtuvieron valores de fósforo en plasma de trucha arcoíris que van de 433 – 697 $\mu\text{g} / \text{g}$ en base húmeda alimentando organismos con un peso inicial de 1.8 g dos veces por día durante 8 semanas únicamente modificando el porcentaje de fósforo. Éstos valores son muy similares a los obtenidos en este experimento en E1 (figura 29); Por otro lado los valores reportados por Richie y Brown (1996) son inferiores y mas parecidos a E2 (figura 30) pues son del rango de 20.4 – 27.8 mg / dl en truchas de un peso inicial de 4 a 7 g con diferentes fuentes de proteína vegetal y animal.

Con los resultados obtenidos es posible tener una noción sobre el grado de asimilación de fósforo en suero sanguíneo bajo las condiciones en las que se

trabajó el experimento. No se observaron deficiencias en E1 (Figura 29), sin embargo en E2, hay una disminución en los valores de E1 en comparación con el tratamiento Co. No se pueden hablar de signos de deficiencias pues es bien sabido que en salmónidos el requerimiento máximo para deposición de fósforo es más elevado que los requerimientos de fósforo para crecimiento; así también las deformidades (deformidades vertebrales) aparecen mucho antes que cualquier reducción en el crecimiento sea evidente (Sarker et al., 2011). Si los organismos no sufren deficiencias graves y prolongadas no debe preocupar al productor de trucha pues Lellis et al. (2004) reporta que no se presentan alteraciones en la calidad del producto (procesado, almacenamiento y composición proximal de los filetes) cuando se varía la cantidad de fósforo. El fósforo en trucha arcoíris es almacenado en el tejido óseo y escamas, cuando existen deficiencias los peces pueden utilizar estas reservas para satisfacer necesidades de fósforo. Sin embargo es interesante señalar que debido a la diferencia presente en E2 de los valores, posiblemente los organismos tengan una mayor dificultad para asimilar el fósforo en etapas avanzadas de crecimiento o periodos largos de alimentación (mayores a 75 días). Lo interesante se observa cuando se compara con los valores de la figura 22, donde se encontró un incremento de la cantidad de P excretado al medio por los organismos con D1. Esto significa que los organismos en exposiciones prolongadas (<150 días) comienzan a tener dificultades para aprovechar el P de fuentes vegetales. Por ello se recomienda la utilización de “fases de alimentación” (Alimentar una temporada con alimentos bajos en fósforo y una temporada con alimentos con alto fósforo) dependiendo del estado de desarrollo de los organismos. Esto como una estrategia para reducir las emisiones de fósforo sin generar deficiencias por exposiciones prolongadas (Lellis et al., 2004).

Macrófagos.

Los macrófagos están presentes en todos los compartimentos del cuerpo y constituyen las primeras células fagocíticas con las que un microorganismo se encuentra cuando entra en el cuerpo (Ryckaert et al., 2010)(ver anexo 2).

Jang et al. (1994) y Novoa et al. (1996) concluyen que es posible modular positiva y negativamente la actividad de macrófagos en peces por moléculas exógenas. En este experimento en E1 se observó un incremento (no significativo) en la actividad de los macrófagos (figura 31). Se ha reportado que macrófagos activados en trucha arcoíris presentan un elevado índice fagocítico (Hardie et al., 1996), que indica que los leucocitos tienen un elevado potencial para participar en una respuesta inmune o combatir estrés inflamatorio (Rumsey et al., 1994). Por otro lado en E2 la actividad disminuyó con D1 aunque no de manera significativa. Estos resultados no concuerdan con lo reportado por Burrels et al., (1999) quienes afirman que la inclusión de soya en concentraciones de 80% en alimentos para trucha arcoíris durante 7 semanas, reduce significativamente ($p < 0.001$) la capacidad inmune no específica (actividad de los macrófagos) comparada con truchas alimentadas con alimentos con base de harina de pescado.

La harina de soya causa cambios morfológicos y de función en salmónidos en la parte distal del epitelio, que incluyen un estrechamiento en los pliegues de la mucosa, vacuolización anormal, pérdida de integridad en la mucosa, ensanchamiento del estroma central e infiltración de células inflamatorias en la lámina propia. Estudios inmunohistoquímicos han demostrado debido a la harina de soya un incremento en el número de macrófagos y granulocitos neutrofílicos, así como una respuesta inflamatoria en la región distal del intestino epitelial. Los cambios funcionales inducidos por la ingestión de harina de soya incluyen enteritis, un incremento en la susceptibilidad a enfermedades bacterianas en peces y desórdenes digestivos tales como diarrea osmótica y una reducida capacidad para la absorción de nutrientes (Heikkinen et al., 2006). Por estas razones se recomienda prestar atención a la harina de soya que se utiliza para evitar incluir factores que modulen negativamente la actividad de los macrófagos.

Un incremento en la actividad de los macrófagos E1 con el tratamiento D3 se puede deber a que es el tratamiento con la mayor actividad lisoenzimática, debido a que la lisoenzima ha demostrado tener promover la fagocitosis (Engstad et al., 1992).

Mucosa

En los peces, la mucosa que cubre la superficie epidermal es la primera línea de defensa en contra de patógenos debido a que son los primeros lugares de interacción entre el hospedero y el posible patógeno. Las escamas y células queratinizadas de la epidermis ofrecen una barrera mecánica; en el caso de organismos donde las escamas son reducidas (como la trucha) se produce una copiosa cantidad de sustancia mucosa (Alexander e Ingram, 1992). El moco que recubre la piel es un importante mecanismo defensivo, pues contiene una variedad de compuestos antimicrobianos y probablemente antiparasíticos: lisoenzimas y proteasas (Panigrahi et al., 2005), factores del complemento, proteína reactiva C, lectinas, interferones, eicosanoides, transferrina, péptidos como piscidinas, somatostatina y ACTH, y diversos carbohidratos (Rubio-Godoy, 2010). Las glicoproteínas le confiere las propiedades viscosas similares al gel (Handy, 1989). Adicionalmente en trucha arcoíris se ha observado lisoenzima en tejidos ricos en leucocitos y en sitios donde el riesgo de infección bacteriana son muy altos, tales como en la capa de mucosa epidermal y en las agallas. La composición orgánica consiste de aproximadamente 95% de agua y como mayor componente glicoproteínas (Handy, 1989). La cantidad de proteína en moco es importante pues es un indicador indirecto de la cantidad de enzimas presentes en zonas de contacto con el medio, los organismos en el tratamiento Co tuvieron mayores valores en comparación con D1 (figura 33). Proteasas aisladas de moco en trucha arcoíris han demostrado tener actividad en contra de bacterias gran negativas (Fast et al., 2002). En comparación con salmón del atlántico y coho, la trucha arcoíris muestra una mayor actividad lisoenzimática, sin embargo en salmón y coho esto se atribuye a que esta enzima juega un rol menos importante como parte de la respuesta inmune ante una infección bacteriana.

La ventaja obtenida de una exposición más prolongada a los alimentos que en el trabajo con tilapia es que se pudo observar mejor los efectos que tienen sobre los organismos. Lo interesante de comparar ambas especies es que entre tilapia y E1 en trucha no se observan diferencias en el crecimiento aun teniendo en cuenta las diferencias en hábitos alimenticios. El hecho que hayan podido asimilar las proteínas vegetales puede deberse a la correcta suplementación de los alimentos, aunque el tipo de suplemento no pareció

influir significativamente los resultados a corto plazo (menos de 60 días). Sin embargo sería prudente el lograr ciclos completos de alimentación para tilapia y profundizar en los efectos a largo plazo. En trucha se recomienda intentar averiguar lo que sucede con exposiciones largas a alimentos, ya sean para encontrar problemas en intestino, hígado o deficiencias en producción de proteínas.

Trucha en Laboratorio

El crecimiento en los organismos no se redujo de manera significativa entre tratamientos (tabla 7). Esto se puede deber a que en etapas tempranas no se observa un aumento de peso importante, como se observa en organismos de mayor talla. La TCE es mayor en organismos alimentados con Co. Diversos factores pueden influir estos valores como la palatabilidad y la adaptación de los organismos a una nueva fuente de proteína. El factor de condición muestra que los organismos no se encuentran en estado de desnutrición en todos los tratamientos.

Fósforo excretado por orina y branquias, proteína y fósforo en suero sanguíneo.

Los datos de excreción de fósforo recabados en el laboratorio permiten tener una aproximación de cuándo es que los peces excretan la mayor cantidad de fósforo. Se puede observar que la mayor cantidad es excretada de 2 a 4 horas después de ser alimentados. Con estos datos es posible desarrollar mejores experimentos enfocados en la determinación de la máxima excreción de fósforo en peces alimentados con harinas vegetales. A los 60 días se observa con mayor claridad los picos de excreción a las 4 horas de alimentación (figura 35). El fósforo excretado en forma soluble es aproximadamente un 40 % del total ingerido (McDaniel et al., 2005), y junto con el presente en heces suman un 80%, por lo cual es importante determinar los picos de excreción de dicho elemento.

La proteína en suero sanguíneo (figura 36) tiene un comportamiento esperado de un nutrimento que es consumido, llevado por torrente sanguíneo y asimilado por un organismo. Es la tendencia a aumentar y descender con relación al tiempo lo que indica que las proteínas de origen vegetal de las dietas propuestas son asimiladas por trucha arcoíris de manera similar que proteínas de origen animal.

El fósforo en suero sanguíneo tiende a disminuir en relación al tiempo en tratamiento Co, no así con D1 y D3 (figura 37). Esto puede significar que las harinas vegetales y en especial cuando son suplementadas con levadura, producen un efecto que retrasa la asimilación inmediatamente del fósforo en

trucha arcoíris y que permite que se encuentre presente por más tiempo en el torrente sanguíneo durante el día.

El uso de harinas vegetales implica una reducción en los costos de producción de alimento, pues de acuerdo al banco mundial (Indexmundi, 2012), la harina de pescado es 67.9% más cara que la harina de soya comercial.

Un posible inconveniente económico en la elaboración de los tratamientos de este trabajo es el uso de polvo de *Spirulina*, pues es un componente cuyo precio es aun elevado en el mercado. Aún con esto, de acuerdo a el cálculo realizado el 14 de junio 2012, al utilizar harinas vegetales se reduce en un 9.6% el costo de las fuentes de proteína en alimentos (Tabla 8).

Aunque también es prudente considerar que el polvo de *Spirulina* es un ingrediente que es cultivado para el consumo humano. Para que pueda ser utilizado como reemplazo parcial de harina de pescado en alimentos es necesario que su precio baje debido a cualquier factor (e.g. mejoras en la producción) para procurar una producción en gran escala, de lo contrario resultaría complicado utilizarla como fuente de proteína en alimentos para peces.

Tabla 8. Estimación de los costos de fuentes de proteína en alimentos vegetales y con harina de pescado.

	Precio harina kg (\$ mexicanos)	deCantidad porharina utilizada alimentos (g)	Precio por kg alimento elaborado (\$ pesos mexicanos)	Pesos/kg alimento	Diferencia %
Harina de pescado	20.7	600	12.4	12.4	
Harina de soya	6.26	450	2.8	11.2	9.6
Polvo <i>Spirulina</i>	56	150	8.4		

Conclusiones

- En tilapia es posible la sustitución de harina de pescado por harina de soja en alimentos para acuicultura con harina de soja y polvo de *Spirulina* adicionado con levadura y fitasa (D3) sin reducir significativamente el crecimiento de tilapia. Adicionalmente se reducen estadísticamente las emisiones de fósforo presente en heces.
- Es posible que D2 y D3 aumenten la acumulación de lípidos en intestino de tilapia.
- En trucha arcoíris es posible alimentar organismos jóvenes con harina de soja y polvo de *Spirulina* adicionada con proteasa y fitasa (D1) durante 75 días sin afectar el crecimiento y con una reducción significativa en el fósforo emitido al medio en forma sólida (heces). En periodos más largos (75 días en adelante) el crecimiento se reduce, aunque la respuesta inmune no resulta afectada.
- Una exposición prolongada (<170 días) a dietas con 100% de sustitución de harina de pescado por harina vegetal produce una disminución en la cantidad de P en suero sanguíneo y un aumento en la excreción de P soluble en trucha arcoíris.
- La cantidad de nitrógeno excretado no varía con el uso de alimentos a base de harinas vegetales en trucha arcoíris.
- Al utilizar alimentos a base de harina vegetal en trucha arcoíris se observa un aumento en la actividad de la lizoenzima durante los primeros 75 días (E1) en comparación con peces alimentados con harinas de origen animal, sin embargo en exposiciones prolongadas la actividad de la enzima es similar para ambas fuentes de proteína.
- Los parámetros medidos de respuesta inmune no específica (con excepción del punto anterior) no se vieron afectados por el uso de harinas de origen vegetal con suplementos en trucha arcoíris.
- Los picos de excreción de fósforo en trucha arcoíris alimentados con harinas vegetales se presentan de 2 a 4 horas después de ser alimentados.
- Las proteínas vegetales presentes en suero sanguíneo en trucha arcoíris alimentadas 60 días con 100% sustitución de harinas vegetales tienen un comportamiento similar a las proteínas de alimentos a base de harina de pescado.

-Si se planea alimentar trucha arcoíris por periodos prolongados con dietas con alto contenido de proteína vegetal se recomienda después de 75 días alternar el uso de este alimento con otro para poder compensar posibles deficiencias en fósforo y posiblemente el crecimiento.

Referencias Bibliográficas

- Abdel-Tawwab, Mn., Abdel-Rahman, A. M., Ismael, N.E.M. 2008. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged *in situ* with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 280: 185–189.
- Adelizi, P.D., Rosati ,R.R., Warner, K., Wu, Y. V., Muench, P.R., White, M.R., Brown, P.B.1998. Evaluation of fish-meal free diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Nutrition* 4: 255-262.
- Alexander, JB., Ingram, GA. 1992. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases* 2: 249-279.
- Azaza, M.S., Wassim.F., Mensi, F., Abdelmouleh, A., Brini, B., Kraïem, M.M. 2009. Evaluation of faba beans (*Vicia faba* L. var. minuta) as a replacement for soybean meal in practical diets of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 287: 174–179.
- Barnham, C. y Baxter., A. 2003. Condition factor, K, for salmonid fish. State of Victoria, Department of Primary Industries.
- Betoulle, S., Duchiron, C., Deschaux, P. 2000. Lindane increases in vitro respiratory burst activity and intracellular calcium levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) head kidney phagocytes. *Aquatic Toxicology* 48: 211–221.
- Biswas, A.K., Haku, H., Cheol, J.S., Seoka, M., Takii, K. 2007. Use of soybean meal and phytase for partial replacement of fish meal in the diet of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 267: 284–291.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Journal of Biochemistry Physiology* 37: 911–917.
- Bravefjord, G., Krogdahl, A. 1996. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases* 19(5): 375-387.
- Brunty, J., Buvklin, R., Davis, C., Baird, C., Nordstedt, R. 1997. The influence of feed protein intake on tilapia ammonia production. *Aquacultural Engineering* 16: 161-166.
- Burrels, C., Williams, P.D., Southgate, P.J., Crampton, V.O. 1999. Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 72: 277-288.

Cao, L., Wang, W., Yang, C., Yang, Y., Diana, J., Yakupitiyage, A., Luo, Z., Li, Y. 2007. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 497–507.

Campos-Pérez, J.J., Ellis, A.E., Secombes, C. 1997. Investigation of factors influencing the ability of *Renibacterium salmoninarum* to stimulate rainbow trout macrophage respiratory burst activity. *Fish & Shellfish Immunology* 7, 555–566.

Caruso, D., Schlumberger, O., Dahm, C., Proteau, J. 2002. Plasma lysozyme levels in sheatfish *Silurus glanis* (L.) subjected to stress and experimental infection with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture Research* 33: 999-1008.

Cheng, Z.J., Hardy, R.W. 2003. Effects of extrusion and expelling processing, and microbial phytase supplementation on apparent digestibility coefficients of nutrients in full-fat soybeans for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 218: 501–514.

Cheng, Z., Hardy R., Erlhac, V., Aбаудан, J. 2004. Effects of microbial phytase supplementation and dosage on apparent digestibility coefficients of nutrients and dry matter in soybean product-based diets for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World of Aquaculture Society*. 35: 1-15.

Cho C.Y., Bureau D.P. 1997. Reduction of waste output from salmonid aquaculture through feeds and feeding. *Progressive Fish Culturist* 59, 155-160.

Chung, S., Secombes, C.J. 1988. Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 89B No. 3: 539-544.

Coloso, RM., King, K., Fletcher, JW., Hendrix, MA., Subramanyam, M., Weis, P., Ferraris, RP. 2003. Phosphorus utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed practical diets and its consequences on effluent phosphorus levels. *Aquaculture*. 220: 801–820.

CONAPESCA. 2011. Anuario estadístico de Acuicultura y pesca 2011. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, México.

Dabrowski, K., Poczyczynski, P., Kock, G. and Berger, B. 1989. Effect of partially or totally replacing fish meal protein by soybean meal protein on growth, food utilization and proteolytic enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). New in vivo test for exocrine pancreatic secretion. *Aquaculture* 77: 29-49.

Dalsgaard, J., Ekmann, K.S., Pedersen, P.B., Verlhac, V. 2009. Effect of supplemented fungal phytase on performance and phosphorus availability by phosphorus-depleted juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and

on the magnitude and composition of phosphorus waste output. *Aquaculture* 286: 105–112.

Davidson, J., Good, C., Barrows, F.T., Welsh, C: Kenney, P.B., Summerfelt, S.T. 2013. Comparing the effects of feeding a grain- or a fish meal-based diet on water quality, waste production, and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* performance within low exchange water recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 52: 45–57.

Davies, S.J., McConnell, S., Bateson, R.I. 1990. Potential of rapeseed meal as an alternative protein source in complete diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters). *Aquaculture* 87: 145-154..

Denstadli, V., Skrede, A., Krogdahl, Å., Sahlstrøm, S., Storebakken, T. 2006. Feed intake, growth, feed conversion, digestibility, enzyme activities and intestinal structure in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed graded levels of phytic acid. *Aquaculture* 256: 365–376.

Drew, M.S., Racz, V.J., Gauthier, R., Thiessen, D.L. 2005. Effect of adding protease to coextruded flax:pea or canola:pea products on nutrient digestibility and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology* 119: 117–128.

El-Sayed, AM. 1994. Evaluation of soybean meal, *Spirulina* meal and chicken offal meal as protein sources for silver seabream (*Rhabdosargus sarba*) fingerlings. *Aquaculture*. 127: 169-176.

Engstad, R.E., Robertsen, B., Frivold, E. 1992. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish & Shellfish Immunology* 2: 287-297.

Eya, JC., Ashame, MF., Pomeroy, CF. 2011. Association of mitochondrial function with feed efficiency in rainbow trout: Diets and family effects. *Aquaculture* 321:71–84.

FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Organización de las naciones unidas para la alimentación y agricultura, departamento de pesca y acuicultura. FAO, Roma.

Fast, M., Sims, D., Burka, J., Mustafa, A., Ross, N. 2002. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 132: 645–657.

Fevolden, S.E., Refstie, T., Gjerde, B. 1993. Genetic and phenotypic parameters for cortisol and glucose stress response in Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture* 118: 205– 216.

Fevolden, S., Røed, K.H., Fjalestad, K.T. 2002. Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth. *Aquaculture* 205: 61– 75.

Forster, I., Higgs, D.A., Dosanjh, B.S., Rowshandeli, M., Parr, J., 1999. Potential for dietary phytase to improve the nutritive value of canola protein concentrate and decrease phosphorus output in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) held in 11 °C fresh water. *Aquaculture* 179: 109–125.

Fournier, V., Gouillou-Coustans, M.F., Métailler, R., Vachot, C., Moriceau, J., Le Delliou, H., Huelvan, C., Desbruyeres, E., Kaushik, S.J. 2006. Nitrogen utilisation and ureogenesis as affected by dietary nucleic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 177-188.

Francesco (de), M., Parisi, G., Médale, F., Lupi, P., Kaushik, S., Poli, B.M. 2004. Effect of long-term feeding with a plant protein mixture based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 236: 413–429.

Francis, G., Makkar, H. P.S., Becker, K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199: 197–227.

Furukawa, A., Tsukahara, H. 1966. On the acid digestion of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries* 32: 502–506.

Gomes, E., Rema, P and Kaushik S. 1995. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. *Aquaculture*. 130: 177-186.

Grinde, B., Lie, O., Poppe, T., Salte, R. 1988. Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. *Aquaculture*, 68: 299-304.

Gutierrez, F.W., Zaldívar, J., Contreras, G. 2009. Coeficientes de digestibilidad aparente de harina de pescado peruana y maíz amarillo duro para *Colossoma macropomum* (Actinopterygii, Characidae). *Revista Peruana de Biología* 15 (2): 111-115.

Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R. 2004. *Nutrición y alimentación de peces y crustáceos*. Ediciones Mundi-Prensa. España. 471

Handy, R.D. 1989. The ionic composition of rainbow trout body mucus. *Comparative Biochemistry and Physiology* Vol. 93A, 3: 571-575.

Hardie, L.J., Ellis, A.E., Secombes, C.J. 1996. In vitro activation of rainbow trout macrophages stimulates inhibition of *Renibacterium salmoninarum*

growth concomitant with augmented generation of respiratory burst products. *Diseases of Aquatic Organisms* 25: 175-183.

Hart, S.D., Bharadwaj, A.S., & Brown, P.B. 2010. Soybean lectins and trypsin inhibitors, but not oligosaccharides or the interactions of factors, impact weight gain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 306: 310-314.

Heikkinen, J., Vielma, J., Kemiläinen, O., Tirola, M., Eskelinen, P., Kiuru, T., Navia-Paldanius, D., Von Wright, A. 2006. Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261: 259–268.

Hernández-Fores, G., Hernández H.L.H., Fernández, A.M.A., Angeles, L.O. 2012. Effects of total replacement of fishmeal with *Spirulina* powder and soybean meal on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, IJA_64.2012.790*.

Indexmundi. 2012. Consultado en <http://www.indexmundi.com/commodities/?commodity=fish-meal&months=60¤cy=mxn> el día 14 de Junio a las 13.42 Hrs.

Jang, S.I., Hardie, L.J., Secombes, C.J. 1994. Effects of transforming growth factor β , on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity. *Developmental and Comparative Immunology*. Vol 18. No. 4, 315-323.

Kaushik, S.J., Cravedi, J.P., Lalles, J.P., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M. 1995. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 133: 257-274.

Kaushik S.J., Covès, D., Dutto, G., Blanc, D. 2004. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 230: 391–404.

Kiron, V., Watanabe, T., Fukuda, H., Okamoto, N., Takeuchi, T. 1995. Protein nutrition and defence mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology* Vol. III A 3: 351-359.

Köprücü, K., Özdemir, Y. 2005. Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 250: 308-316.

Lanari, D., Agaro E.D., Turri, C. 1998. Use of nonlinear regression to evaluate the effects of phytase enzyme treatment of plant protein diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 161: 345-356.

Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., Guzmán-Méndez, B.E., López-Madrid, W. 2003. Use of bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus*

acidophilus, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 216: 193-201.

Lellis, W.A., Barrows, F.T., Hardy, R.W. 2004. Effects of phase-feeding dietary phosphorus on survival, growth, and processing characteristics of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 242: 607–616.

Liebert, F., Portz, L. 2005. Nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase. *Aquaculture* 248: 111-119.

Liebert, F., Portz, L. 2007. Different sources of microbial phytase in plant based low phosphorus diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) may provide different effects on phytate degradation. *Aquaculture* 267, 292-299.

Lundén, T., Lilius, E.M., Bylund, G. 2002. Respiratory burst activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocytes is modulated by antimicrobial drugs. *Aquaculture* 207, 203–212.

Martinez-Palacios, C., Galván-Cruz, R., Olvera-Novoa, M., Chávez-Martínez, C. 1988. The Use of jack bean (*Canavalia ensiformis* Leguminosae) meal as a partial substitute for fish meal in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* Cichlidae). *Aquaculture* 68: 165-175.

McDaniel, N.K., Sugiura, S.H., Kehler, T., Fletcher, J.W., Coloso, R.M., Weis, P., Ferraris, R.P. 2005. Dissolved oxygen and dietary phosphorus modulate utilization and effluent partitioning of phosphorus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) aquaculture. *Environmental Pollution* 138 (2): 350-357.

Moyano, F., Martínez, I., Díaz, M., Alarcón, F. 1999. Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species., seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 122: 327–332.

Mundheim, H, Aksnes, A., Hope, B. 2004. Growth, feed efficiency and digestibility in salmon (*Salmo salar* L.) fed different dietary proportions of vegetable protein sources in combination with two fish meal qualities. *Aquaculture*. 237: 315–331.

Murai, T., Ogata, H., Villaneda, A. and Watanabe, T. 1989. Utilization of soy flour by fingerling rainbow trout having different body size. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 1067-1073.

Mustafa, M.G., Umino, T., Nakagawa, H. 1994. The effect of *Spirulina* feeding on muscle protein deposition in red sea bream, *Pagrus major*. *Journal of Applied Ichthyology* 10: 141-145.

- Nandeesh, M.C., Gangadharm B., Varghese, T.J., Keshavanarh, P. 1998. Effect of feeding *Spirulina platensis* on the growth, proximate composition and organoleptic quality of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research* 29: 305-312.
- Nikoskelainen, S., Kjellsen, O., Lilius, Esa-Matti., Schrøder, M.B. 2006. Respiratory burst activity of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) blood phagocytes differs markedly from that of rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology* 21: 199-208.
- Novoa, B., Figueroa, A., Ashton, I., Secombes, C.J. 1996. In vitro studies on the regulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophage respiratory burst activity, *Developmental and Comparative Immunology* 20: 207-216.
- NRC. 1993. *Nutrient Requirements of Fish*. National Academic Press, Washington D.C. USA. 21-25.
- Oliva-Teles, A., Gonçalves, P. 2001. Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 202: 269–278.
- Oliva-Teles, A., Guedes, M.J., Vachot, C., Kaushik, S.J. 2006. The effect of nucleic acids on growth, ureagenesis and nitrogen excretion of gilthead sea bream *Sparus aurata* juveniles. *Aquaculture* 253: 608-617.
- Olvera, NM., Martínez, PC., Galvan, CR., Chavez, SC. 1988. The use of seed of the leguminous plant *Sesbania grandiflora* as a partial replacement for fish meal in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquaculture* 71: 51-60.
- Olvera-Novoa, M.A., Pereira-Pacheco, F., Olivera-Castillo, L., Pkrez-Flores, V., Navarro, L., Sámano, J.C. 1997. Cowpea (*Vigna unguiculata*) protein concentrate as replacement for fish meal in diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. *Aquaculture* 158: 107-116.
- Olvera-Novoa, M.A., Domínguez-Cen, L.J., Olivera-Castillo, L., Martínez-Palacios, C.A. 1998. Effect of the use of the microalga *Spirulina maxima* as fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), fry. *Aquaculture Research* 29: 709-715.
- Ostaszewska, T., Dabrowski, K., Palacios, M.E., Olejnicza, M., Wieczorek, M. 2005. Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins. *Aquaculture* 245: 273–286.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S., Sugita, H. 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune

response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 243: 241-254.

Refstie, S., Helland, S.J., Storebakken, T. 1997. Adaptation to soybean meal in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 153: 263-272.

Refstie, S., Korsøen, O.J., Storebakken, T., Baevefjord, G., Lein, I., Roem, A.J. 2000. Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 190: 49–63.

Rehulka J. 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 190: 27-47.

Reinitz, G., Hitzel, F. 1980. Formulation of practical diets for rainbow trout base on desired performance and body composition. *Aquaculture* 19: 243-252.

Riche, M., Brown, P.B. 1996. Availability of phosphorus from feedstuffs fed to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 142: 269-282.

Riche, M., Haley, D., Oetker, M., Garbrecht., Garlin, D. 2004. Effect of feeding frequency on gastric evacuation and the return of appetite in tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 234: 657–673.

Richter, N., Siddhuraju, P., Becker, K. 2003. Evaluation of nutritional quality of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves as an alternative protein source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture* 217: 599– 611.

Rodehutsord, M., Gregus, Z., Pfeffer, E. 2000. Effect of phosphorus intake on faecal and non-faecal phosphorus excretion in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and the consequences for comparative phosphorus availability studies. *Aquaculture* 188: 383–398.

Røed, K.h., Fevolden, S.-E., Fjalestad, K.T. 2002. Disease resistance and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for lysozyme activity. *Aquaculture* 209: 91–101.

Rubio-Godoy, M, 2010. Inmunología de los peces óseos, Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 1: 47-57.

Rumsey, G.L., Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Bowser, P.R. 1994. Effect of soybean protein on serological response, non-specific defense mechanisms, growth, and protein utilization in rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 41: 323-339.

Ryckaert, K., Bossier, P., D'Herde, K., Diez-Fraile, S., Sorgeloos, P., Haesebrouck, F., Pasmans, F. 2010. Persistence of *Yersinia ruckeri* in trout macrophages. *Fish & Shellfish Immunology* 29: 648-655.

Sánchez-Ávila, D. 2012. Acción de los probióticos en la digestibilidad de dietas con altos contenidos de harina de soya en trucha arcoíris". Tesis de licenciatura, UNAM. FES-Iztacala.

Santiago, C., Aldaba, M., Laron, M., Reyes, O. 1988. Reproductive performance and growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock fed diets containing *Leucaena zeucocephala* leaf meal. *Aquaculture* 70: 53-61.

Santigosa, E., Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., Gallardo, M.A. 2008. Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture* 282: 68-74.

Sarker, P.K., Fournier, J., Boucher, E., Proulx, E., Noüe, J., Vandenberg, G.W. 2011. Effects of low phosphorus ingredient combinations on weight gain, apparent digestibility coefficients, non-fecal phosphorus excretion, phosphorus retention and loading of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology* 168: 241-249.

Satoh, S., Hernández, A., Tokoro, T., Morishita, Y., Kiron, V., Watanabe, T. 2003. Comparison of phosphorus retention efficiency between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a commercial diet and a low fishmeal based diet. *Aquaculture* 224: 271-282.

Sealey, W.M., Barrows, F.T., Smith, C.E., Overturf, K., LaPatra, S.E. 2009. Soybean meal level and probiotics in first feeding fry diets alter the ability of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to utilize high levels of soybean meal during grow-out. *Aquaculture* 293: 195-203.

Secombes, C.J., Fletcher, T.C. 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *A Review of Fish Diseases* 2: 53-71.

Siddiqui, A., Howlader, M., Adam, A. 1988. Effects of dietary protein levels on growth, feed conversion and protein utilization in fry and young Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 70: 63-73.

Skonberg, D.I., Yogev, L., Hardy, R.W., Donga, F.M. 1997. Metabolic response to dietary phosphorus intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 157: 11-24.

Smith, R.R., Kincaid, H.L., Regenstein, J.M., Rumsey, G.L. 1988. Growth, carcass composition, and taste of rainbow trout of different strains fed diets containing primarily plant or animal protein. *Aquaculture* 70: 309-321.

Subasinghe, R. y Currie, D. 2005. Aquaculture topics and activities, Main cultured species en FAO Fisheries and Aquaculture Department [en línea]. <http://www.fao.org/fishery/topic/13531/> en Consultado el 19 May 2011.

Tacon, A.G.J., Haastler, J.V., Featherstone, P.B., Kerr, K. and Jackson, A.J., 1983. Studies on the utilization of full fat soybean and solvent extracted soybean in a complete diet for rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 49: 1437-1443.

Tacon G.J. y Metian M. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285: 146-158.

Uyan, O., Koshio, S., Teshima, S., Ishikawa, M., Thu, M., Shah, A, M., Raafat, M.F. 2006. Growth and phosphorus loading by partially replacing fishmeal with tuna muscle by-product powder in the diet of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 257: 437–445.

Wang, H., Wang, H. 2009. Mitigation of lake eutrophication: Loosen nitrogen control and focus on phosphorus abatement. *Progress in Natural Science* 19: 1445–1451.

Welker, T., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Klesius, P. 2007. Growth, immune function, and disease and stress resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed graded levels of bovine lactoferrin. *Aquaculture* 262: 156–162.

Wright, P.A. 1993. Nitrogen excretion and enzyme pathways for ureagenesis in freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Physiological Zoology* 66: 881-901.

Yamamoto, T., Iwashita, Y., Matsunari, H., Sugita, T., Furuita, H., Akimoto, A., Okamatsu, K., Suzuki, N. 2010. Influence of fermentation conditions for soybean meal in a non-fish meal diet on the growth performance and physiological condition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 309: 173–180.

Yokoyama, S., Koshio, S., Takakura, N., Oshida, K., Ishikawa, M., Gallardo-Cigarroa, F., Catacutan, M., Teshima, S. 2006. Effect of dietary bovine lactoferrin on growth response, tolerance to air exposure and low salinity stress conditions in orange spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture* 255: 507–513.

Yousif, O., Osman, M., Alhadrami, G. 1996. Evaluation of dates and date pits as dietary ingredients in tilapia (*Oreochromis aureus*) diets differing in protein sources. *Bioresource Technology* 57: 81-85.

Yue, Yi-Rong., Zhou, Qi-Cun. 2008. Effect of replacing soybean meal with cottonseed meal on growth, feed utilization, and hematological indexes for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture* 284: 185–189.

Anexo 1

Lisoenzima

Esta actúa sobre el péptidoglicano de las paredes celulares bacterianas, especialmente el de las bacterias Gram positivas; también se ha reportado como que actúa como saponina. En bacterias Gram-negativas, la lisoenzima ataca estructuras que contienen p I-4 ligado a N-acetilmuramamina y N-acetilglucosamina puede actuar una vez que el complemento y otros factores han dañado la pared celular, exponiendo la capa interna de péptidoglicano (Rubio-Godoy, 2010). Muchos aspectos de lisoenzima se han descrito en vertebrados al igual que invertebrados y en peces se ha caracterizado en varias especies de peces, concluyendo que pudieran jugar un papel importante en la defensa contra enfermedades. Se asocia particularmente con tejidos ricos en leucocitos y sitios donde el riesgo de invasión de bacterias es alto. La lisoenzima aparentemente es en la sangre una secreción de los lisosomas de neutrofilos y macrófagos (Kiron et al., 1995) y la utilización de levaduras (que poseen una alta cantidad de glucanos) favorece la secreción de lisoenzima por macrófagos y/o un incremento en el número de macrófagos (Engstad et al., 1992).

Anexo 2

Existen diferentes tipos de fagocitos en el cuerpo de los organismos multicelulares. Se diferencian 2 grandes grupos: Granulocitos y monocitos/macrófagos (Novoa et al., 1996). En peces, los macrófagos son considerados las principales células fagocíticas y también son los fagocitos dominantes en el riñón de estos organismos (Lundén et al., 2002; Rubio-Godoy M, 2010). Además de ingerir microbios, segregan una amplio rango de sustancias biológicamente activas como hidrolasas, inhibidores de enzimas, proteínas de unión, citoquinonas, eicosanoides y oxígeno reactivo así como especies de nitrógeno que están relacionadas con actividad bacterial (Campos-Pérez et al., 1997; Betoulle et al., 2000). La reducción oxidativa comienza con una membrana citoplasmática asociada a la membrana y a oxidasa-NADPH, donde el oxígeno molecular pasa por una reducción de un electrón para formar aniones superoxidativos (O_2^-) (Nikoskelainen et al., 2006). Estos aniones superoxidativos pueden formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2), radicales hidroxilo (OH^-) y otras formas de oxígeno reactivo en peces (Secombes & Fletcher, 1992). Superoxidativo y peróxido de hidrógeno son formas de oxígeno altamente reactivas y tóxicas, además, el peróxido de hidrógeno en conducción con mieloperoxidasa y un halógeno forman la base de un potente sistema antibacteriano (Campos-Pérez et al., 1997; Lundén et al., 2002). Existen reportes que la utilización de inmunoestimulantes (β -glucanos) ayuda a la modulación fagocítica de macrófagos y a la actividad respiratoria explosiva, con lo que se presume que contribuye a un incremento en la protección. Sin embargo también se ha reportado que una liberación en grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno por parte los fagocitos, puede generar una reacción inflamatoria mayor induciendo a daño celular (estrés oxidativo) (Betoulle et al., 2000).