

11674
5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL

**“EFECTO DE LA RAZON PROTEÍNA-ENERGÍA SOBRE EL
CRECIMIENTO Y METABOLISMO DE JUVENILES EN EL
ABULÓN AZUL (*H. fulgens*)”**

TRABAJO DE TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
PRESENTA

LAURA ELENA GÓMEZ MONTES

Directora de Tesis:
MARÍA TERESA VIANA CASTRILLÓN

Comité Tutorial:
ARMANDO SHIMADA MIYASAKA
LOUIS R. D'ABRAMO

Cuautillán, Edo. de México

Junio de 2003
3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICO ESTE TRABAJO A MIS PADRES COMO UNA PEQUEÑA MUESTRA DEL AMOR QUE SIENTO POR ELLOS. NO EXISTEN PALABRAS PARA AGRADECERLES TODO SU AMOR, APOYO Y CONFIANZA.

A MIS HERMANOS: GUERA Y BETO GRACIAS PORQUE SIEMPRE HE CONTADO CON USTEDES Y A MI ABUE TOÑO POR SUS ENSEÑANZAS.

LOS AMO

A ALFREDO POR COMPARTIR CONMIGO ESTA ETAPA. HA SIDO MARAVILLOSO.

A ALEJANDRA, GABY, LAURA, VERO, CARO, AIMEE, ADRIANA, PAOLA, JIM, SAUL, GIL, DAVID Y GERARDO. GRACIAS POR SU AMISTAD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN-UNAM Y CONACYT POR APOYAR MIS ESTUDIOS. ASI COMO AL IIO DE LA UNAM POR FACILITARME LAS INSTALACIONES PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

AL PROYECTO CONACYT G281194B "FISIOLOGIA DIGESTIVA Y METABOLISMO NUTRICIONAL DEL ABULON (*Nalotus fulgens*) CULTIVADO" Y AL PROYECTO FOSINVE 002-DE.

A MI DIRECTORA DE TESIS, DRA. MA. TERESA VIANA, POR TODO SU TIEMPO Y DEDICACION.

A MIS SINODALES: DR. ARMANDO SHIMADA, DR. LOU D'ABRAMO, DR. CARLOS VAZQUEZ Y DR. ZAUL GARCIA POR SU CONFIANZA, APOYO Y ASESORIAS.

A LOS PROFESORES DE AJUCHITLAN PORQUE SUS ENSEÑANZAS FUERON LA BASE PARA EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO, ESPECIALMENTE AL DR. SHIMADA Y DR. CUARON POR SUS CONSEJOS, MOTIVACION Y APOYO.

A LOS TECNICOS MARCO GONZALEZ Y ROBERTO ESCOBAR POR SU APOYO EN EL ANALISIS QUIMICO DE LAS MUESTRAS.

A MIS COMPANEROS DE LABORATORIO SILVIA, JULY, JESSICA, ALE, OSCAR, ETC. EDUARDO Y ALBERTO.

A GILDARDO ROJO Y ENRIQUE VALENZUELA POR LOS ABULONES Y SU APOYO.

A ALE AYANEGUI, LETY Y MINE POR SU APOYO.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Se evaluó el crecimiento de juveniles de abulón azul (*Haliotis fulgens*) en laboratorio, a una temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ y alimentados con dietas que contenían diferentes razones de proteína:energía (mg de proteína cruda por kcal), 62, 74, 85, 100 y 108. El contenido de proteína varió de 26 a 44%, mientras que el contenido energético permaneció constante (4.1 kcal/g). Las tasas de crecimiento obtenidas fueron de 3.63 a 12.33 mg/día, observándose las mayores en los abulones alimentados con las dietas 100 y 108. Conforme se incrementó la razón proteína:energía se incrementó la eficiencia de retención proteica, excepto en la dieta 108, que contenía 40% de proteína. Aparentemente los abulones consumen a satisfacer sus requerimientos energéticos. En las dietas 62, 85 y 100 se evaluó la disipación de calor asociada a procesos metabólicos. No se observaron diferencias apreciables en la energía perdida por respiración entre las diferentes dietas. Se estimó la proporción que representaron las heces, el crecimiento y el metabolismo con respecto a la energía consumida. Las mayores pérdidas de energía asociadas a la digestión se observaron en la dieta 100, sin embargo el crecimiento de los organismos alimentados con esta dieta fue significativamente mayor que el resto. El porcentaje de energía que no pudo ser explicada varió entre 7 y 28.5%, parte de estas pérdidas pudieron deberse a la producción de moco y a la excreción de amonio. Los resultados sugieren que existe la posibilidad de disminuir tanto los lípidos como la proteína en la dieta sin que se presente un efecto negativo sobre el crecimiento.

Palabras clave: abulón, razón proteína:energía, metabolismo, nutrición, fisiología.

ABSTRACT

Juvenile green abalone *Haliotis rufescens* were grown under laboratory conditions at $21^{\circ}\text{C} \pm 1.0$ and fed formulated diets consisting of different protein:energy ratios (mg protein/kcal/g), 62, 74, 85, 100, 108. The level of crude protein varied from approximately 26 to 44% while the energy content remained constant at about 4.1 kcal g^{-1} . Growth, expressed as mg/day, ranged from 3.63 to 12.33 mg day^{-1} . The growth of abalone fed the 100 and 108 diets were significantly greater than that of each of the other diets. Protein efficiency ratio increased as the dietary protein content increased except for the T108 diet (44 % crude protein). Abalone apparently consume food to satisfy an energy requirement. Caloric expenditure due to metabolism was estimated for abalone fed diets with protein ratios of 62, 85 and 100. Energy loss due to respiration did not vary appreciably among abalone fed the different diets. The proportional distribution of dietary energy into fecal, digestible, growth, and metabolic energy was estimated for abalone fed these diets. The highest loss of energy due to digestion was for the 100 P:E diet, but growth of abalone fed this diet was significantly higher than that of all other treatments except that of abalone fed the 108 diet. Unexplained energy loss to achieve balance ranged from 7 to 28.5 %, some of which can be attributed to differential mucus and ammonia production. Results suggest that there is potential for the reduction of both dietary protein and lipid without any correspondingly adverse effects on the growth response.

Keywords: abalone; protein:energy ratio; metabolism; nutrition; physiology

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION

La pesquería del abulón ha venido disminuyendo a lo largo de los últimos años como resultado de una intensa captura por parte de la industria. Las cuotas de captura en México se redujeron drásticamente, desde 3,500 ton en los 60s hasta 400 en la década de los 80's (Guzmán-Del Próo, 1992). Este patrón también se ha observado a nivel internacional, con una disminución del 30% durante los últimos diez años, pasando de 14,830 mt a 10,150 mt (Gordon y Cook, 2001). La intensa captura del abulón obedece a su alta demanda en países o comunidades asiáticas ya que representa un alto valor comercial (US \$32/kg "en concha", y \$100 en filete). Lo anterior ha estimulado tanto el desarrollo del cultivo en granja como el estudio de diferentes áreas que conforman su proceso productivo. De esta manera el cultivo del abulón se ha incrementado en un 600% durante los últimos 10 años, pasando de 1220 mt a 7775 mt para 1999, actividad que es realizada casi en gran parte dentro de China y Taiwan. La talla comercial (70-90 mm; Gordon y Cook, 2001) se adquiere entre los 2 (en casos como para *Haliotis asinina*) hasta 6 años de cultivo. Por lo anterior es de esperarse que el desarrollo de alimento balanceado para abulón sea una de las áreas de investigación mas activas.

El conocer y entender los requerimientos nutricionales de un organismo no solo implica que el alimento resulte en un óptimo crecimiento, sino también el contar con una buena tasa de conversión alimenticia que permita economizar el costo de alimentación. A este respecto cabe mencionar que en un sistema de cultivo intensivo en acuicultura, el alimento representa uno de los mayores costos de producción (Avault, 1996; Cuenca y García, 1987). Por otro lado, varias de las dietas disponibles en el mercado tienen precios tan altos que no resulta rentable su importación e incluso su compra. Por esto, para que el alimento balanceado sea una buena alternativa para los productores de abulón es necesario optimizar el uso de los ingredientes. Así una alimentación adecuada no solo se verá reflejada en las ganancias económicas sino también en una menor contaminación del medio acuático (Alanára et al., 2001).

FUENTES DE ALIMENTACION

El abulón es un gasterópodo herbívoro que se alimenta de macroalgas en su medio natural (Hahn, 1989). Sin embargo el ser alimentado con macroalgas en granja trae consigo numerosos inconvenientes como el alto costo de su cosecha, y por ende alto precio en el mercado (Hahn, 1989; Bautista-Teruel y Millamena, 1999), además de ser un posible vector de parásitos y patógenos del medio natural hacia las granjas. Así mismo al manejar grandes volúmenes hace difícil su control. Por otro lado, las macroalgas presentan una alta variación en el contenido de nutrimentos a lo largo del año. Por ejemplo *Macrocystis pyrifera* presentó variaciones estacionales que van desde un 5.13 hasta un 12.72% en el contenido de proteína cruda, en 3 localidades de la península de Baja California (Rodríguez-Montesinos y Hernández-Carmona, 1991).

En los últimos años se ha incrementado el interés por el desarrollo de dietas balanceadas que reemplacen a las macroalgas. Si bien las dietas existen desde hace más de 20 años (Fleming et al., 1996), es hasta los últimos 10 que se ha intensificado el desarrollo de las mismas, reportando un uso exitoso donde se han logrado mayores tasas de crecimiento que con macroalgas (Bautista-Teruel y Millamena, 1999; Britz et al., 1994; Viana et al., 1993; Hahn, 1989).

CONSUMO

El consumo es punto de partida en todo trabajo de nutrición, ya que de nada serviría una dieta balanceada a cubrir los requerimientos de un organismo si este no lo consume o lo consume en cantidades inadecuadas. Así mismo esta variable nos determinará el nivel de nutrientes ingeridos y por lo tanto la respuesta y desarrollo que un organismo tendrá. A partir del consumo se derivan diferentes descripciones de tipo cualitativo como lo son la energía digestible y la metabolizable (Van Soest, 1994). Una medición certera del consumo no resulta difícil en organismos terrestres, sin embargo al estar hablando de

organismos acuáticos en los que el alimento debe permanecer inmerso en el agua por períodos prolongados, resulta difícil el pensar que el alimento no sufrirá cambios por pérdida de nutrientes, ya sea por lavado o estabilidad. Por esta razón es de suma importancia contar con una técnica sistemática para medir el consumo tomando en cuenta la pérdida por lavado de materia orgánica (% estabilidad). Para dicha corrección se deben de asegurar igualdad de condiciones que en las unidades en las que se realiza la medición de consumo.

REQUERIMIENTOS ENERGETICOS

La energía representa un requerimiento básico para el mantenimiento de los procesos vitales, crecimiento y otras funciones de un organismo. Por lo que la concentración de energía debe ser el primer factor a considerar en la formulación de dietas. Para determinar la ración en la dieta se debe relacionar el desarrollo del animal con los ingredientes en los que la cantidad de energía disponible es conocida (De la Higuera, 1987), por lo que primero resulta necesario el conocer el contenido energético de una dieta (Energía Bruta).

Para la estimación de la energía bruta del alimento es preferible usar el método directo por medio de bomba calorimétrica, en vez de otros métodos indirectos tales como los factores de conversión (Jobling, 1983). Existen varios sitios en los que la energía consumida por un organismo se pierde antes de ser traducida en crecimiento neto. La energía contenida en las dietas (energía bruta) depende de su composición química. Sin embargo no forzosamente se verá reflejada en el organismo, ya que parte de la energía ingerida durante la alimentación se pierde entre el consumo y el producto. Estas pérdidas ocurren en heces, compuestos nitrogenados así como pérdidas en forma de calor. La diferencia entre la energía consumida y la energía digestible (fracción absorbida) es la energía perdida por heces, mientras que la energía metabolizable (asimilada) representa la energía digestible corregida por la energía pérdida por excreciones de productos nitrogenados. La diferencia entre la energía metabolizable y la energía depositada en forma

de tejido somático o productos reproductivos es la energía perdida en forma de calor. Las pérdidas por calor ocurren principalmente por dos procesos: el incremento calórico por alimentación (ingestión, digestión y absorción) e incremento calórico por mantenimiento (NRC, 1993). La producción de calor puede ser medida directamente, sin embargo dicha medición no es un proceso simple en el caso de los organismos acuáticos ya que se requiere de equipo muy costoso (Widdows y Hawkins, 1989 y Shick et al., 1987). Esto debido a la relativa baja producción de calor por estos animales y la alta capacidad calorífica del agua (NRC 1993; De la Higuera, 1987). Un método indirecto para evaluar la producción de calor se basa en la relación que existe entre el catabolismo de un nutriente y el consumo de oxígeno, método que se conoce como calorimetría indirecta, la cual supone que toda la energía es liberada aeróbicamente. Para la medición de consumo de oxígeno existen diferentes tipos de cámaras respirométricas herméticamente cerradas donde se mide el consumo de oxígeno por disminución de su contenido en la cámara (circuito cerrado) o por diferencia en la concentración de oxígeno en el agua a la entrada y salida de la cámara (circuito abierto).

La energía disponible de los alimentos debe de ser determinada en base digestible o metabólica. La energía metabolizable es una medida mas exacta de la energía disponible para el metabolismo de un organismo, sin embargo esta ofrece muy poca ventaja sobre la digestible en alimentos para peces, ya que la energía perdida en heces representa la mayor fracción de las pérdidas por excreción. Los compuestos nitrogenados (amonio) en un alto porcentaje (85%) son eliminados de forma pasiva, lo cual no representa un gasto energético importante, a diferencia de organismos que eliminan compuestos nitrogenados en forma de urea (Steffens, 1989).

La determinación de la energía digestible no es tan sencilla en organismos acuáticos ya que al igual que en el caso del alimento las heces pueden presentar lavado de nutrientes pudiendo tener valores de digestibilidad sobrestimados (Cuenca y García, 1987; De la Higuera, 1987).

En general, la repartición de la energía bruta consumida por un organismo puede representarse en términos de la ecuación del balance energético (Lucas, 1996). La cual esta integrada por los siguientes componentes:

$$C = P + R + F + U$$

donde: C = Consumo P = Producción; R = Respiración; F = Heces; U = Excreción de compuestos nitrogenados.

La ventaja de la ecuación del presupuesto energético reside en el hecho de que se puede estimar el crecimiento potencial de un organismo a partir de mediciones fisiológicas. Además la magnitud relativa de cada componente permite identificar la dirección en que un organismo esta utilizando la energía ingerida. Por ejemplo es posible calcular el potencial de crecimiento ($Sc = A - R$) a partir de la energía metabolizable ($ME = A =$ fracción asimilada) y la energía disipada como calor ($R =$ respiración) únicamente. Este tipo de aproximación es ampliamente utilizada en organismos acuáticos. Así con la información obtenida de balances energéticos de animales bajo condiciones determinadas y basándose en el consumo, pérdida y recuperación de energía se pueden hacer cálculos empíricos de los requerimientos de energía.

Tanto lípidos, carbohidratos como proteínas son fuentes disponibles de energía para los organismos marinos. Sin embargo la disponibilidad de energía provenientes de carbohidratos es variable dependiendo de la especie de la que se este hablando (NRC, 1993). En el caso particular del abulón se ha demostrado que poseen la capacidad de utilizar los carbohidratos como fuente energética. (Knauer et al., 1996).

REQUERIMIENTOS DE PROTEINA

No obstante la importancia de la energía, generalmente se da prioridad a las proteínas dado a su alta inclusión en la dieta y elevado costo. En la alimentación animal, la proteína generalmente esta referida a proteína cruda; esto es NX6.25, basado en que la proteína

contiene 16% de N. Los requerimientos de proteína, considerado como la cantidad de proteína requerida para asegurar un máximo crecimiento, ha sido determinada para numerosas especies de peces e incluso del abulón, que en general han sido obtenidas mediante la repuesta en ganancia de peso a un incremento de proteína de alta calidad (Fleming, 1996; NRC, 1993). Los niveles de proteína requeridos para un óptimo crecimiento por parte de los peces es mucho mayor que para animales omnívoros. El principal producto de desecho de compuestos nitrogenados en peces es el amonio. Las tasa de deposición de proteína con respecto a la proteína ingerida son en general menores que las obtenidas para animales omnívoros homeotérmicos. Sin embargo la cantidad de proteína depositada por unidad de energía consumida es mayor en peces que en aves y mamíferos omnívoros. Por medio de estudios de calorimetría directa se ha obtenido que la mayor eficiencia de utilización de la proteína en peces se debe no solo a su características de poiquiloterms, de la menor energía requerida para locomoción sino también a que la acción dinámica específica es mucho menor que en aves y mamíferos, lo cual es resultado de ser organismos aminotelicos (Cowey, 1980).

RAZON PROTEINA:ENERGIA

Existen tres importantes aspectos que deben de ser considerados en la retención de nitrógeno: cantidad de nitrógeno consumido, calidad de la proteína y energía en la dieta. La proteína y la energía interactúan porque: a) la proteína provee parte de la energía de la dieta y es su vez parte de la energía almacenada b) la energía es necesaria para la síntesis, degradación y deposición de proteína (Boorman, 1980; Fleming et al., 1996).

El porcentaje de la energía total derivada tanto de ingredientes no proteicos como proteicos puede ser expresado en función de la razón existente entre la proteína y la energía en la dieta (energía:proteína o proteína:energía). Cuando es expresado como proteína:energía se esta expresando que el consumo de alimento va a estar dado principalmente por el requerimiento de energía mas que por el de proteína (Steffens, 1989).

Debido a la importancia de la razón proteína:energía, se han realizado numerosos estudios en peces (Li and Lovell, 1992; Daniels and Robison, 1986; Nematipour et al., 1992; Coloso et al., 1988), observándose valores promedios entre 81 mg/kcal a 117 mg/kcal que son substancialmente mayores que en cerdos y aves en los que varía entre 40 y 60 mg/kcal. La causa de que la razón proteína:energía sea mayor en peces que en animales domésticos, puede ser explicada dado que los peces requieren menor energía de mantenimiento (poiquiloterms) y por el tipo de excreción de compuestos nitrogenados (amonio) (NRC, 1993).

En cuanto a la estimación de requerimientos tanto de energía como de proteína se sabe que es particular a cada etapa del desarrollo de un organismo (Fleming et al., 1996).

REQUERIMIENTOS DEL ABULON

En el caso particular del abulón a pesar de que aun no se cuenta con suficiente información existe una gran variación en los requerimientos reportados donde, en el caso de proteína se recomienda desde un 20 hasta un 50%, en carbohidratos entre 30 y 60%, en lípidos entre 1.5 y 5.3% y en fibra entre 0 y 3% (Fleming et al., 1996). Sin embargo existen solo dos estudios relacionados a la razón proteína:energía que se debe de tener en una dieta existen solo dos estudios: 1) Bautista-Teurel (1999) en este trabajo se balancearon diferentes razones proteína:energía sin embargo también se variaron las razones a las que se incluyeron las principales fuentes proteicas. Este trabajo además se encuentra muy enfocado a comparar con una alimentación en base a macroalgas. 2) Por otro lado, Britz, (1997) realizó un estudio en el que las diferentes razones proteína:energía se obtuvieron por medio de la inclusión de diferentes niveles de lípidos, en este estudio una de la principales conclusiones es que dietas con altos niveles de lípidos (10%) resultan en un efecto negativo sobre el crecimiento.

En el presente trabajo se formularon diferentes razones de proteína:energía manteniendo el perfil al que se incluyeron las principales fuentes proteicas a fin de mantener un perfil de aminoácidos similar entre dietas y parecido al del tejido del abulón (Fleming et al., 1996). Así mismo se mantuvieron los perfiles de inclusión de las diferentes fuentes lipídicas. De tal manera que para obtener las diferentes razones se varió la inclusión de almidón. Los carbohidratos se eligieron para este fin ya que como se mencionó anteriormente se sabe que el abulón es capaz de utilizar los carbohidratos como fuente energética, mientras que por otro lado existen reportes de que altos niveles de inclusión de lípidos pueden tener un efecto negativo sobre el crecimiento (Britz, 1997). Por otro lado no solo fue el crecimiento la única variable de respuesta sino que también se midieron diferentes componentes del balance energético como lo son la digestibilidad y mediciones de consumo de oxígeno.

Effect of dietary protein:energy ratio on intake, growth and metabolism of juvenile green abalone *Haliotis fulgens*

Laura Gómez-Montes¹, Zaul García-Esquivel², Louis R. D'Abramo³, Armando Shimada⁴
Carlos Vásquez-Peláez⁵ and María Teresa Viana^{2*}

¹Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Cuautitlán-Izcalli, Méx. México.

²Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C. México

³Department of Wildlife and Fisheries, Mississippi State University, Box 9690, MS 39762, USA.

⁴Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM, Ajuchitlán Qro. México.

⁵Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Ciudad Universitaria, DF, México.

*Corresponding author. PO Box 453. Ensenada, B.C. 22860. México. viana@uabc.mx

Abstract

Juvenile green abalone *Haliotis rufescens* were grown under laboratory conditions at 21°C±1.0 and fed formulated diets consisting of different protein:energy ratios (mg protein/kcal/g), 62, 74, 85, 100, 108. The level of crude protein varied from approximately 26 to 44% while the energy content remained constant at about 4.1 kcal g⁻¹. Growth,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

expressed as mg/day, ranged from 3.63 to 12.33 mg day⁻¹. The growth of abalone fed the 100 and 108 diets were significantly greater than that of each of the other diets. Protein efficiency ratio increased as the dietary protein content increased except for the T108 diet (44 % crude protein). Abalone apparently consume food to satisfy an energy requirement. Caloric expenditure due to metabolism was estimated for abalone fed diets with protein ratios of 62, 85 and 100. Energy loss due to respiration did not vary appreciably among abalone fed the different diets. The proportional distribution of dietary energy into fecal, digestible, growth, and metabolic energy was estimated for abalone fed these diets. The highest loss of energy due to digestion was for the 100 P:E diet, but growth of abalone fed this diet was significantly higher than that of all other treatments except that of abalone fed the 108 diet. Unexplained energy loss to achieve balance ranged from 7 to 28.5 %, some of which can be attributed to differential mucus and ammonia production. Results suggest that there is potential for the reduction of both dietary protein and lipid without any correspondingly adverse effects on the growth response.

Keywords: abalone; protein:energy ratio; metabolism; nutrition; physiology

1. Introduction

In abalone culture, as encountered in most aquaculture enterprises, feed represents the major component of operational cost (Avault, 1996). An understanding of nutritional requirements is important to optimize delivery of the nutrients. Bautista-Teurel and Millamena (1999) suggests that feed intake in the abalone depends on caloric content. This intake response has been suggested already for other aquatic species (De la Higuera, 2001).

Thus, to achieve optimum growth, dietary nutrients should be balanced properly to fulfill requirements of essential nutrients and energy (Smith, 1989). Moreover, the true nutritive value of a formulated diet is determined by not only ingredient composition but also the bio-availability of the nutrients present. Dietary energy available for tissue metabolism is termed the apparent feed digestibility, which is the proportion of absorbed dietary nutrients relative to the amount of feed ingested (Lee and Lawrence, 1997).

The requirement for protein is based upon three important factors: nitrogen intake, protein quality and dietary energy (Boorman, 1980). Energy partitioning in fish is similar to that observed in mammals and birds, but several quantitative differences result in the fish being more efficient, especially in the assimilation of protein-rich feeds. Digestible energy losses in urine and gill excretions are lower in fish because almost 85% of the nitrogenous waste is excreted as ammonia (Steffens, 1989) instead of urea (mammals) or uric acid (birds). The energy requirement for fish may be determined by either calorimetry or growth response (NRC, 1993). To evaluate useful energy in fish feeds, the metabolizable energy (ME) gives a better overview than the digestible energy (DE), because loss of energy in digestion accounts for most of the variations in recoverable energy. However in an ammoniotelic organism like the abalone, both DE and ME are considered equal, because the loss associated with ammonia excretion is not significant (Steffens, 1989).

Many studies that address the protein requirement of fish (Li and Lovell, 1992; Daniels and Robison, 1986; Nematipour et al., 1992; Coloso et al., 1988), exist but only a few studies have investigated the protein requirement of abalone. A simple dose-response (Coote et al., 2000; Britz, 1996; Mai et al., 1995a) to diets containing graded levels of protein has been used to eliminate the protein requirement of abalone. However, no reports

that examine the energy requirements of abalone, a factor that influences the protein requirement, are available (Boorman, 1980). Bautista-Teruel and Millamena (1999), used a regression analysis from the response of juvenile abalone to 3 formulated diets with different protein and energy content, that the optimum dietary protein level was 27% at an energy level of $3.2 \text{ kcal} \cdot \text{g}^{-1}$ metabolizable energy. However, in this study the relative proportion of the protein sources was not maintained among the different dietary treatments. Therefore, differences in response could be attributed to differential amino acid composition rather than the protein:energy ratio. Britz and Hetch (1997) fed nine different formulated diets consisting of 3 different protein levels, each with 3 different levels of lipids, to abalone and observed significant differences in weight gain, nutritional indices and body composition. The combination of levels of 34% protein and 2-6% lipid was found to be optimum for growth. In the latter study, only lipid levels were varied to achieve the different protein:energy levels. It is known that abalone requirements for lipid are low (Mai et al., 1995b) and carbohydrates are a more appropriate source of energy (Knauer et al., 1996; Monje and Viana, 1998) to use to balance the various protein:energy ratios.

The goal of this study was to evaluate the effect of different dietary protein:energy ratios with the same amino acid and lipid profiles on intake, growth and oxygen consumption in the juvenile green abalone *Haliotis fulgens*.

2. Materials and Methods

2.1. Diet preparation

Five diets were formulated (Table I) to contain increasing protein:energy ratios (mg protein:kcal⁻¹), 62 (260:4.2); 74 (310:4.2); 85 (350:4.1); 100 (405:4.1); 108 (441:4.1). The primary sources of protein were fishmeal and isolated soybean protein (92% CP), added at a 2:1 ratio to ensure a common amino acid profile among diets, and reflect the proportional composition of abalone soft tissue (Fleming et al., 1996). Cornstarch was added to maintain a similar total energy content among diets as the protein level decreased, whereas macroalgae meal was added as a filler. The fish oil and corn oil ingredients were maintained at a 7:1 ratio in all dietary treatments. Additional fish oil was added as necessary to compensate for the loss of lipid arising from the reduction in the fishmeal ingredient. The compositions of the vitamin and mineral mixtures were those recommended by Hahn (1989). All ingredients were blended to produce a homogeneous mixture. The diet was then cold extruded through a pasta machine into 2 mm thick sheets. Pieces of 0.5 x 0.5 cm were cut and then dried at 60°C for 24 h. Triplicate samples of each of the diets were tested for water stability before and during measurements of intake by immersing 10 pellets of each diet within seawater held in control buckets (no animals inside). After 12 hours of immersion, the amount of remaining feed (dry matter) and its proximate composition were determined.

2.2. Proximate Analysis

Dry weight of each diet was calculated as the dried residue weight of triplicate samples (4-5g) after drying to constant weight at 60°C. Mean total nitrogen content was determined from samples analyzed by the micro-Kjeldahl method (AOAC, 1990), and crude protein was then calculated as %N x 6.25. Mean total dietary lipid was determined gravimetrically after being extracted from the different diets with methanol-chloroform, eluted with dichloromethane, and vacuum dried according to the method of Blight and Dyer (1959) method, as explained by García-Esquivel et al. (2001). Mean ash content was determined by heating samples of each diet to 550°C for 4h. The total grass energy content of each diet was determined by direct combustion in an adiabatic calorimeter Parr 1281. Samples of the tissue of experimental abalone from each dietary treatment were collected at the end of the experiment, and frozen at -80°C for subsequent analysis. Proximate analyses of the soft body tissue were performed according to the previously described procedures.

2.3. Experimental Procedure

Abalone were initially fed an exclusive diet of *Navicula inserta* for 5 months (9.073 ± 0.68 mm and 0.083 ± 0.016 g). For the next two months, all abalone were exclusively fed the 85 diet. A total of 330 specimens with an average shell length and weight of 11.84 ± 1.003 mm and 0.20 ± 0.051 g respectively, were selected for the growth trials. Each experimental unit, defined as a growing chamber, consisted of an ABS black pipe tube holding container fitted with a plastic net floor of 1 x 1 mm mesh, located at 3cm from the pipe bottom. Each chamber contained 22 abalone and was held within a 5L

bucket (with black walls) in a flow-through system (300-ml min⁻¹) with constant air and temperature (21°C±1). There were three replicates for each dietary treatment, randomly assigned to a total of 15 experimental units. A photoperiod of 12:12 L:D was maintained throughout the experiment. Diets were provided at 2000h (*ad libitum*) every night for 2 months. After 12h, any unconsumed diet was removed. Total feed intake (F) was measured during the last 8 days of each of the two months of the experiment. Daily dry matter loss from pellets in control chambers without abalone was used to adjust the feed intake that was estimated as:

$$F = [G (S/100)] - R \quad (1)$$

where G represents the amount of feed offered, S is the recovered feed from the control buckets, and R the remaining feed in the containers with the experimental abalone. The mean daily rate of feed intake for each treatment was then calculated per day as a percentage of body weight of the abalone. Every four weeks length was measured with an electronic digital caliper (±0.01 μm) and weight determined with an electronic scale (0.01 g error).

The following nutritional indices were calculated for all treatments during the days when feed intake was measured:

$$\text{Feed conversion efficiency, FCE} = 100 (\text{g wet weight gain}) / (\text{g feed intake}) \quad (2)$$

$$\text{Protein efficiency ratio, PER} = (\text{increase in body wet weight}) / (\text{protein intake}) \quad (3)$$

Specific growth rate (SGR, % d⁻¹) was estimated according to Hopkins (1992)

$$\text{SGR} = (\ln (w_t) - \ln (w_i)) / t * 100 \quad (4)$$

where ln (w_t) is the natural logarithm of the weight at time t and ln (w_i) is the natural logarithm of the initial weight.

At the end of the growth trial, the experimental abalone were used to determine digestibility of each of the experimental diets. In addition, oxygen consumption of abalone representing three (62, 85 and 100) of the five protein energy treatments was determined.

2.4. Digestibility

The experimental abalone were held in the same buckets used for the growth experiment under similar experimental conditions. A plastic plate adjusted at the bottom of the growing chambers was used to collect the feces to avoid the adverse effects of leaching caused by water flow inside. To avoid the collection of uneaten diet with feces, feces were collected during the daytime (12h) after the uneaten daily dietary ration had been removed and prior to the next daily feeding. Centrifuged feces were washed with ammonium formate to eliminate salts of seawater, and then stored at -80°C . After 60 days of fecal collection, all samples from each experimental unit were pooled, lyophilized and analyzed.

Apparent digestibility of the protein and energy of the diets was calculated using the following equation:

$$\text{ADC} = 100 - \left(\left(\frac{\text{N}_{(\text{feces})}}{\text{N}_{(\text{feed})}} \right) * \left(\frac{\text{I}_{(\text{washed feed})}}{\text{I}_{(\text{feces})}} \right) \right) * 100 \quad (5)$$

where ADC = apparent digestibility coefficient, N = nutrient (protein or energy), I = indicator (ash). The ash content of the feed after 12h of water immersion was the value used (Table 1).

2.5. Oxygen consumption

Half of the abalone (11) from each of the 62, 85 and 100 treatments were separated and introduced into respiration chambers that were 1.8L acrylic containers. At the bottom of each chamber, the abalone were placed on a perforated plate positioned above a small magnetic stir bar that maintained an efficient mixing of water during incubations. Oxygen consumption was recorded with two computer-controlled polarographic oxygen sensors (Strathkelvin Instruments Ltd., Ireland) with 6 channels each during 1-1.5h incubations conducted every 4h during a period of 48h. The rate of oxygen consumption ($\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) was calculated for each incubation from the slope of the O_2 evolution curve, after subtraction of O_2 consumption in chambers without animals (control). The following equation was used to calculate oxygen consumption:

$$VO_{2e} = (Cs * m * 60) / (100\% * Wwt) \quad (6)$$

where VO_{2e} corresponds to the rate of oxygen consumption of the experimental organism ($\mu\text{L O}_2 \text{ h}^{-1}$); Cs is the total amount of O_2 in the incubation chamber at 100% saturation ($\mu\text{L O}_2$); m is the slope of the O_2 evolution curve ($\% \text{O}_2 \text{ min}^{-1}$); Wwt is the sum of the live weight of experimental organisms in the incubation chamber. At the end of each period, (48h) the experimental abalone were measured (weight and length) as described before. Oxyenthalpic equivalents were calculated by multiplying the percent composition of crude protein, lipid and carbohydrates in the pooled samples of abalone (1 or 3 animals depending on their size per each replicate) by their oxyenthalpic values given by Gnaiger (1983) resulting in the following values -459 , -456 , and $-455 \text{ KJ mol O}_2^{-1}$ for organisms from 62,

85 and 100, respectively. Total expenditure of metabolic energy per day was calculated by multiplying the average metabolic rate by 24h.

2.6. Energy balance

Energy partitioning was based upon the energy balance equation $I=P+R+F+U$ (Lucas, 1996) where I corresponds to caloric intake, and P (production); R, (respiration), F (feces) and U (excretion) correspond to the different components of energy expenditure. Thus, at the end of the experiment, absolute values for intake were obtained from the dietary intake expressed as a percent of body weight, and for growth as weight gain obtained from the specific growth rate equation (SGR) (Houlihan, 1990). The digestible energy (DE) was obtained by multiplying the apparent digestibility by the feed intake, whereas the fecal energy (F) was estimated by difference between the energy consumed and digestible energy. Energy losses due to ammonia excretion and the production of mucus were not included. Loss of energy due to production of mucus is assumed to be an important component of the energy budget of abalone (Peck, 1987; Davis and Williams, 1995).

2.7. Statistical Analysis

Growth expressed as final body weight (log transformed) and shell length of the abalone fed the different diets were analyzed in a two way analysis of variance, five diets and two periods of 30 day each. Diet and interaction were estimated using orthogonal contrasts. Digestibility of dry matter, protein and energy was analyzed using a one-way analysis of variance model (SAS 2002). The daily feed intake based upon measurement

during 16 days was calculated and compared among treatments using a two-way (period and treatment) analysis of variance. The feed intake expressed as g of crude protein and calories per g organism, was estimated as the total weight plus the daily increment for each day when feed intake was measured. FCE and PER were calculated using the daily growth increments and the corresponding daily feed intake (dry matter and protein content, respectively) for the 16-days period where feed intake was measured.

3. Results

The analytically determined, proximate composition and caloric content of the different diets correspond well to the intended compositions based upon the dietary formulations (Table 1). After 12h immersion in seawater, ash content decreased between 66 and 74% of the known level prior to immersion (Table 1). Throughout the experiment, stability for the 62 and 74 diets (88.9 and 87.3%, respectively) in the control (without abalone) buckets was significantly higher than that for the rest of the diets ($P < 0.001$). Feed intake, expressed as a percentage of body weight, was significantly higher for the 62, 100 and 108 treatments (1.61, 1.54 and 1.65% respectively) compared to 1.43% for the 74 and 85 treatments. Moreover, feed intake, expressed as calories g^{-1} org ranged from 59 to 67 with no relationship to the protein:energy ratio. Feed intake, expressed as crude protein g^{-1} org, was significantly different among treatments (Table 2), being the lowest for the 62 treatment and the highest for the 108 treatment (4.13 and 7.29 mg CP g^{-1} org, respectively). This difference was reflective of the larger size of abalone in the 108 treatment.

After 61 days, significant linear and quadratic effects $P < 0.01$ for time and cubic trend for diets were observed for weight $P < 0.01$, been the linear by linear interaction highly

important $P < 0.01$, for length linear trend for time, quadratic trend for diet and the same linear by linear interaction were observed $P < 0.01$. Growth rate as measured by length increase, was maximum for abalone fed the 100 and 108 diets (123.42 ± 2.48 and $122.86 \pm 6.57 \mu\text{m d}^{-1}$, respectively), similar to the maximum values for growth rate expressed as weight increase (11.67 ± 0.82 and $12.33 \pm 1.07 \text{ mg d}^{-1}$, respectively). The SGR of abalone fed the 100 and 108 diets (2.43 and 2.52) yielded the highest values, followed by the 85 diet (1.86), with the lowest being for 62 and 74 diets (1.28 and 1.50, respectively). Maximum FCE was achieved with the 100 diet (138%) followed by the 108 and 85 diets (119.7 and 109.6%, respectively) with a minimum value for the 62 diet (74.4%). Similarly, the PER was highest for abalone in the 100 treatment (3.41) whereas abalone in the 108 treatment had the lowest value (2.71), but not significantly different from the rest of the treatments (Table 2). Abalone in the 62 dietary treatment had the significant highest rate ($P < 0.05$) of oxygen consumption ($133.3 \mu\text{L O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ org}$) whereas rates for dietary treatments 85 and 100 were similar (115.7 and $116.9 \mu\text{L O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ org}$, respectively).

The surface responses for growth (wt or length) are explained by the models: transformed $\text{wt} = -0.979 - 0.0055(\text{diet}) + 0.0003(\text{diet})^2 - 0.0000015(\text{diet})^3 - 0.12068(\text{period}) - 0.0375(\text{period})^2 + 0.009(\text{period} * \text{diet})$ ($R^2 = 0.8179$) and $\text{length} = 13.63 - 0.01(\text{diet}) + 0.0028(\text{diet})^2 - 1.148(\text{period}) + 0.046(\text{diet} * \text{period})$ ($R^2 = 0.82$).

The digestibility of dry matter, protein and energy decreased as the protein:energy ratio increased. The highest digestibility for dry matter, protein and energy was observed for diet 62 (62.8, 72.6 and 62.3%, respectively) and was lowest for diet 108 (46.6, 49.5 and 49.8%, respectively) (Table 2).

Crude protein ($P=0.052$), ash ($P=0.590$), nitrogen free extract ($P=0.386$) and energy content ($P=0.904$) of the soft tissue of abalone were not different among dietary treatments. Lipid content of abalone fed the 100 and 62 diets was higher than that observed for those fed the 85 diet ($P<0.05$) (Table 3).

The energy balance expressed as a percentage of dietary intake (Table 4) shows that energy loss due to respiration is similar among the three evaluated treatments. Energy used for growth is highest in 100, followed by 85 and lowest for 62 (22.83, 17.80 and 10.16%, respectively). The calculated digestible energy values, arising from the corresponding loss of energy in feces, ranged from 62.3, to 51.2. The unexplained energy losses, calculated by difference, for abalone from the 62, 85 and 100 dietary treatments were 28.49, 13.93 and 6.57%, respectively.

4. Discussion

Growth rates of abalone for the dietary treatments in this study were within a range of 61 to 123 $\mu\text{m day}^{-1}$. Under experimental conditions, rates from 50 to 100 $\mu\text{m day}^{-1}$ have been reported (Viana et al., 1996; Guzmán and Viana, 1998 and Viana et al., 2000). An acceptable growth rate for commercial culture has been estimated to be approximately 80 $\mu\text{m day}^{-1}$. Minor differences in caloric intake per gram organism were found among dietary treatments, suggesting that abalone consume food to satisfy an energy requirement that lies between 59 to 67 cal g^{-1} org. The influence of dietary caloric content on food intake in abalone was already proposed by Bautista-Teurel and Millamena (1999) as has been described for other aquatic species (De la Higuera, 2001).

Previous investigations that have focused on dietary protein requirements of abalone did not control caloric content. As a result, confusion concerning optimum protein sources or levels for growth (Coote et al., 2000; Britz, 1996; Mai et al., 1995a) has resulted. Fulfillment of the caloric need must be balanced by sufficient provision of other nutrients needed for growth. In the present study, the main sources of protein were included in equal proportions to maintain similar amino acid profiles.

The highest growth of abalone in the present work was observed for diets 100 and 108 and is most probably attributed to the higher intake of crude protein as described by Britz (1996). Attempts to decrease the amount of protein in the development of practical diets for abalone currently prevail, whereas to achieve maximum growth, the protein deposition in abalone must be maximized. Therefore, formulated diets should contain a proper balance of appropriate sources of protein and energy. Experience with fish show that if the dietary protein is insufficient, lower growth rates are observed (Smith, 1989). If the dietary level of energy is insufficient in the diets, protein will be used as energy for maintenance (NRC, 1993). Nevertheless, to attain the best protein:energy ratio, the amino acid requirements need to be satisfied to reduce the waste of protein. As abalone utilize a wide range of levels of dietary starch without any negative effect, cornstarch has been described as a good carbohydrate source to balance experimental diets (Knauer et al., 1996).

Protein efficiency ratio (PER) is an important measure of the protein utilization efficiency. In the present work PER values improved from 2.96 to 3.41 as the protein:energy ratios increased to a maximum level for diet 100 and then decreased to 2.71 for the 108 diet. This relationship suggests that energy derived from non-protein sources

was always sufficient for the synthesis of protein but that more protein was used as a source of energy by abalone feeding on diet 108. Britz and Hetch (1997) calculated a PER of 3.3 for a diet that had a protein:energy ratio of 104 mg kcal⁻¹, and yielded the maximum growth rate for *Haliotis midae*.

Digestibility values for the different experimental diets in this investigation varied among treatments and are within the ranges reported previously by different investigators. Maguire et al. (1993) reported that crude protein and dry matter digestibility ranged from 64.1 – 74.9% and 50.9 – 64.6, respectively, for three diets with crude protein content that ranged from 19.2 to 42.0%.

In our study, use of total mineral content (ash) as a marker for digestibility was a questionable choice because a high percentage of minerals are applied to shell growth. As a result, digestibility values are somewhat underestimated. In fact, in parallel research activities conducted in this lab, acid insoluble ash has been demonstrated to be a good marker with good sensitivity achieved with fecal samples as small as 200mg (Montaño-Vargas et al., in press). However in the present work fewer amounts of feces than that could be collected due to the small size of the experimental units, and therefore total ash was used as marker. Future digestibility studies should be designed so that determinations with small amounts of feces can be achieved. Otherwise greater amounts need to be collected from larger experimental units or for longer periods of time.

Sales and Britz (2001) reported that 32% of the caloric feed intake of a wild abalone is lost as respiration, slightly higher than that obtained in the present work. The energetic cost of mucus production was not considered in the present work and may partially be

attributed to some of the unexplained energy loss in the energy balance for the different dietary treatments.

The results suggest that, if the proper protein energy ratio is maintained, a reduction in the dietary level of protein can be achieved without any significant loss in growth. Also, a decrease in the levels of dietary lipid may also be possible, as suggested by the efficient use of dietary carbohydrates as an energy source. With a reduction in lipid, care must still be exercised to ensure that essential fatty acid requirements are satisfied. The reduction in lipid will also assist in achieving success in the commercial manufacturing process. Although not complete, the presentation of energy balance from the data obtained in this study is still well founded and provides a good perspective into the understanding of the bioenergetics of cultured abalone.

Acknowledgements

This work was supported by the National Council for Science and Technology (CONACyT), Project G28119B. Zaul Garcia-Esquivel was partially founded by grant FOSINVE 002-DE. Special thanks to Silvia Montes, Oscar Chacón and Alberto Granados for their valuable help during the respiration monitoring phase of the experiment. Also to Roberto Escobar and Marco Gonzalez for helping with the chemical analysis and Gildardo Rojo and Enrique Valenzuela for taking care of the abalone in previous stages before the experiment.

References

- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis, 15th edn., vol. 1. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Avault, J.W., 1996. Your Business Plan. In: Fundamentals of aquaculture. AVA Publishing Company Inc. USA.
- Bautista-Teruel, M.N. and Millamena, O.M., 1999. Diet development and evaluation for juvenile abalone, *Haliotis asina*: protein/energy levels. Aquaculture 178, 117-126.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.
- Boorman, K.N., 1980. Dietary Constraints on Nitrogen Retention. In: Buttery, P.J., Lindsay, D.B. (Eds.), Protein Deposition in Animals. Butterworths, London, pp. 147-166.
- Britz, P.J. and Hetch, T., 1997. Effect of dietary protein and energy level on growth and body composition of South African abalone, *Haliotis midae*. Aquaculture 156, 195-210.
- Britz, P.J., 1996. Effect of dietary protein level on growth performance of South African abalone, *Haliotis midae*, fed fish meal-based semi-purified diets. Aquaculture 140, 55-61.
- Coote, T.A., Hone, P.W., Van Barneveld, R.J. and Maguire, G.B., 2000. Optimal protein level in a semipurified diet for juvenile greenlip abalone *Haliotis laevis*. Aquaculture nutrition 6, 213-220.

- Coloso, R.M., Benitez, L.V. and Tiro, L.B., 1988. The effect of dietary protein-energy levels on growth and metabolism of milkfish (*Chanos chanos* Forsskal). *Comp. Biochem. Physiol.* 89A, 11-17.
- Daniels, W.H. and Robinson, E.H., 1986. Protein energy requirements of red drum. *Aquaculture*, 52, 232-243.
- Davies, M.S. and Williams, G.A., 1995. Pedal mucus of a tropical limpet, *Cellana grata* (Gould): energetics, production and fate. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 186, 77-87.
- De la Higuera, M., 2001. Effects of Nutritional Factors and Feed Characteristics on Feed Intake. In: Houlihan, D., Boujard, T., Jobling, M. (Eds.), *Food intake in fish*. Blackwell Science, London, pp. 250-268.
- Fleming, A.E., Van Barneveld, R.J., Hone, P.W., 1996. The development of artificial diets for abalone: a review and future directions. *Aquaculture* 140, 5-53.
- García-Esquivel, Z., Bricelj, V.M. and González-Gómez, M.A., 2001. Physiological basis for energy demands and early postlarval mortality in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. of Exp. Mar. Biol. and Ecol.* 263, 77-103.
- Gnaiger, E., 1983. Appendix C Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. In: Gnaiger, E., Fostner, H. (Eds.), *Polarographic Oxygen Sensors. Aquatic and Physiological Applications*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 337-345.
- Guzmán, J.M. and Viana, M.T., 1998. Growth of abalone *Haliotis fulgens* fed diets with and without fishmeal compared to a commercial diet. *Aquaculture* 165, 321-331.

- Hahn, K.O., 1989. Nutrition and growth of abalone. In: Hahn, K.O. (Ed.), CRC Handbook of Culture of Abalone and other Gastropods. CPR Press, Boca Raton, FL. pp. 135-156.
- Hopkins, K.D., 1992. Reporting Fish Growth: A Review of the Basics. J. World Aquacult. Soc., 23 (3):173-179.
- Houlihan, D.F., McMillan, D.N., Agnisola, C., Trara Genoino, I. and Foti, L., 1990. Protein synthesis and growth in *Octopus vulgaris*. Marine Biology 106, 251-259.
- Knauer, J., Britz, P.J. and Hetch, T., 1996. Comparative growth performance and digestive enzyme activity of juvenile South African abalone, *Haliotis midae*, fed on diatoms and a practical diet. Aquaculture 140, 75-85.
- Lee, P.G. and Lawrence, A.L., 1997. Digestibility. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), Crustacean Nutrition: Advances in World Aquaculture. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. pp. 194-260.
- Li, M. and Lovell, R.T., 1992. Comparison of satiate feeding and restricted feeding of channel catfish with various concentrations of dietary protein in production ponds. Aquaculture 103, 165-175.
- Lucas, A., 1996. Bioenergetics of Aquatic Animals. Taylor & Francis, London, 168 pp.
- Mai, K., Mercer, J.P. and Donlon, J., 1995a. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. IV. Optimum dietary protein level for growth. Aquaculture 136, 165-180.
- Mai, K., Mercer, J.P. and Donlon, J., 1995b. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. III. Response to various levels of dietary lipid. Aquaculture 134, 65-80.

- Maguire, G.B., Wee, K.L. and Hindrum, S.M., 1993. Digestibility studies – The “ins” and “outs” of abalone guts. *Austasia Aquaculture* 7(1):42-45.
- Monje, H. and Viana, M.T., 1998. The effect of cellulose on the growth and cellulolytic activity of abalone *Haliotis fulgens* when used as an ingredient in formulated artificial diets. *J. Shellfish Res.* 17 (3), 657-662.
- Montaño-Vargas, J., Shimada, A., Vásquez, C. and Viana, M.T., 2002. Methods of measuring feed digestibility in the green abalone (*Haliotis fulgens*). *Aquaculture in press*.
- Nematipour, G.R., Brown, M.L. and Gatlin, D.M., 1992. Effect of dietary protein:energy ratio on growth characteristics and body composition of hybrid striped bas, *Morone chrysops* x *M. saxatilis*. *Aquaculture* 107, 359-368.
- National Research Council (NRC), 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Research Council. National Academy Press. Washington, DC.
- National Research Council (NRC), 1983. Nutrient Requirements of Warm water Fishes and Shellfishes. National Research Council. National Academy Press. Washington, DC.
- Peck, L.S., Culley, M.B. and Helm, M.M., 1987. A laboratory energy budget for the ormer *Haliotis tuberculata* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 106, 103-123.
- Sales, J. and Britz, P.J., 2001. Evaluation of different markers to determine apparent nutrient digestibility coefficients of feed ingredients for South African abalone (*Haliotis midae* L.). *Aquaculture* 202, 113-129.
- SAS Institute Inc., SAS Procedure Guide, Version 8. Cary, NC:SAS Institute Inc., 2002.
- Smith, R.R., 1989. Nutritional Energetics. In: Halver, J.E. (Ed.), *Fish Nutrition*. Second edition Academic Press pp. 1-29.

Steffens, W., 1989. Principles of fish nutrition. Ellis Horwood Limited, John Wiley & Sons, NY, USA, 384 pp.

Viana, M.T., Jarayabhand, P. and Menasveta, P., 2000 Evaluation of an artificial diet for use in the culture of the tropical abalone *Haliotis ovina*. J. Aquacul. in the Trop. 15 (1), 71-79.

Viana, M.T., Lopez, L.M., Garcia-Esquivel, Z., Mendez, E., 1996. The use of silage from fish and abalone viscera as an ingredient for abalone feed. Aquaculture 140, 87-98.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Table 1. Ingredient composition (% dry weight) of experimental diets. Proximate composition and energy content of diets with ash content after 12 hours of immersion in seawater (n=3) is also given.

Ingredients	TREATMENTS				
	T62	T74	T85	T100	T108
Fish meal ^a	18.00	22.00	26.40	31.40	35.00
Soybean protein isolate ^b	9.00	11.00	13.20	15.70	17.50
Kelp meal ^c	7.13	9.53	12.23	15.23	17.43
Cod liver oil	5.30	4.90	4.40	3.90	3.50
Corn oil	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Modified corn starch ^d	43.20	35.20	26.40	16.40	9.20
Common ingredients*	16.87	16.87	16.87	16.87	16.87
Proximate Composition					
Dry matter (%)	94.16	94.24	94.70	95.13	95.25
Crude protein (%)	25.79	30.88	34.92	40.45	44.09
Total lipid (%)	5.98	6.32	6.27	6.75	6.66
Ash (%)	12.85	15.26	18.07	21.27	23.22
Energy (kcal g ⁻¹)	4.154	4.154	4.130	4.056	4.064
Protein:energy ratio	62.1	74.3	84.6	99.7	108.5
After 12 hours seawater immersion					
Ash (%)	9.45±0.20	11.38±61	12.07±0.50	13.94±0.21	15.23±0.46

* Kindly provided by Proesa, SA de CV; ^b ICN Biomedical (92% CP); ^c Kindly provided by Productos del Pacifico SA de CV; ^d

Modified corn starch (Clearjel®).

* Cellulose (sodium carboxymethyl cellulose), 2.0; vitamin mixture (Roche), 1.5; Stay-C (Roche), 0.4; mineral mixture (Roche), 3.3; DL methionine, 0.23; sodium benzoate, 0.23; choline chloride, 0.11; BTH, 0.09; Tocopherol, 0.01; acid fish silage from tuna fish viscera, 3.0; gelatin (275 bloom), 6.0.

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

Table 2. Biological indices obtained in the juvenile green abalone (*Haliotis fulgens*) fed diets containing different protein:energy ratio. Standard errors are given.

	TREATMENTS				
	T62	T74	T85	T100	T108
Stability (\pm SD) ^a	88.93 \pm 0.40 ^a	87.27 \pm 0.48 ^a	84.76 \pm 0.37 ^b	81.72 \pm 0.89 ^c	80.64 \pm 0.33 ^c
Intake (%BW)	1.61 \pm 0.05 ^a	1.43 \pm 0.05 ^b	1.43 \pm 0.05 ^b	1.54 \pm 0.05 ^{ab}	1.65 \pm 0.05 ^a
Intake (cal g ⁻¹ org)	66.84 \pm 2.06 ^a	59.43 \pm 2.03 ^b	59.02 \pm 2.03 ^b	62.38 \pm 2.03 ^{ab}	67.20 \pm 2.03 ^a
Intake (mg of CP g ⁻¹ org)	4.15 \pm 0.17 ^a	4.42 \pm 0.17 ^d	4.99 \pm 0.17 ^c	6.22 \pm 0.17 ^b	7.29 \pm 0.17 ^a
Length change (μ m day ⁻¹)	61.11 \pm 0.90 ^d	72.09 \pm 0.90 ^c	91.71 \pm 0.90 ^b	123.42 \pm 0.90 ^a	122.86 \pm 0.90 ^a
Weight change (mg day ⁻¹)	3.63 \pm 0.18 ^d	5.03 \pm 0.45 ^c	6.83 \pm 0.18 ^b	11.67 \pm 0.18 ^a	12.33 \pm 0.18 ^a
SGR (% d ⁻¹)	1.28 \pm 0.01 ^d	1.50 \pm 0.00 ^c	1.86 \pm 0.03 ^b	2.43 \pm 0.01 ^a	2.52 \pm 0.01 ^a
FCE (%)	76.40 \pm 5.0 ^d	93.30 \pm 4.9 ^c	109.61 \pm 4.9 ^b	137.95 \pm 4.9 ^a	119.65 \pm 4.9 ^b
PER	2.96 \pm 0.11 ^{ab}	3.02 \pm 0.11 ^{ab}	3.14 \pm 0.11 ^{ab}	3.41 \pm 0.11 ^a	2.71 \pm 0.11 ^b
μ l. O ₂ h ⁻¹ g ⁻¹ org	133.27 \pm 3.27 ^a	nd	115.69 \pm 3.27 ^b	nd	116.93 \pm 3.27 ^b
Digestibility (%)					
Dry matter	62.80 \pm 1.15 ^a	56.73 \pm 1.15 ^b	54.75 \pm 1.15 ^b	46.53 \pm 1.15 ^c	44.63 \pm 1.15 ^c
Protein	72.64 \pm 1.07 ^a	63.86 \pm 1.07 ^b	59.27 \pm 1.07 ^c	54.90 \pm 1.07 ^d	49.98 \pm 1.07 ^e
Energy	62.34 \pm 2.02 ^a	54.69 \pm 2.02 ^{ab}	54.77 \pm 2.02 ^{ab}	51.17 \pm 2.02 ^b	49.80 \pm 2.02 ^b

^a Values given as a percentage of remnant dry matter after 12h seawater immersion in g per 100 g of dry weight feed.

Values with different superscripts are statistically different.

nd, not determined

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Table 3. Final characteristics of green abalone (*Haliotis fulgens*) shell and soft tissue in response to treatments T62, T85 and T100 at the end of the experiment. Standard errors are given.

	TREATMENTS		
	T62	T85	T100
Shell (% dry basis weight)	76.85±0.89 ^a	73.44±0.89 ^a	70.91±0.89 ^b
Soft tissue (% dry basis weight)	23.15±0.89 ^a	26.56±0.89 ^a	29.09±0.89 ^b
Dry soft tissue (% of live weight)	10.51±0.64	11.29±0.64	11.64±0.64
Crude protein in soft tissue (%)	59.11±1.66 ^a	65.24±1.66 ^{ab}	65.77±1.66 ^b
Total lipid in soft tissue (%)	6.31±0.09 ^a	6.21±0.09 ^a	6.64±0.09 ^b
Ash in soft tissue (%)	10.35±0.62	9.46±0.62	9.66±0.62
Energy (kcal g ⁻¹ dry soft tissue)	5.127±0.16	5.028±0.16	5.061±0.16

Values with different superscripts are statistically different.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Table 4. Effect of protein:energy ratio on the energy balance of juvenile green abalone (*Haliotis fulgens*). For each treatment the cal and the percent contribution to each component of the energy budget equation is given.

	Protein:Energy ratio mg kcal ⁻¹					
	T62		T85		T100	
	cal	%	cal	%	cal	%
Intake (cal d ⁻¹)	27.80	100.00	36.44	100.00	57.70	100.00
Feces (cal d ⁻¹)	10.47	37.66	16.55	45.42	28.18	48.84
Digestible energy (cal d ⁻¹)	17.33	62.34	19.89	54.58	29.52	51.16
Respiration (cal d ⁻¹)	6.58	23.68	8.33	22.86	12.55	21.76
Growth (cal d ⁻¹)	2.83	10.16	6.49	17.80	13.17	22.83
Unexplained energy loss (cal d ⁻¹)	7.92	28.49	5.08	13.93	3.79	6.57

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

A diferencia de los estudios de nutrición para organismos terrestres, en los acuáticos hay que tomar ciertas consideraciones debido a que el alimento en el agua está sujeto a la pérdida por estabilidad y lavado de la materia seca y/o nutrientes respectivamente, lo cual por razones obvias tendrá consecuencia sobre la estimación del consumo. En el presente trabajo la estabilidad obtenida varió entre los diferentes tratamientos, yendo de 90 a 80% (dietas 62 y 108, respectivamente). Estas diferencias en estabilidad se debieron probablemente a variaciones en el contenido del almidón en el balanceo. Se sabe que el almidón presenta propiedades viscoelásticas (enlazante) (Britz et al., 1994; Durazo y Viana, 2001), sin embargo, al ser también una fuente energética, su incorporación como "enlazante" resultó limitada por tener que balancear a las diferentes razones de proteína:energía. Por lo anterior, cada consumo fue corregido por su propio paralelo (control) por triplicado realizado para cada tratamiento y cada día. Si bien el coeficiente de variación fue menor al 1% en cualquiera de los tratamientos (cuadro 1) por lo que puede considerarse como confiable la corrección en la medición de consumo, ésta es una de las mediciones de mayor incertidumbre en estudios de nutrición en organismos acuáticos y por lo tanto una de las más importantes de ser llevada a cabo con la máxima precisión posible. Los valores de consumo observados en el presente estudio (1.43 y 1.65% del peso vivo) se encuentran dentro del rango aceptado como un buen consumo (Sales y Britz, 2001b; Guzmán y Viana, 1998) además de reflejar buenas tazas de crecimiento (61-123 $\mu\text{m dia}^{-1}$). Una ganancia de 80 $\mu\text{m dia}^{-1}$ es considerada una buena tasa de crecimiento para *H. fulgens* en cultivos comerciales, mientras que en condiciones experimentales se han reportado tasas de entre 50 y 177 $\mu\text{m dia}^{-1}$ para esta misma especie bajo diferentes condiciones de estudio (Viana et al., 1993; Viana et al., 1996; Guzmán y Viana, 1998; Viana et al., 2000).

De la misma manera, los resultados de consumo expresados en unidades de energía (59 y 67 cal g^{-1}) sugieren que ésta fue la variable limitante del consumo total, donde el nivel de proteína y otros nutrientes de la dieta estarían jugando un papel secundario. El hecho de que el abulón consuma de acuerdo a las necesidades energéticas ya ha sido sugerido por

Bautista-Teurel y Millamena (1999), así como ha sido descrito para algunas especies de peces (De la Higuera, 2001). Aún cuando en el presente trabajo se observaron diferencias significativas en el consumo total (1.43 a 1.65% del peso vivo) y por ende en las calorías (59 y 67 cal g⁻¹), éste no obedece a la razón proteína:energía, al no haber una tendencia entre las diferencias, por lo que se piensa que dichas diferencias pudieron deberse al error asociado a la medición. Por lo anterior, se sugiere que abulones entre 0.17 y 1.02 g presentan un consumo alrededor de 63 cal g⁻¹.

Dada la importancia que representa la concentración de energía en la dieta sobre el consumo, es de suma importancia el asegurar la adecuada ingestión de nutrientes, requeridos para un óptimo crecimiento, cuando las necesidades energéticas han sido cubiertas. Así la razón proteína:energía debe de estar en un balance adecuado para que la energía consumida a partir de fuentes no proteicas sea la suficiente para satisfacer las necesidades energéticas básicas y de síntesis y deposición en tejido (Boorman, 1980; Smith, 1989).

En el presente trabajo la razón proteína:energía de 100 mg kcal⁻¹ resultó ser la más eficiente, similar a lo reportado para peces (Li and Lovell, 1992; Daniels and Robison, 1986; Nematipour et al., 1992; Coloso et al., 1988). Dicha razón es diferente a la observada en organismos terrestres, donde en cerdos y aves se reporta de 40 y 60 mg/kcal, respectivamente (NRC, 1993). Esta diferencia se debe a que los peces requieren menor energía de mantenimiento (poiquiloterms) además de ser aminotélicos, ya que éstos eliminan los compuestos nitrogenados (amonio) por difusión, con lo cual el gasto energético asociado a este proceso es mínimo (De Silva y Anderson, 1995; NRC, 1993). Esto puede entonces ser extrapolado a invertebrados marinos quienes también son poiquiloterms y aminotélicos y de ahí que la razón proteína:energía se parezca tanto.

Por otro lado, desde el punto de vista del nivel de proteína, las máximas tazas de crecimiento se observaron en las dietas que contenían 40 y 44% de proteína cruda. Entre estas dos no se observaron diferencias significativas en ganancia de peso, por lo que

podiera parecer que la cantidad de nitrógeno mínima requerida para la máxima ganancia de peso fuera de 40%. Dicho requerimiento coincide con lo reportado en peces (Bowen, 1987), sin embargo no se debe perder de vista el efecto que existió sobre el consumo, por lo que estos resultados no son solo el reflejo de la concentración de proteína, además de que el nivel habría que observarse más en cuanto a la ingestión de proteína cruda y no al nivel total en la dieta. Entonces sería interesante el estudiar dietas a una misma razón de proteína:energía pero con una concentración menor de proteína asegurando que el consumo de proteína diario sea similar para optimizar su uso. Además, no solo el nivel de proteína es importante, sino la calidad misma de ésta. Una manera sencilla de aproximar los requerimientos de aminoácidos ha sido el balancearlos en proporciones similares a las que presenta el tejido del organismo (Fleming et al., 1996). Aún cuando en el presente trabajo no se pretendía estudiar los requerimientos de aminoácidos dicho criterio se utilizó de tal forma que las principales fuentes proteicas se mantuvieron en las mismas proporciones (2:1, cuadro 1) en las diferentes dietas, con el fin de que el perfil de aminoácidos fuera similar a lo reportado para el tejido del abulón (Fleming et al., 1996). Una manera de evaluar si la calidad de proteína se acerca a un óptimo, es mediante la estimación del PER (eficiencia de utilización proteica), valores que aunque parezcan altos, son similares a los reportados por otros autores para el abulón (Fleming et al., 1996). Los valores de PER parecen altos al compararlos con lo reportado para peces (1.945) y otros vertebrados (1.965) (Bowen, 1987), dado que en los abulones la ganancia de peso, incluye al peso de la concha. Sin embargo, otro índice también utilizado es el PPV (valor neto de la proteína) que se refiere a la máxima eficiencia de retención proteica. En el presente trabajo no se mostraron esos índices, pero el mejor PPV fue de 29.9 proteína retenida / proteína ingerida para la dieta con 40% de proteína, con lo cual podemos suponer que el perfil de aminoácidos en las dietas se acercó a lo requerido por el abulón al encontrarse muy cercano a lo reportado para peces (31) y otros vertebrados (29) (Bowen, 1987).

Otro parámetro importante de ser medido es la digestibilidad, la cual junto con la eficiencia de retención proteica disminuyeron conforme la razón proteína:energía se incrementó. Lo anterior sugiere que una buena parte de la proteína no estaba siendo

utilizada en las dietas con mayor proteína:energía y donde la vía de pérdida pudieron ser las heces. Las digestibilidades obtenidas en el presente estudio se encuentran dentro de los rangos reportados por otros autores. Maguire et al. (1993) reporta digestibilidades de 64.1 a 74.9% para proteína cruda y de 50.9 a 64.6% para materia orgánica en dietas que tenían un contenido de proteína cruda entre 19.2 y 42%.

Sin embargo no debemos perder de vista que la digestibilidad fue calculada basándose en cenizas totales, lo cual no es el mejor método, dado que un alto porcentaje de los minerales puede estar siendo utilizado para el crecimiento de la concha y por otro lado se observó lavado de cenizas (26.5 - 34.4%) en el alimento durante las 12 horas en el que éste se encontraba inmerso en el agua. Por esta razón se consideró apropiado hacer una corrección por el lavado de cenizas en el alimento. De no realizarse dicha corrección la digestibilidad hubiera estado subestimada teniéndose valores de 49.0 - 11.8%, 62.8 - 20.1% y 48.8 - 19.8% para materia seca, proteína y energía, respectivamente. Así mismo el lavado también pudo estar sucediendo en heces (De Silva, 1995; Cuenca y García, 1987; De la Higuera, 1987), sin embargo esto no pudo ser cuantificado.

En el presente trabajo no se pudo realizar el método de cenizas insolubles que ha sido reportado como un marcador adecuado (Sales y Britz, 2001a; Montañó-Vargas et al., en prensa) debido a limitaciones analíticas, ya que para obtener la cantidad de muestra mínima reportada para determinar la concentración del marcador en heces (200 mg; Montañó-Vargas et al., en prensa) se hubiese requerido de una colecta diaria de por lo menos 195 días.

Previo a su incorporación en tejido, la energía se pierde no solo en heces sino también por la disipación de calor. Esta fue medida en tres de las cinco dietas formuladas, ya que éstas representaban las tasas de crecimiento alta, media y baja (100, 85 y 62, respectivamente). Los organismos con el menor consumo de oxígeno por unidad de peso fueron a su vez los que presentaron mayores ganancias de peso (cuadro 2). Este comportamiento es típico en la mayoría de las variables fisiológicas expresadas por unidad

de peso, las cuales disminuyen conforme aumenta la biomasa del organismo (Randall et al., 1998, Fitch, 1975). No obstante, cuando se expresó el consumo de oxígeno como porcentaje de la energía ingerida las diferencias entre tratamientos fueron mínimas (cuadro 4), lo cual sugiere que la disipación de calor R fue independiente de la razón proteína:energía. Es probable entonces que los principales componentes de respiración hayan sido el metabolismo basal y el nivel de actividad de los organismos, los cuales no dependen directamente de la dieta. En este sentido se ha demostrado que *H. fulgens* aumenta su metabolismo entre un 30 y 40% durante la noche, aun bajo condiciones de inanición crónica (Chacón, 2001)

En el balance energético expresado como porcentaje de la energía consumida se pudo observar que conforme se disminuyó la razón proteína energía la pérdida de energía que no pudo ser explicada por los componentes medidos (C, G, R) fue mayor (cuadro 4). Esta energía no explicada pudo estar sucediendo por dos vías: a) excreción de amonio y b) producción de moco. En el primer caso las pérdidas por excreción de amonio son mínimas en organismos aminotélicos y en *H. fulgens* se ha reportado para organismos entre 1 y 6 cm (Fariás et al., en proceso) que este representa entre 0.9 y 3.5% de la energía total ingerida, por lo que puede ser considerada despreciable. En contraste, la energía perdida por producción de moco puede llegar a ser tan importante como la de respiración (Peck et al., 1987; Davis y Williams, 1995), llegando a representar hasta un 23% de la energía consumida, por lo cual puede estar influyendo de una manera importante al balance energético realizado en el presente estudio.

En cuanto a la composición proximal del abulón se observaron diferencias significativas en el contenido de lípidos ($P=0.05$) lo cual coincide con lo reportado por Britz y Hetch (1997) en el que encuentra un mayor contenido de lípidos en dietas con mayor razón proteína:energía, aunque en ese estudio la fuente energética utilizada fueron los lípidos y en el presente trabajo fueron los carbohidratos, los resultados son muy similares, por lo que podríamos suponer que existe una formación de lípidos a partir de carbohidratos. Esto es explicado por la utilización de las fuentes energéticas, en la que

dado la alta disponibilidad de los carbohidratos la energía disponible es almacenada en forma de lípidos (NRC, 1993).

Los resultados sugieren que si se mantiene una adecuada razón de proteína:energía, existe la posibilidad de reducir el contenido de proteína sin que se presente un efecto negativo sobre el crecimiento. De igual manera dada la eficiencia de utilización de los carbohidratos como fuente de energía, parece ser posible el reducir el nivel de lípidos en la dieta, teniendo cuidado de mantener un adecuado suplemento de ácidos grasos esenciales. Así mismo a pesar de que el balance energético no pudo completarse con exactitud, éste representa un avance en el entendimiento de la bioenergética del abulón.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

- Alanärä, A., Kadri, S. and Paspatis, M., 2001. Feeding management. In: Food intake in fish. Houlihan D. Boujard T, & Jobling M (Eds). Blackwell Science, pp 332-353.
- Avault, J.W., 1996. Your Business Plan. In: Fundamentals of aquaculture. AVA Publishing Company Inc. USA.
- Bautista-Teruel, M.N. and Millamena, O.M., 1999. Diet development and evaluation for juvenile abalone, *Haliotis asina*: protein/energy levels. Aquaculture 178, 117-126.
- Boorman, K.N., 1980. Dietary Constrains on Nitrogen Retention. In: Buttery, P.J., Lindsay, D.B. (Eds.), Protein Deposition in Animals. Butterworths, London, pp. 147-166.
- Bowen, S.H., 1987. Dietary protein requirements of fishes – a reassessment. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 44, 1995-2001.
- Britz, P.J. and Hetch, T., 1997. Effect of dietary protein and energy level on growth and body composition of South African abalone, *Haliotis midae*. Aquaculture 156, 195-210.
- Britz, P.J., Hetch, T., Knauer, J. y Dixon, M.G., 1994. The development of an artificial feed for abalone farming. South African Journal Science. 90, 7-8.
- Chacón-Aguirre, O.A., 2001. Respuesta metabólica en el abulón azul (*Haliotis fulgens*): Ritmo circadiano y efecto de tres anestésicos. Tesis de maestría en ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, 46 pp.
- Coloso, R.M., Benítez, L.V. and Tiro, L.B., 1988. The effect of dietary protein-energy levels on growth and metabolism of milkfish (*Chanos chanos* Forsskal). Comp. Biochem. Physiol. 89A, 11-17.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Cowey, C.B., 1980. Protein metabolism in fish. In: Buttery PJ and Lindsay DB (Eds.). Protein deposition in animals. Butterworths. London, pp 271-288.
- Cuenca, E.M. y García, M., 1987. Ingesta y conducta alimentaria. En: Espinosa de los Monteros, y Labarta, U. (Eds.), Nutrición en acuicultura I. CAICIT, Madrid, pp. 1-65.
- Daniels, W.H. and Robinson, E.H., 1986. Protein energy requirements of red drum. *Aquaculture*, 52, 232-243.
- Davies, M.S. and Williams, G.A., 1995. Pedal mucus of a tropical limpet, *Cellana grata* (Gould): energetics, production and fate. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 186, 77-87.
- De la Higuera, M., 2001. Effects of Nutritional Factors and Feed Characteristics on Feed Intake. In: Houlihan, D., Boujard, T., Jobling, M. (Eds.), Food intake in fish. Blackwell Science, London, pp. 250-268.
- De la Higuera, M., 1987. Diseños y métodos experimentales de evaluación de dietas. En: Espinosa de los Monteros, y Labarta, U. (Eds.), Nutrición en acuicultura II. CAICIT, Madrid, pp. 291-318.
- De Silva, S.S. y Anderson, T.A., 1995. Fish nutrition in aquaculture. Chapman & Hall. London. 319 pp.
- Durazo-Beltrán, E. y Viana, M.T. Efecto de la concentración de agar, alginato y carragenano en la estabilidad, dureza y lavado de nutrientes en alimentos balanceados para abulón. *Ciencias Marinas* 27 (1), 1-19.
- Fitch, D.D., 1975. Oxygen consumption in the prosobranch snail *viviparous contectoides* (mollusca: gastropoda)-I. Effects of weight and activity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 51(A): 815-820.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Farías, A., García-Esquivel, Z. y Viana, M.T. Energetic physiology for the green abalone, *Haliotis fulgens* at different sizes fed on a balance diet. En proceso
- Fleming, A.E., Van Barneveld, R.J., Hone, P.W., 1996. The development of artificial diets for abalone: a review and future directions. *Aquaculture* 140, 5-53.
- Guzmán-Del Prío, 1992. Biología, ecología y dinámica de población del abulón (*Haliotis spp*) de Baja California, México. Tesis de doctorado en ciencias, Instituto Politécnico Nacional, 188 pp.
- Guzmán, J.M. and Viana, M.T., 1998. Growth of abalone *Haliotis fulgens* fed diets with and without fishmeal compared to a commercial diet. *Aquaculture* 165, 321-331.
- Gordon, H.R. and Cook, A.P.A., 2001. World abalone supply, markets and pricing: historical, current and future. *Journal of Shellfish Research* 20 (2), 567-570.
- Hahn, K.O., 1989. Nutrition and growth of abalone. In: Hahn, K.O. (Ed.), *CRC Handbook of Culture of Abalone and other Gastropods*. CPR Press, Boca Raton, FL. pp. 135-156.
- Jobling, M., 1983. A short review and critique of methodology used in fish growth and nutrition studies. *J. Fish Biol.*, 23, 685-703.
- Knauer, J., Britz, P.J. and Hetch, T., 1996. Comparative growth performance and digestive enzyme activity of juvenile South African abalone, *Haliotis midae*, fed on diatoms and a practical diet. *Aquaculture* 140, 75-85.
- Li, M. and Lovell, R.T., 1992. Comparison of satiate feeding and restricted feeding of channel catfish with various concentrations of dietary protein in production ponds. *Aquaculture* 103, 165-175.
- Lucas, A., 1996. *Bioenergetics of Aquatic Animals*. Taylor & Francis, London, 168 pp.

- Mai, K., Mercer, J.P. and Donlon, J., 1995. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. IV. Optimum dietary protein level for growth. *Aquaculture* 136, 165-180.
- Maguire, G.B., Wee, K.L. and Hindrum, S.M., 1993. Digestibility studies – The “ins” and “outs” of abalone guts. *Austasia Aquaculture* 7(1):42-45.
- Montaño-Vargas, J., Shimada, A., Vásquez, C. and Viana, M.T., 2002. Methods of measuring feed digestibility in the green abalone (*Haliotis fulgens*). *Aquaculture* in press.
- Nematipour, G.R., Brown, M.L. and Gatlin, D.M., 1992. Effect of dietary protein:energy ratio on growth characteristics and body composition of hybrid striped bass, *Morone chrysops* x *M. saxatilis*. *Aquaculture* 107, 359-368.
- National Research Council (NRC), 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Research Council. National Academy Press. Washington, DC.
- Peck, L.S., Culley, M.B. and Helm, M.M., 1987. A laboratory energy budget for the ormer *Haliotis tuberculata* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 106, 103-123.
- Randall, D., Burggren, W. y French, K., 1998. Animal physiology mechanisms and adaptations. 4th edition. W.H. Freeman and Company. New York. 728 pp.
- Rodríguez-Montesinos, Y.E. y Hernández-Carmona, G., 1991. Varaiación estacional y geográfica de la composición química de *Macrocytis pyrifera* en la costa occidental de Baja California. *Ciencias Marinas* 17 (3), 91-107.
- Sales, J. and Britz, P.J., 2001a. Evaluation of different markers to determine apparent nutrient digestibility coefficients of feed ingredients for South African abalone (*Haliotis midae* L.). *Aquaculture* 202, 113-129.

- Sales, J. and Britz, P.J., 2001b. Review: Research on abalone (*Haliotis midae* L.) cultivation in South Africa. *Aquaculture Research* 32, 863-874.
- Shick, M.J., Widdows, J. y Gnaiger, E. 1988. Calorimetric studies of behavior, metabolism and energetics of sessile intertidal animals. *Animal Zoology*. 28: 161-181.
- Smith, R.R., 1989. Nutritional Energetics. In: Halver, J.E. (Ed.), *Fish Nutrition*. Second edition Academic Press pp. 1-29.
- Steffens, W., 1989. Principles of fish nutrition. Ellis Horwood Limited, John Wiley & Sons, NY, USA, 384 pp.
- Van Soest, P.J., 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2th edition. Cornell University Press. New York, 476 pp.
- Viana, M.T., Jarayabhand, P. and Menasveta, P., 2000 Evaluation of an artificial diet for use in the culture of the tropical abalone *Haliotis ovina*. *J. Aquacul. in the Trop.* 15 (1), 71-79.
- Viana, M.T., Lopez, L.M., Garcia-Esquivel, Z., Mendez, E., 1996. The use of silage from fish and abalone viscera as an ingredient for abalone feed. *Aquaculture* 140, 87-98.
- Viana, M.T., López, L.M. y Salas, A., 1993. Diet development for juvenile abalone, *Abalone fulgens*, evaluation of two artificial diets and macroalgae. *Aquaculture*, 117:149-156.
- Widdows, J. y Hawkins, A.J.S., 1989. Partitioning of rate of Heat dissipation by *Mitilus edulis* into maintenance, feeding and growth components. *Physiological Zoology* 62 (3): 764-784.

ENCLOSURE CON
FALLA DE ORIGEN