



UNAM IZTACALA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE HARINA DE PESCADO POR HARINA
DE SOYA (*Glycine maxima*) Y POLVO DE *Spirulina* EN EL CRECIMIENTO
Y EXCRECIÓN DE FÓSFORO Y NITRÓGENO DE JUVENILES DE TRUCHA
ARCO IRIS, *Oncorhynchus mykiss*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O
P R E S E N T A
GERARDO HERNÁNDEZ FLORES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS HECTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ





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.

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a las siguientes generaciones de biólogos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Espero que les resulte útil en su formación profesional. También espero que estén consientes y orgullosos de pertenecen a una gran institución que es la UNAM. Jamás duden de lo que han aprendido, pues nos encontramos a la altura de cualquier institución nacional o extranjera. También que jamás se den por vencidos pues no es una profesión sencilla. Les recomiendo entregarse plenamente, pues de esta manera se darán cuenta que al final lo que nos deja, lo que nos enseña es algo de un valor infinito. Es mi deseo que estas palabras los alienten a nunca dejar de aprender y nunca perder esa curiosidad que a fin de cuentas es la responsable de alimentar todo buen trabajo científico.

Dedicada a todas esas personas que me apoyaron y lograron que este proyecto se pudiera consolidar. A todos ustedes gracias.

Atentamente

El Marchante

Agradecimientos

Primero, agradecer a mis padres, por el apoyo incondicional. Sé que no es fácil ser mi padre o madre, pero les agradezco la paciencia y la confianza que han depositado en mí. los amo mucho y me hacen sentir muy orgulloso.

A mi hermano Aldo, por tus extrañas enseñanzas mientras crecí, pues ayudaron a forjarme y ser quien ahora soy.

A Claudia, por estar en esos momentos, desveladas, alegrías, triunfos, risas y experiencias propias de la carrera de biología. Por saber exactamente que decir cuando debía ser dicho, te amo.

A mis profesores en el Laboratorio de Producción Acuícola:

A el Profesor Mario Alfredo, por reforzar esa pasión por el conocimiento y la acuicultura. Por las experiencias, las enseñanzas, razonamiento, la confianza, respeto, amistad y la paciencia. Por los “cocos” en la cabeza que me hacían regresar al camino correcto.

A Héctor, por ser un buen asesor, confiar en mí, sus acertados comentarios, críticas constructivas, paciencia y hacer posible este proyecto.

A Omar por el apoyo, la buena vibra, risas, objetivos comentarios para haber logrado un buen proyecto.

A el profesor Antonio Cisneros y la profesora Teresa Ramírez, pues fueron también parte importante en la realización de este proyecto. A la profesora María del Carmen y el laboratorio al que pertenece en la UAM-X por el apoyo para sacar adelante este proyecto.

A los amigos del laboratorio, Ariel (por las risas, buenos momentos y consejos), Mónica por ser el monstruo de las Champolas, Alberto (por los consejos), Anel (Channel, por buena vibra), Santiago (por buenos momentos), a Topacio y Zaida, a los nuevos integrantes, Dan, Tere Yesell, Slevan y Omar. A mis amigos, Bárbara, Jesús, Mauricio, Corina, Pablo, León, Lili, Pancho y los que me faltan.

A el programa "Apoyo para Investigadores Nacionales para el Fortalecimiento de Actividades de Tutoría y Asesoría de Estudiantes de Nivel Licenciaturas de CONACYT".

A el proyecto PAPPIT No. IN208509-3

En general a la carrera de biología y a la FESI por permitirme realizar mi sueño de estudiar biología y en específico la acuicultura. A los profesores de la carrera, a los buenos y los que estaban en proceso de ser buenos. A todas las truchas que dieron su vida por este experimento.

Índice

Resumen	5
1. Introducción	6
2. Antecedentes	8
3. Justificación	10
4. Objetivos	11
4.1 <i>General</i>	11
4.2 <i>Particulares</i>	11
5. Materiales y Métodos	13
5.1 <i>Diseño experimental y dietas</i>	13
5.2 <i>Parámetros de crecimiento y alimento</i>	15
5.3 <i>Digestibilidad</i>	15
5.4 <i>Determinación del consumo de oxígeno, excreción de fósforo y nitrógeno</i>	15
5.5 <i>Fósforo total</i>	16
5.6 <i>Pruebas inmunológicas</i>	16
6. Resultados	18
6.1 <i>Crecimiento</i>	18
6.2 <i>Consumo de oxígeno</i>	23
6.3 <i>Excreción de fósforo y nitrógeno amoniacal al medio</i>	23
6.4 <i>Respuesta inmunológica no específica</i>	26
7. Discusión	28
7.1 <i>Crecimiento</i>	28
7.2 <i>Digestibilidad</i>	31
7.3 <i>Consumo de oxígeno</i>	33
7.4 <i>Excreción de fósforo y nitrógeno amoniacal al medio</i>	33
7.5 <i>Respuesta inmune</i>	34
8. Conclusión	37
9. Literatura citada	38
10. Anexo	43
Anexo 1	43
Anexo 2	45
Anexo 3	46
Anexo 4	47
Anexo 5	48
Anexo 6	49

Resumen

En este trabajo se evaluó la respuesta fisiológica (crecimiento, excreción de nutrientes y respuesta inmune no específica) de juveniles de trucha arcoíris alimentados con una sustitución total de harina de pescado en la dieta por mezclas de polvo de *Spirulina* y harina de soya en las siguientes proporciones: 75-25% (75-S), 50-50% (50-S) y 25-75% (25-S). Se elaboró un alimento control con Harina de pescado (HP) y se utilizó un alimento comercial (AC) como segundo control. Durante 50 días, 10 organismos por tanque (trabajando por triplicado para cada tratamiento) se alimentaron con el 7% de su biomasa por tanque. El crecimiento de los organismos no tuvo diferencias significativas entre tratamientos. Los organismos no mostraron diferencias entre los tratamientos en crecimiento. La digestibilidad de las proteínas en los organismos se aumentó con el tratamiento 50-S. Se presentó una reducción significativa ($P < 0.05$) de fósforo excretado al medio. La respuesta inmune no específica fue igual entre los organismos alimentados con los distintos tratamientos, excepto por 75-S que presentó bajos niveles de proteína en sangre y alta actividad de la lisozima. Por esto la mezcla óptima para sustituir totalmente harina de pescado en dietas para juveniles de trucha arcoíris es 25-S.

1. Introducción

La correcta alimentación en los organismos es de suma importancia, pues de esta dependen los nutrimentos que serán metabolizados para un adecuado funcionamiento de los procesos fisiológicos, como lo son el crecimiento, excreción de desechos al medio y la respuesta del sistema inmunológico.

El crecimiento en peces, como en otros organismos, depende de la calidad y cantidad de los nutrimentos en el alimento que consume, la capacidad de catabolizar los nutrimentos y la cantidad de alimento que ingiera el pez.

Debido a que no todo lo que es consumido por el pez es asimilado, aquello que no se utilice en procesos fisiológicos y los productos del metabolismo son desechados al medio por el organismo, a través de la orina y heces (Ogunkoya, et al. 2006). En acuicultura, el agua después de pasar por los sistemas de cultivo se regresa al ambiente con más nutrientes de aquellos con los que ingresó. Generalmente compuestos nitrogenados y fosforados provenientes de la harina de pescado presente en los alimentos acuícolas. Aproximadamente el 20% del fósforo (P) de la dieta comercial es asimilado por la trucha y salmón, por lo que el restante 80% se descarga al medio acuático (Cheng, et al., 2004). Estos nutrientes son aprovechados por organismos autótrofos (Black, 2001) y su acumulación en el agua provoca con el paso del tiempo, un exceso de estos organismos provocando procesos de eutrofización (Hua, et al., 2008) y con ello eventualmente la disminución de la calidad del sistema acabando con la vida presente.

El alimento ingerido también es responsable en gran medida de la respuesta inmune en organismos. Esto pues generalmente se asocia un organismos bien alimentado con uno sano. En acuicultura es de suma importancia el bienestar de los organismos, pues un descenso en la capacidad de superar y prevenir enfermedades implica que la energía que este destinaba a un propósito (crecimiento, reproducción, engorda) se ocupa en tratar de recuperar el bienestar, produciendo deficiencias en el crecimiento en comparación con organismos sanos. En casos extremos se pueden llegar a presentar muertes, que para el productor implican pérdidas económicas. Es necesario comprender

más a fondo el efecto que tiene un alimento sobre los organismos, por lo que se utiliza la respuesta inmune no específica, mediante la determinación de la concentración de proteína en sangre y la actividad lisoenzimática. Se presume que la lisoenzima se segrega en la sangre por los neutrofilos y macrofagos. La actividad lisoenzimática se relaciona con las bacterias Gram-negativas, pues en este grupo se incluyen la mayor parte de las patógenas. Se ha sugerido que la lisoenzima es efectiva para remover la capa interna de murin (capa de mucosa) en la bacteria, por lo que constituye un factor importante en la defensa en contra de las enfermedades provocadas por bacterias (RØed, et al., 1993).

Las bacterias *Vibrio alginolyticus* y *Aeromonas hydrophila* son conocidos agentes causantes de enfermedades en peces. El género *Vibrio* se asocia con septicemias bacteriales agudas y con lesiones crónicas en peces (Inglis, et al., 1993; Balebona, et al., 1998; Zorrilla, et al., 2003). *Aeromonas hydrophila* es una de las 3 especies de *Aeromonas* móviles, más frecuentemente recuperadas y patógena de una gran variedad de peces en agua dulce (Inglis, et al., 1993; Austin, et al. 1999).

2. Antecedentes

La sustitución de harina de pescado por ingredientes vegetales en alimento para organismos acuáticos se ha experimentado con diferentes materias primas por separado por lo que utilizar mezclas de soya y *Spirulina* para este fin, es considerado como un trabajo pionero en el campo de la nutrición acuícola.

La utilización de la soya en sustitución de la harina de pescado en dietas para peces El-Sayed, (1994) observó que puede sustituirse hasta un 25% sin efectos adversos en el crecimiento y tasa de conversión alimenticia por su parte Gomes, Rema y Kaushik (1995) reemplazaron hasta un 66% sin efectos adversos para la trucha. Sin embargo, Pereira, et al. en 1998, al sustituir completamente proteína animal por proteína vegetal de soya, obtuvieron un menor crecimiento en trucha arcoíris. Al igual que Adeliz et al. quienes en 1998 encontraron que se reduce el crecimiento aunque la tasa de ingesta permanece igual en comparación de un alimento comercial.

El tiempo de adaptación de un organismo al alimento preparado con soya es proporcional a la concentración de esta, de acuerdo a Refstie y colaboradores (1997). Lo que influye en el consumo como lo mencionan Romarheim, et al (2006) quienes encontraron que en trucha arcoíris, la ingesta de alimentos con soya como sustituto a la harina de pescado es menor ($P < 0.05$) que aquellas con sólo harina de pescado, resultando en crecimiento reducido y una conversión más pobre del alimento, aspecto que podría subsanarse sometiendo a altas temperaturas (127°C) el alimento preparado con soya como sustituto parcial de harina de pescado como lo mencionan Barrows, et al. (2007) y Heikkinen, et al (2006) quienes encontraron que este proceso incrementa la tasa aparente de conversión alimenticia en trucha arcoíris.

Por su parte, Ogunkoya, et. al. en el 2006 publicaron que la suplementación de alimento para trucha arcoíris con "Superzyme CS" (un coctel de enzimas) en dietas con una sustitución parcial por soya no influenciaron en el crecimiento y la digestibilidad de los tratamientos.

El alga Spirulina dio buenos resultados a El-Sayed, (Op. Cit) sustituyendo hasta un 50% la proteína en harina de pescado por la de esta microalga, también Palmegiano, et al (2005) demostraron la efectividad de la utilización de *Spirulina* como sustitución parcial en dietas al obtener resultados positivos en el crecimiento de esturión, la utilización de *Spirulina*, o de otros insumos diferentes de la harina de pescado, es favorecida por los hábitos alimenticios de los organismos, así Nandeeshya y colaboradores en 1998, sustituyeron del 25 al 100% de harina de pescado por *Spirulina platensis* en dietas para Carpa (*Cyprinus carpio*) concluyendo que *S. platensis* se puede utilizar como única fuente de proteína en dieta de carpa, por su parte, Olvera-Novoa, et al. en 1998 publicaron efectos benéficos en el crecimiento en crías de tilapia sustituyendo hasta 40% por *Spirulina*.

Sustituciones en alimento para trucha arco iris con microalgas se han reportado por Dallaire, et al. en 2007 quienes concluyeron que una sustitución mayor a 12.5 % por biomasa de alga (*Scenedesmus* sp., *Chlamydomonas* sp., *Lyngbya major*, *Hydrococcus rivularis* algunas Diatomeas y Chrysophyceae) genera menor crecimiento.

La disminución de descargas nitrogenadas y fosforadas al medio, la documentan los trabajos de Vielma et.al. (2000, 2002) quienes encontraron que la utilización de phytasa en dietas preparadas con soya duplica la retención de P en trucha arcoíris, reduciendo la carga de P en un 54.11% en el agua y promoviendo la depositación de Ca, Mg y Zn, Además Cheng y colaboradores en el 2004 encontraron que el nivel óptimo de phytasa en las dietas de trucha arcoíris es aproximadamente 500 m U k g. Green, JA, et.al. en 2004 lograron reducir las emisiones de fosforo al utilizar dietas con una combinación de harina de soya, gluten de maíz, y sangre seca en trucha arcoíris.

Con respecto a la respuesta inmune no específica Verlhac, V. y colaboradores en 1998 demostraron que únicamente la vitamina C presenta una respuesta inmune no específica en trucha arcoíris pues incrementa la pycnocitosis, actividad de la lisoenzima y explosión oxidativa, por su parte, Demers, NE; Bayne, CJ. (1997) mencionan que factores como el estrés en la trucha arco iris tienen una relación directa con la actividad de la lisoenzima en plasma

sanguíneo y Peters, et al. en 1988, demostraron que este factor favorece la infección por *Aeromona hydrophila* en trucha arcoíris. Sumpter, JP en el 1992 publicó factores ambientales, genéticos, nutricionales y endógenos que influyen en el crecimiento en trucha arcoíris.

3. Justificación

Con el propósito de prevenir y remediar el problema de el exceso de descargas de Nitrógeno (N) y Fosforo (P) en aguas efluentes de granjas acuícolas a cauces naturales, se pretende la creación de dietas “amigables con el ambiente”. Por esto, se busca que en los alimentos se reduzca la cantidad de harina de pescado y utilizar nuevas fuentes de proteína que ayuden a reducir las descargas de N y P al medio ambiente sin comprometer el crecimiento de los organismos a los que se alimenta. Considerando que el productor de trucha arco iris utiliza como principal criterio de elección para un alimento el crecimiento que generará en los organismos porque las ganancias en su granja son proporcionales al volumen de producción, elegirá aquellos alimentos que generen un buen crecimiento a los organismos.

La evaluación de la respuesta inmune es importante para contar con parámetros que permitan la comparación en aspectos fisiológicos de organismos alimentados con fuentes alternas de proteína de aquellos alimentados con dietas convencionales y de esta forma recomendar su utilización en las prácticas de cultivo.

Finalmente la creciente sobreexplotación de los recursos marinos para elaborar alimentos a base de harina de pescado ha provocado que la disponibilidad de esta se reduzca y sus precios se eleven. Considerando que el alimento representa casi el 50% de los costos operativos de una granja acuícola (Wheaton, 1982; Adeliz, et al.,1998; Vielma, et al., 2000; Ogunkoya, et al, 2006). La alternativa a estos problemas es la sustitución de proteína (harina de pescado) de la dieta comercial por materias no convencionales, como la soya (Vielma, et al., 2002; Heikkinen, et al. 2006; Ogunkoya, et al., 2006; Barrows, et al., 2007) y la *Spirulina* (Olvera-Novoa, 1998) entre otras. Bajo este fundamento, la búsqueda de dietas de menor costo y de igual o mejor rendimiento, comparadas con las comerciales, se justifica pues de obtenerse representaría una alternativa económica que apoyaría a la conservación del ambiente, a un menor costo.

4. Objetivos

4.1 General.

Evaluar el efecto de dietas con distintas concentraciones de mezclas de *Spirulina* sp. y soya (*Glycine maxima*) en crecimiento, excreción de fosforo y nitrógeno y respuesta inmune no especifica en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

4.2 Particulares

-Determinar la tasa de ingesta del alimento en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con distintas concentraciones de mezclas de *Spirulina* sp. y soya (*Glycine maxima*) .

-Determinar la digestibilidad de proteína en los tratamientos juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con distintas concentraciones de mezclas de *Spirulina* sp. y soya (*Glycine maxima*) .

-Determinar la tasa de crecimiento en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con distintas concentraciones de mezclas de *Spirulina* sp. y soya (*Glycine maxima*) .

-Determinar el consumo de oxígeno de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) recién alimentados con distintas concentraciones de mezclas de *Spirulina* sp. y soya (*Glycine maxima*).

-Determinar la excreción de fosforo a través de excretas y orina juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con distintas concentraciones de mezclas de *Spirulina* sp. y soya (*Glycine maxima*).

-Determinar la cantidad de nitrógeno amoniacal excretado juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con distintas concentraciones de mezclas de *Spirulina* sp. y soya (*Glycine maxima*) .

-Determinar respuesta inmune no específica juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con distintas concentraciones de mezclas de *Spirulina* sp. y soya (*Glycine maxima*) .

5. Materiales y Métodos

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Producción Acuícola de la FES-Iztacala.

5.1 Diseño experimental y dietas.

En este trabajo se elaboraron 4 tratamientos. Los primeros 3 tratamientos con una mezcla, cada uno, de polvo de *Spirulina* y harina de Soya en las siguientes proporciones: a) 75:25 (75-S) , b) 50:50(50-S), c) 25:75(25-S) y en el cuarto se utilizó harina de pescado (HP) como control. Se utilizó una marca comercial (Marca Cleyton) como segundo alimento control (AC).

Para la elaboración de las dietas los ingredientes sólidos (Tabla 1) fueron pesados en una balanza digital y posteriormente homogenizados en un batidora Hamilton Beach (modelo 63220). Posteriormente la extrusión se llevo a cabo en un molino para carne Nixtamatic, hasta obtener partículas (pellets) fácilmente manejables y que se mantenían compactas. El secado de los pellets se efectuó en un horno seco a 60°C durante 24 horas .

Tabla 1. Tabla del contenido en 500g de los tratamientos elaborados para juveniles de trucha arco iris.

Tratamiento	75-S	50-S	25-S	HP
Ingredientes (g)				
Harina de Pescado	0	0	0	300
Harina de Soya	75	150	225	0
Polvo de Spirulina	225	150	75	0
Aceite de Hígado de Bacalao	25	25	25	25
Lecitina de Soya	25	25	25	25
Mezcla de Vitaminas y Minerales	20	20	20	20
Dextrina	50	50	50	50
Gluten	25	25	25	25
α- Celulosa	55	54.6	54.6	54.6
Phytasa	0	0.4	0.4	0.4

El diseño experimental consistió de 3 tratamientos y 2 controles, cada uno por triplicado, utilizando como unidades experimentales 15 tanques de 50 litros cada uno, con un sistema de recirculación por un periodo de 50 días en instalaciones al aire libre. Se utilizaron 10 individuos juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) por unidad experimental, que fueron seleccionados aleatoriamente y registrando su peso inicial que fue en promedio de 6.79 g \pm 0.37 por organismo.

Diariamente se registraron en cada tanque (8, 12 y 18hrs) oxígeno disuelto y temperatura con oxímetro (YSI 85, YSI Incorporated, Ohio, EUA).

La cantidad de alimento suministrado diariamente por tanque fue el 7% de la biomasa total distribuido en 2 raciones al día (9 y 15 hrs). Se alimentó a los organismos manualmente *ad libitum*.

5.2 Parámetros de crecimiento y alimento.

Se determinó el peso inicial, cada 10 días y final por Unidad Experimental con una balanza analítica (Cole-Parmer Symmetry EC 400).

Tasa de Crecimiento Específico TCE (%) (Refstie, Stile y Trond, 1997)

$$\text{TCE} = \left[\frac{(\ln \text{Peso Final} - \ln \text{peso inicial})}{\text{Número de días de alimentación}} \right] * 100$$

Ganancia en Peso GP (g) (Adeliz, et al, 1998)

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

Tasa de Ingesta Ti (Mundheim, et al., 2004).

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

Tasa de Conversión del Alimento (Adeliz, et al, 1998)

$$\text{TCA} = \left[\frac{\text{Alimento Consumido (g)}}{\text{GP (g)}} \right]$$

Tasa de Conversión de la Proteína (Adeliz, et al, 1998)

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

5.3 Digestibilidad

Posterior a los 50 días de alimentación, se elaboraron alimentos adicionando un 1% de óxido de cromo con los que se alimentaron a los organismos por 10 días. Se alimentaron con la misma frecuencia y cantidad. Las heces se colectaron 30 minutos después de ser alimentados. Posteriormente se liofilizaron para su utilización en determinación de proteína por Micro Lowry (Anexo 1), y cromo presente por Furukawa y Tsukahara (1966) (Anexo 2) Utilizando 50 mg de heces liofilizadas.

5.4 Determinación del consumo de oxígeno, excreción de fósforo y nitrógeno.

5.4.1 Determinación de consumo de oxígeno y obtención de muestras de agua.

Al final del periodo de alimentación, aleatoriamente 10 organismos de cada tratamiento se pesaron e introdujeron en recipientes individuales con concentración de oxígeno disuelto, fósforo y nitrógeno conocidas. Después de 30 minutos se midió la concentración de oxígeno para obtener su consumo por diferencia. También se analizó una muestra de agua para determinar la cantidad excretada de forma indirecta de N y P.

5.4.2 Determinación Fósforo excretado en orina.

Las muestras de agua se prepararon de acuerdo a la técnica 480 P React. Mo (Anexo 3) del manual HACH y medidas en espectrofotómetro (HACH DR 2800).

5.4.3 Determinación de Nitrógeno Amoniacal.

Se prepararon las muestras de acuerdo a la técnica del manual HACH 380 N Ness (Anexo 4). Las muestras de agua se midieron en espectrofotómetro (HACH DR 2800).

5.5 Fósforo total.

Se utilizaron heces liofilizadas de la prueba de digestibilidad que se trataron de acuerdo a el método 10127 Test 'N Tube Vials (Anexo 5) con la modificación de que se utilizó como muestra 0.01 g de heces liofilizadas y se le agregó 5ml de agua para volverlas líquidas. Las muestras tratadas se midieron por espectrofotometría (HACH DR 2800).

5.6 Pruebas inmunológicas.

5.6.1 Obtención del suero sanguíneo.

Finalizados los tratamientos se tomaron muestras de sangre de 3-4 organismos al azar de cada tratamiento para obtener un volumen de 2 ml de sangre. El suero sanguíneo se obtuvo de acuerdo a la técnica de extracción Taoka, et al. (2006).

5.6.2 Pruebas de lisoenzima

Las pruebas de lisozima se realizaron de acuerdo a Caruso, et al. (2002).

5.6.3 Proteína en suero

Se realizó por la técnica Micro Lowry descrita en el producto “Total Protein kit, Micro Lowry, Petersons modificación” (Sigma) (Anexo 1) con la modificación de utilizar 0.01g de muestra.

5.6.4 Ensayo de la actividad anti-bacterial del suero.

Para este estudio, se cultivaron dos cepas de bacterias: *Vibrio alginolyticus* (Cepa ATCC177) y *Aeromona hydrophila* (Cepa ATCC35654) en medio TSA (Trypto-Soya agar) para asegurar su disponibilidad para el estudio. Se cuantificaron las bacterias de ambas cepas en una muestra por el Método del Número Más Probable. Se realizó la técnica descrita por Hernández, (2007) (Anexo 6).

El Análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS v.17. Se utilizó un Análisis de Varianza de un factor ($\alpha=0.05$) para determinar si existían diferencias significativas entre tratamientos. Posteriormente se determinaron las diferencias significativas entre los niveles mediante la prueba de Tukey para las medias de Tasa de crecimiento específico, porcentaje de ganancia en peso, tasa de ingesta, tasa de conversión del alimento, tasa de conversión de la proteína, coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína, coeficiente de digestibilidad aparente, consumo de oxígeno, fósforo excretado en heces y orina, amonio excretado en orina, actividad lisozimática y concentración de proteína en suero sanguíneo.

6. Resultados.

A continuación se presentan los resultados, iniciando con el crecimiento, seguido del consumo de oxígeno y excreción de nutrientes, finalizando con respuesta inmune.

6.1 Crecimiento

La Tasa de Crecimiento Específico (Figura 1) en los organismos alimentados con el tratamiento HP (4.02%) mostraron los mayores valores mientras que los del tratamiento 25-S (3.39%) los menores. Se observa una tendencia a la reducción en los valores conforme aumenta el porcentaje de soya en las dietas. Por otro lado, en la ganancia en peso (%; Figura 2). Los organismos alimentados con el tratamiento HP (649.51%) presentaron el mayor valor, seguido de 75-S (557.37%). Los menores porcentajes los presentaron 50-S (470.62%) y 25-S (445.38%).

La tasa de ingesta (Figura 3) de los organismos alimentados con tratamientos de harinas vegetales muestran valores más elevados que los tratamientos control. Se observa que a mayor inclusión de *Spirulina*, el valor se tiende a elevarse, sin embargo no hay diferencias significativas entre tratamientos.

Los valores pertenecientes a la tasa de conversión del alimento (Figura 4) mostraron que el valor del tratamiento HP (0.75) resultó el más bajo de los tratamientos. Los valores de los organismos con tratamientos con proteína vegetal resultaron más elevados que los control. Se observa una tendencia de los valores a disminuir en relación a la mayor inclusión de soya en el tratamiento. Para la tasa de conversión de la proteína (Figura 5), los organismos alimentados con tratamientos que contienen una mayor cantidad de soya tienen valores más bajos de conversión de la proteína, No obstante, no difieren significativamente de los tratamientos control.

El coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína (Figura 6) en los organismos alimentados con harinas vegetales resultó mayor que en organismos alimentados con el tratamiento HP. El crecimiento (figura 7) de juveniles de trucha arcoíris. Los organismos alimentados con los tratamientos 75-S y HP alcanzaron mayor peso al finalizar el

experimento. Los que alcanzaron menor peso fueron 50-S y 25-S. Sin embargo entre tratamientos no existen diferencias significativas.

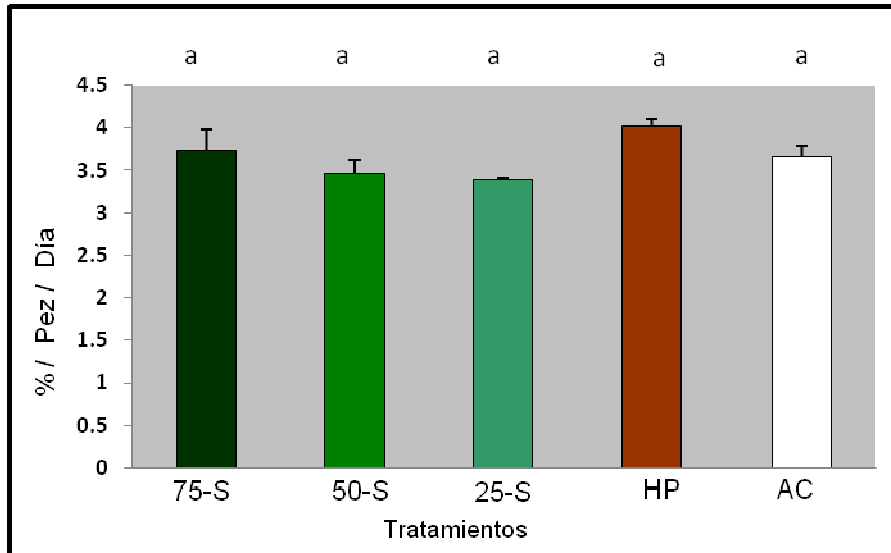


Figura 1 Tasa de crecimiento específico.

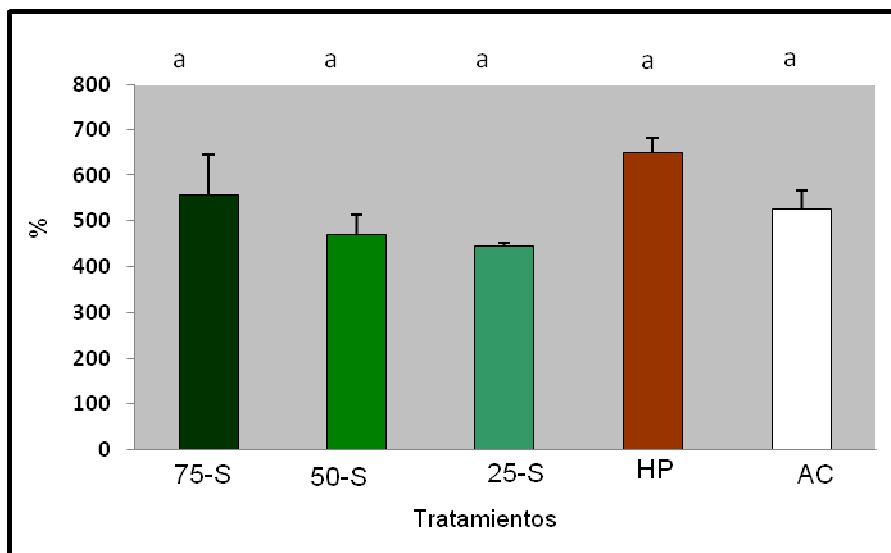


Figura 2 Porcentaje de ganancia en peso.

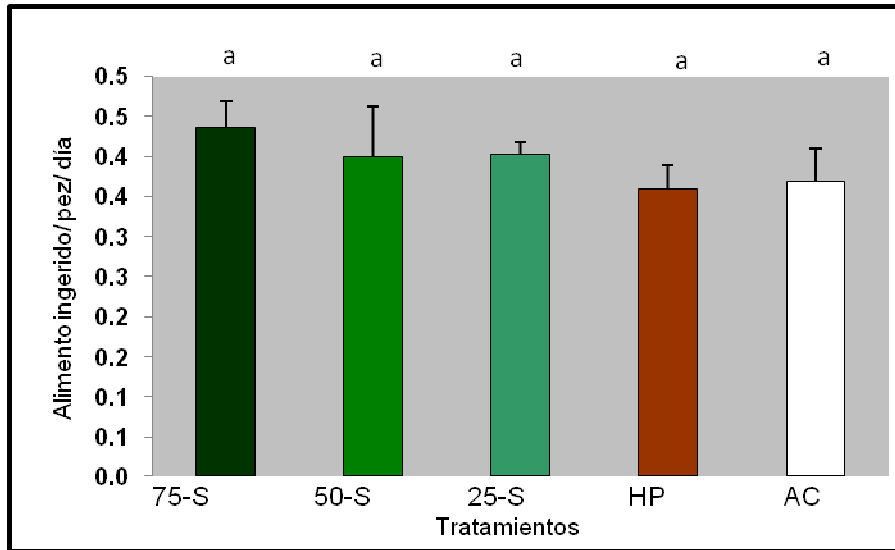


Figura 3 Tasa de ingesta.

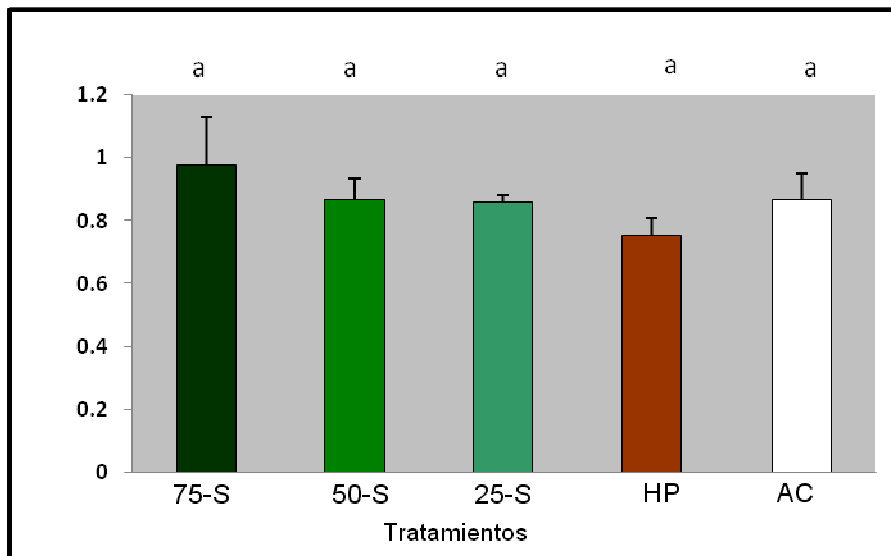


Figura 4 Tasa de conversión del alimento.

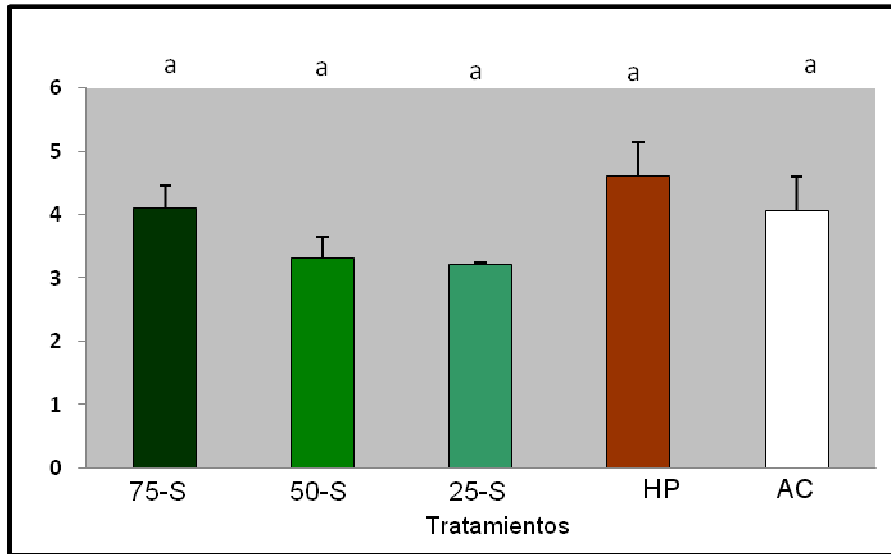


Figura 5 Tasa de conversión de la proteína.

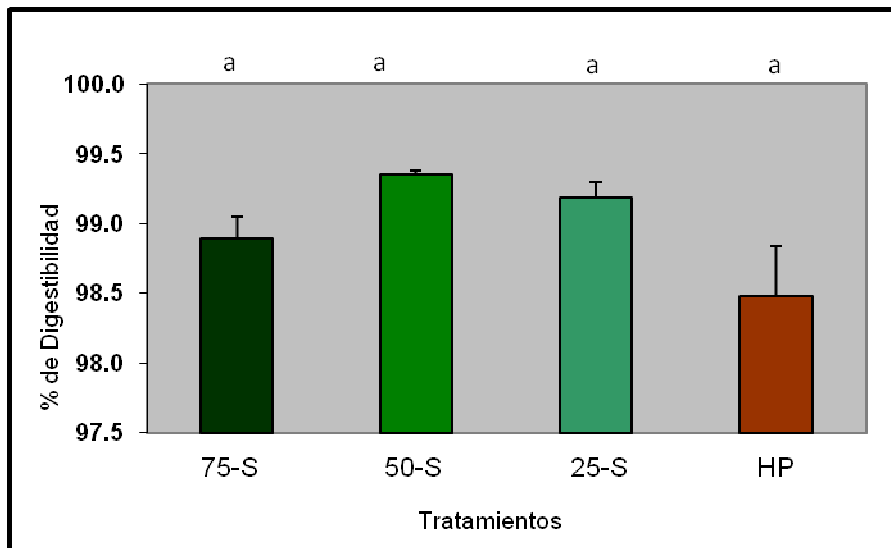


Figura 6 Coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína.

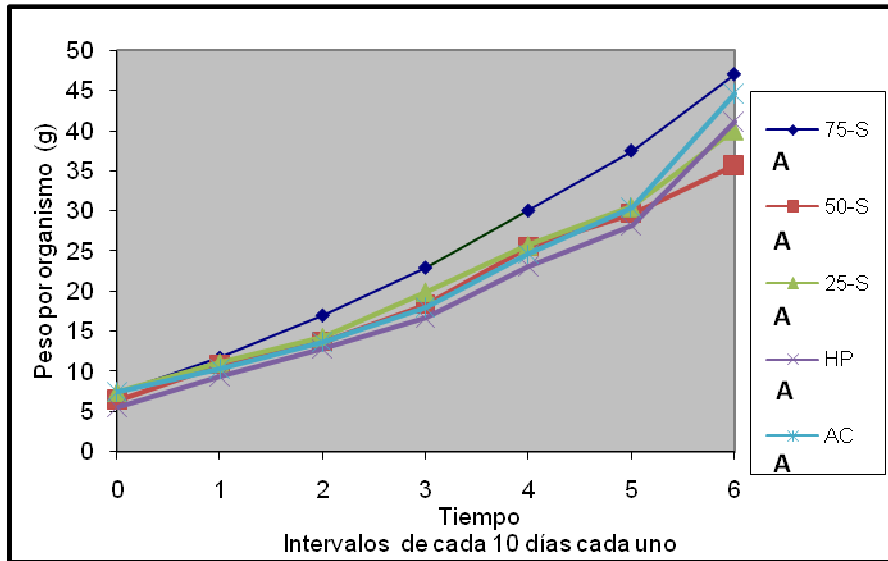


Figura 7 Crecimiento de juveniles de trucha arcoíris.

6.2 Consumo de oxígeno

El oxígeno consumido (Figura 8) por organismos con los tratamientos 50-S (1.18mg/ml) y 25-S (1.27mg/ml) es similar al de los del tratamiento AC (1.22 mg/ml). Hay una reducción en el consumo de oxígeno por organismos alimentados con 75-S y HP en comparación de los demás tratamientos.

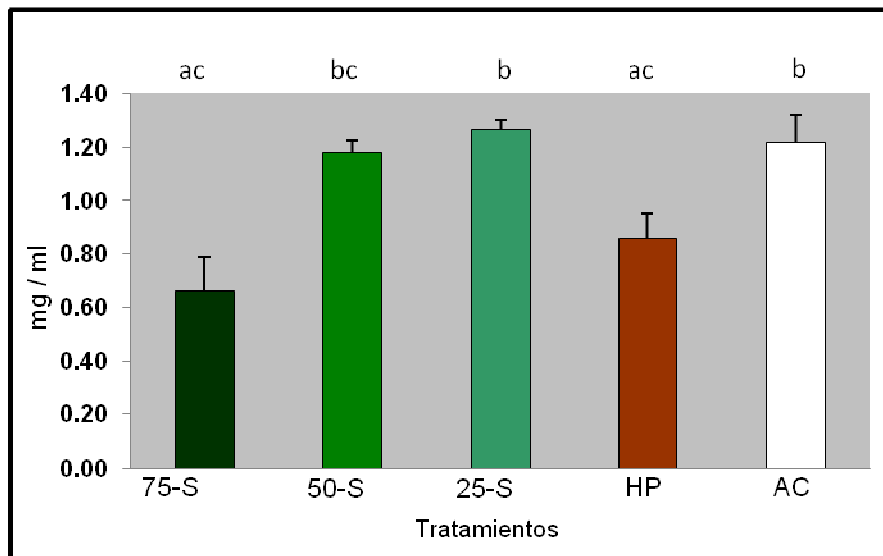


Figura 8 Oxígeno consumido por organismos alimentados.

6.3 Excreción de fósforo y nitrógeno amoniacal al medio

Los resultados pertenecientes a el fosforo excretado en heces (Figura 9) de los organismos alimentados con sustituciones totales de mezclas de soya y *Spirulina* muestran una disminución significativa en el fosforo excretado en heces, a comparación de los tratamientos AC y HP. Por otro lado en el fosforo excretado por orina (Figura 10) se observó una relación directa entre la disminución de fosforo por orina y la cantidad de *Spirulina* en los tratamientos administrados a juveniles de trucha arcoíris. En cuanto el amonio excretado por orina (Figura 11), los organismos alimentados con el tratamiento 25-S excretaron la mayor cantidad de amonio de tratamientos con harinas vegetales, (0.301 mg/ml), valor cercano al obtenido por el tratamiento AC (0.299 mg/ml). Los organismos alimentados con 50-S y HP mostraron la menor cantidad de amonio excretado por orina.

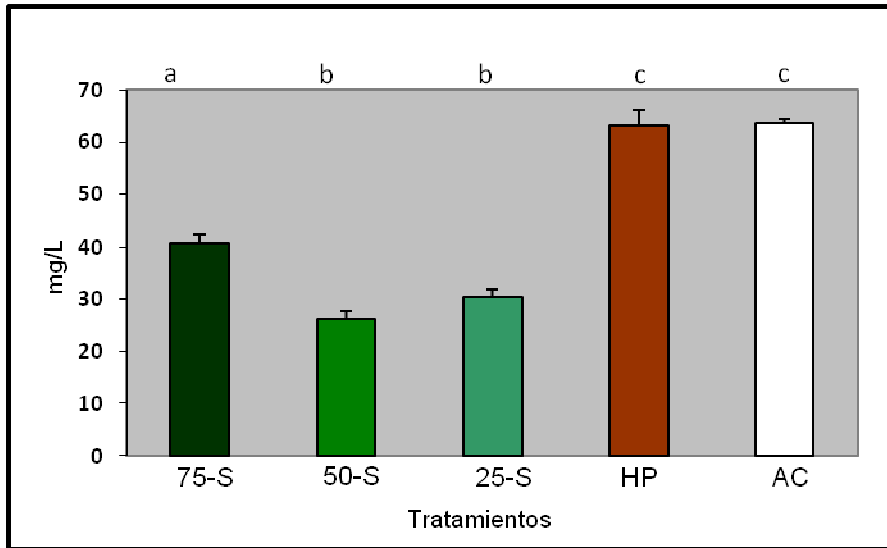


Figura 9 Fosforo excretado en heces.

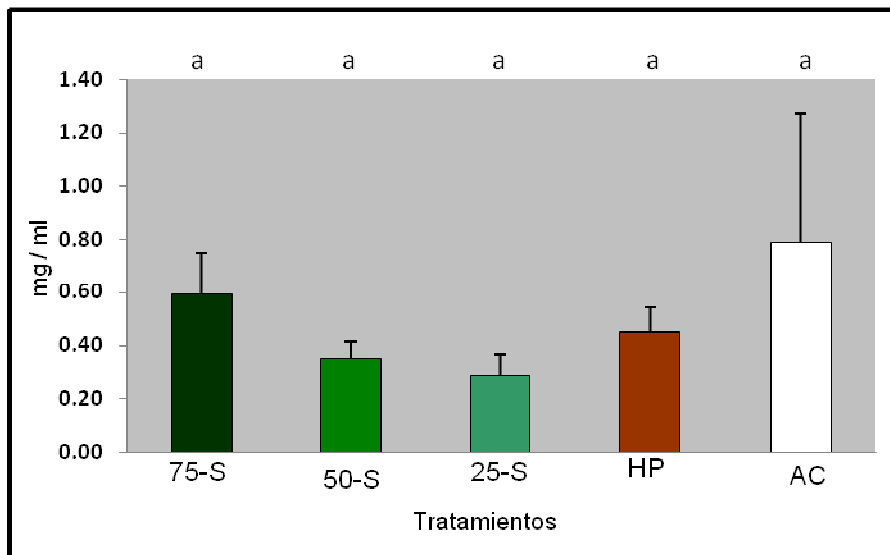


Figura 10 Fosforo excretado por orina.

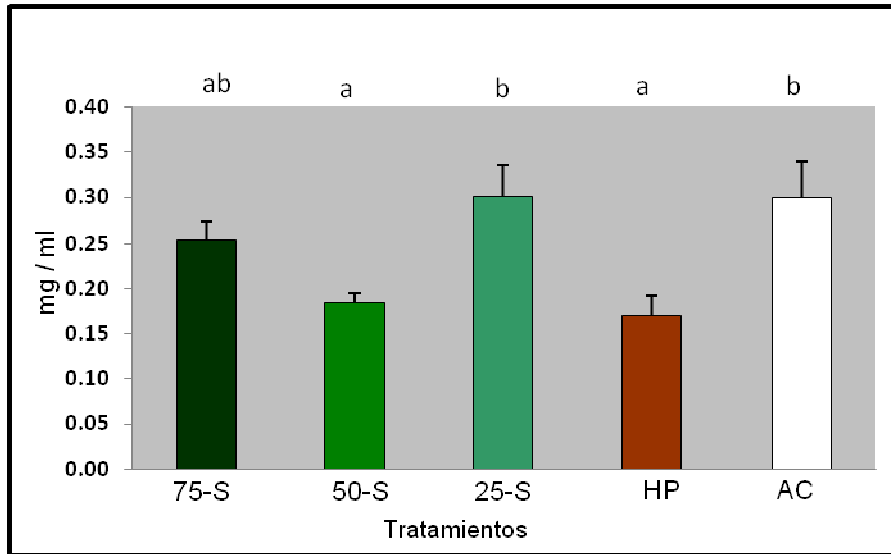


Figura 11 Amonio excretado por orina.

6.4 Respuesta inmunológica no específica

En los resultados de respuesta inmune se observó que la sobrevivencia (Figura 12) de los organismos alimentados con todos los tratamientos fue por encima del 80%. El valor más elevado lo obtuvo el tratamiento 25-S con un 96.7 % de organismos vivos al final del experimento. La actividad lisoenzimática (Figura 13) de los organismos alimentados con los tratamientos 75-S y HP (745.76 y 696 U/mg proteína respectivamente) mostraron la mayor actividad lisoenzimática de todos los tratamientos. Los valores de los tratamientos 50-S y 25-S fueron similares a AC. En cuanto a la concentración de proteína en suero sanguíneo (Figura 14), los organismos alimentados con los tratamientos 50-S y 25-S no disminuyeron la cantidad de proteína en suero sanguíneo en comparación con los tratamientos HP y AC. Los organismos alimentados con el tratamiento 75-S resultaron con la concentración más baja del experimento (1.185 mg/ml).

En las pruebas de bacterias (*Vibrio alginolyticus* y *Aeromona hydrophila*) expuestas a sueros sanguíneos de organismos alimentados con los distintos tratamientos no se presentaron diferencias en la supervivencia de individuos formadores de colonias. La supervivencia en todos los casos fue del 100%, esto pues se obtuvieron en cada caja petri un número mayor a 300 individuos formadores de colonia

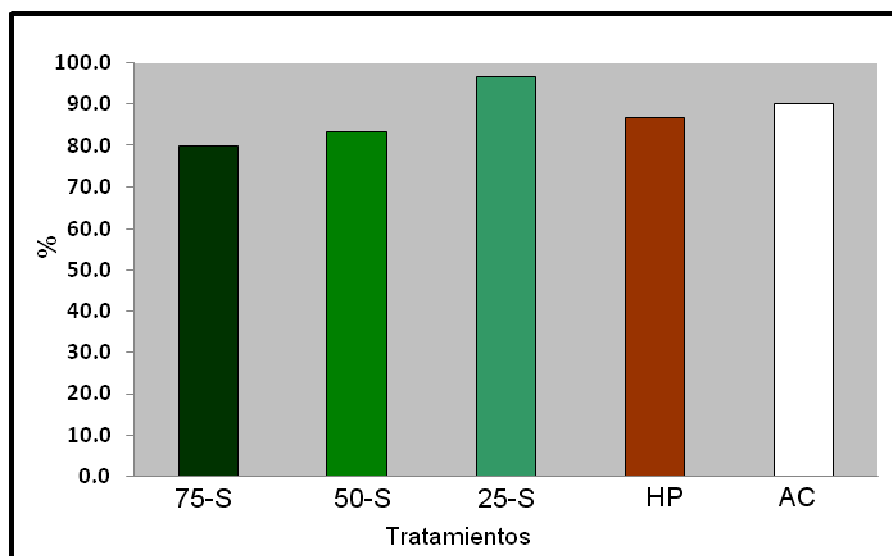


Figura 12 Sobrevivencia.

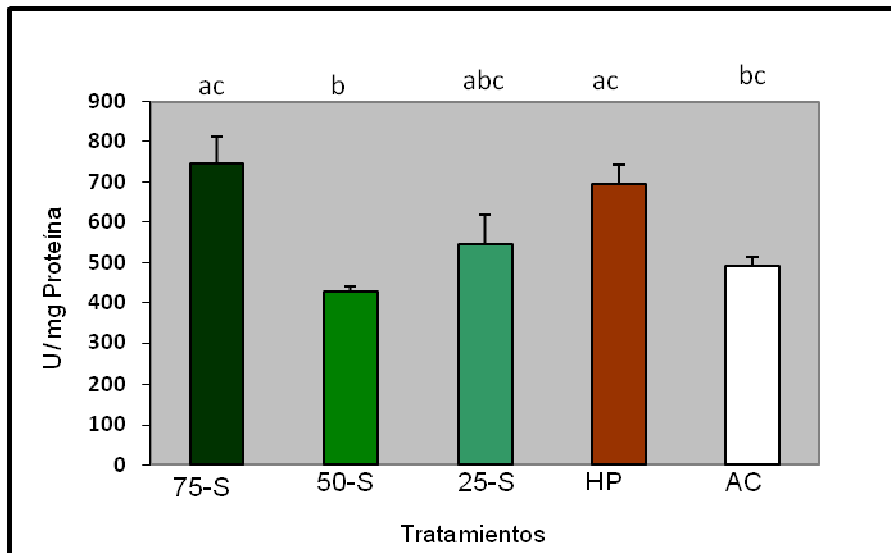


Figura 13 Actividad lisoenzymatica.

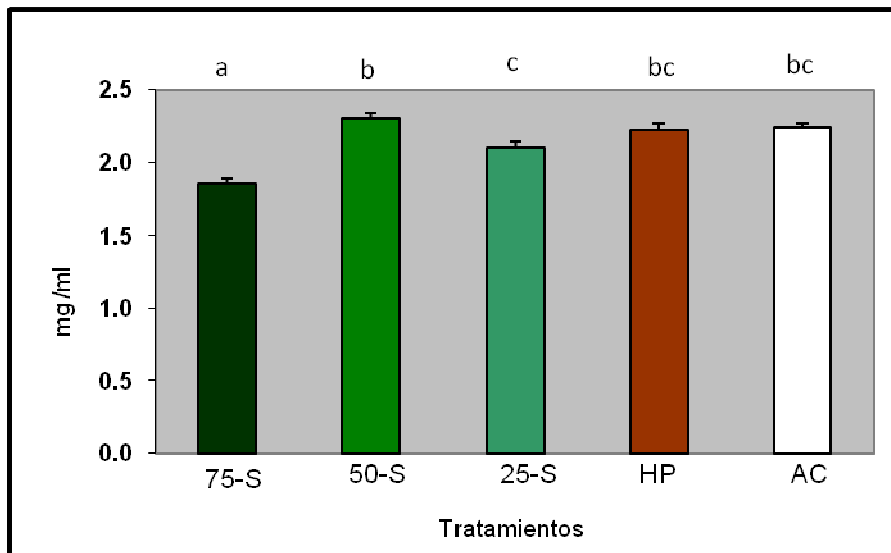


Figura 14 Concentración de proteína en suero sanguíneo.

7. Discusión

Los valores registrados nos permiten interpretarlos para emitir un juicio fundamentado sobre la mezcla óptima que puede sustituir la harina de pescado en los alimentos para trucha arcoíris.

7.1 Crecimiento.

En este trabajo la información obtenida permite tener una aproximación a la respuesta fisiológica que presentan los organismos cuando son alimentados con Sustituciones Totales de Mezclas de Soya y *Spirulina* (STMSS). Los resultados de este experimento en Tasa de Crecimiento Específico (TCE), Ganancia en Peso (GP), Tasa de Conversión del Alimento (TCA), Tasa de Ingesta (TI) y Tasa de Conversión de la Proteína (TCP) muestran una tendencia (Figuras 1-5) a disminuir su valor entre mayor es la inclusión de harina de soya y menor la de polvo de *Spirulina* en el tratamiento. Sin embargo en ninguno de los parámetros mencionados se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. En otras palabras, la respuesta de los organismos al ingerir STMSS no difiere de la que presentan al ingerir alimentos comerciales o dietas con harina de pescado. Más importante, los resultados de crecimiento (Figura 2 y 7) son alentadores para proponer productos a nivel comercial, pues no reducen significativamente el crecimiento en los organismos, en comparación con los alimentos comerciales.

Los valores obtenidos en este trabajo de crecimiento (figuras 1-5) muestran una tendencia a reducirse en los tratamientos que incluyen mayor cantidad de soya. Esto por la reducción en la absorción de nutrientes que se le atribuye a la harina de soya (Storebakken, et al. 2000) por factores como antinutrientes (Adeliz, et al., 1998; Dalsgaard, et al., 2009) y desordenes digestivos como lo es la diarrea osmótica (Heikkinen et al. 2006). Se llegó a presentar una mayor solubilidad de las heces excretadas por organismos alimentados con mayor cantidad de *Spirulina* pues al no poseer una pared celular como la soya (Volkman, et al., 2008) la consistencia fue menos firme que en dietas con mayor cantidad de soya. Como se puede observar entre tratamientos y los

controles no existen diferencias significativas debido a la complementación de los tratamientos con polvo de *Spirulina*. Esto concuerda con lo reportado por Nandeesha, et al (1998), quien sustituyó parcialmente harina de pescado por *Spirulina* en dietas de organismos acuáticos y resultó en un incremento de la ganancia en peso como sucedió con el tratamiento 75-S (Figuras 2 y 7) debido a la calidad en los nutrimentos en el polvo de *Spirulina*. Olvera-Novoa, et.al. (1998) reportaron un efecto similar en el crecimiento de tilapia al utilizar *Spirulina* en alimentos.

Los resultados de TCE (figura 1) coinciden con los publicados por Austreng, et al., 1987 quien describe TCE para juveniles de trucha arcoíris de diferentes tallas. La TCE presenta la misma tendencia que los demás parámetros de crecimiento (a disminuir el valor con una mayor inclusión de harina de soya). La tendencia concuerda con los resultados de undheim, (2004) y de El-Sayed. (1994). En los trabajos de estos autores, los organismos (*Salmo salar* L. y *Rhabdosargus sarba* respectivamente) alimentados con sustituciones totales de harina de pescado por harina de soya o *Spirulina* obtienen el menor valor de TCE en comparación con sustituciones parciales, sin embargo el valor de TCE en una sustitución total de *Spirulina* es más alto que el de una sustitución total con harina de Soya (1.94, y 1.34 % respectivamente). Otro autor Olvera-Novoa, et.al. (1998) trabajó con *Oreochromis mossambicus* reportando una tendencia similar. En este trabajo, al haberse utilizando mezclas de ambos ingredientes se obtuvo un mayor valor de TCE en tratamientos con elevadas concentraciones de *Spirulina* (75-S) en comparación con aquellos que contenían mayor cantidad de harina de soya (25-S) (Figura 1). Esto se le puede atribuir a el hecho de las características de especie con la que se trabajó (trucha), pues las respuestas entre especies generalmente varían, además de que se observó en los resultados de este trabajo que una sustitución total de harina de pescado por harinas vegetales no varió la TCE de los organismos alimentados, siempre que la sustitución fuera elaborada con más de una fuente de proteína vegetal. Varios autores concuerdan con que es mejor una sustitución parcial de fuentes de proteína (El-Sayed, 1994; Gomes, Rema y Kaushik, 1995; Olvera-Novoa, et al., 1998; Fernandez-Inhas, et al., 1999;

Palmevegiano, et al., 2005; Ogunkoya, et al., 2006), así como trabajos han encontrado que en una sustitución total se afecta el crecimiento de los organismos (Pereira, et al., 1998). No obstante, Gomes, (1995) trabajó con sustituciones de harina de pescado por mezclas de harina de soya con leguminosas (frijol faba, semilla de lupin y chícharo) en *Oncorhynchus mykiss* y reportó valores que no varían en sustituciones del 33 al 66%, valor elevado para una sustitución parcial, por lo que se deduce que la utilización de las STMSS de este trabajo no produjeron variación en la TCE de los organismos alimentados por ser una mezcla de dos fuentes de proteína.

El TCE le sirve a los productores para conocer el porcentaje que los organismos aumentaran de talla en un día. De esta manera pueden conocer el tiempo en que sus organismos alcanzarán una talla deseada y así calendarizar sus actividades para tener un control más claro de su producción. Al no haber diferencias con los tratamientos comerciales, los organismos alimentados con STMSS crecen al mismo ritmo que los alimentados con dietas comerciales.

Los resultados de tasa de ingesta (Figura 3) en los tratamientos con STMSS no variaron en comparación con los tratamientos control. Se ha reportado en previos trabajos (Pereira, et al., 1998) baja ingesta de alimentos con proteína vegetal y se les atribuye principalmente al rechazo de los organismos por la palatabilidad de los tratamientos. Esto, pues la trucha arcoíris al ser un organismo carnívoro, suele rechazar los alimentos con proteína de origen vegetal por "no tener buen sabor". Por esta razón, se adicionaron los alimentos con sustancias que mejoraran el sabor para que los organismos los ingieran (Hardy, et al., 2002). En este trabajo utilizó aceite de pescado como promotor de la palatabilidad para que no influyera en la cantidad de alimento ingerido.

En general los datos de la TCA y TCP (Figura 4 y 5) para los tratamientos con soya son similares a los reportados por Greene & Selivonchick (1990) donde se reporta un valor de .87 para organismos alimentados con aceite de soya. En este trabajo se obtuvo un valor de .86 en los organismos alimentados con el tratamiento 25-S, y se observa que los valores de los tratamientos tienden a aumentar con una mayor concentración de polvo de *Spirulina* y una menor

concentración de harina de soya. Al observar los resultados de TCA y TCP junto con demás parámetros de crecimiento, se observa que la respuesta por la utilización de STMSS en alimentos para trucha arcoíris no difiere en comparación con la del alimento comercial.

7.2 Digestibilidad

El Coeficiente de Digestibilidad Aparente de proteína (CDA) resultó elevado en los tratamientos 50-S y 25-S en comparación con HP (Figura 6), aun por encima de los reportados por Fontainhas-Fernandes (1999) donde los coeficientes son de 90% para sustituciones con soya. El valor del tratamiento control de harina de pescado igualmente resultó elevado en comparación con los reportados por los autores Romarheim, et al. (2006), Nandeesha, et al. (1998), Yamamoto, et al. (2005), Mundheim, et al. (2004).

El elevado valor en los CDA de los tratamientos se puede deber a la inexactitud de la técnica. También puede ser debido al proceso de calentamiento de los alimentos que ayudó a la ruptura de la membrana de celulosa que rodea a la célula vegetal en la soya, liberando los contenidos y aumentando su disponibilidad. El calentamiento también facilitó la inactivación y destrucción de factores antinutricionales como inhibidores de tripsina, ácido fítico, antivitaminas A, D, E, K y Br₂ presentes en dietas con soya (El-Sayed, 1994). Esto se logró al calentar los alimentos a 60°C durante 24 horas, antes de ser administrados a los organismos, como parte del proceso de elaboración de los tratamientos. Por esta razón las dietas fueron asimilables por los organismos presentando CDA aun más elevados que en el tratamiento control.

En el trabajo, la dieta 75-S, tratamiento con la mayor concentración de *Spirulina* de las STMSS, es la que obtuvo el menor coeficiente de digestibilidad.

Nandeesha, et al. (1998) obtuvo coeficientes inferiores a los obtenidos en este experimento al utilizar *Spirulina* en dietas como sustituto parcial de proteínas en alimentos para *Cyprinus carpio* donde obtuvo CDA de 88.3, 88.9, 87.7, 87.2 en dietas con porcentajes de sustitución de 100, 75, 50 y 25 respectivamente, aun

cuando la carpa es un organismos de hábitos que favorecen la asimilación de proteínas vegetales.

Lo que se puede observar en los resultados (Figura 6) de los tratamientos STMSS es que a mayor concentración de una sola fuente de proteína vegetal en el alimento, la digestibilidad de las proteínas tiende a disminuir (tratamientos 75-S y 25-S). Esto concuerda con los resultados de El-Sayed, (1994), donde concluye que una sustitución de harina de pescado no presenta efectos adversos en crecimiento de *Rhabdosargus sarba* hasta del 50% de *Spirulina* y de 25% en soya. Otros autores que han trabajado con sustituciones totales con una sola fuente de proteínas vegetales, concluyen que es mejor una sustitución parcial en soya o *Spirulina* (El-Sayed, 1994; Gomes, Rema y Kaushik, 1995; Olvera-Novoa, et al., 1998; Fernandez-Inhas, et.al., 1999; Palmegiano, et al., 2005; Ogunkoya, et al., 2006) o que la inclusión de harina soya en alimentos produce efectos negativos (Pereira, et al. en 1998). Por ello, como en el caso de TCE, se recomienda la inclusión de más de una fuente de proteínas de origen vegetal en sustituciones de harina de pescado para obtener índices altos de digestibilidad de la proteína.

En algunos casos, se le ha atribuido baja digestibilidad a tratamientos por la presencia de ciertos compuestos. Existen reportes en donde indican que se presenta una baja digestibilidad por la utilización de phytasa en los alimentos, esto por la generación de complejos proteína-phytasa que son resistentes a la digestión proteolítica (Dalsgaard, et al., 2009), Sin embargo en el presente trabajo no se presentó baja digestibilidad de los tratamientos en este experimento en ninguna de las dietas adicionadas con phytasa.

Al haber demostrado que con los tratamientos STMSS se obtuvieron CDA mayores a aquellos con proteína animal, se demuestra que los organismos pueden descomponer las proteínas vegetales en componentes más pequeños y con esto facilitar su absorción por el organismo. De esta manera se favorece la posibilidad de utilizar sustitutos vegetales para harina de pescado en alimentos para trucha arco iris, esto pues la proteína vegetal es aprovechada de igual manera que la animal por el organismo. Cabe destacar que uno de los

objetivos de este proyecto fue beneficiar económicamente a los productores de trucha disminuyendo los costos de los alimentos, por lo que hay algo que se debe tomar en cuenta. Al planear la inclusión de proteína de *Spirulina* en dietas se debe considerar la disponibilidad y el costo de la misma (Nandeesha, et al., 1998), pues su precio es elevado y su comercialización es limitada a solo unos cuantos proveedores. Por lo que la dieta 25-S al poseer la menor cantidad de polvo de *Spirulina* resulta el más económico de los tratamientos propuestos con STMSS.

7.3 Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno por organismos se relaciona con el gasto energético de la ingestión, absorción y transformación de nutrientes, crecimiento, digestión, el incremento de la actividad circulatoria vascular y la excreción de metabolitos nitrogenados (Barajas, 2009) en los organismos que ingieren una dieta. Los tratamientos difieren significativamente entre los grupos de 75-S y HP contra el resto de los tratamientos (Figura 8), también se observa una tendencia a aumentar el consumo de oxígeno conforme aumenta la inclusión de soya en los tratamientos. Esta respuesta significa que el polvo de *Spirulina* exige de los organismos un gasto energético menor en comparación con la harina de soya y que la respuesta de demanda de oxígeno por organismo alimentados con mayores concentraciones de soya es similar a la de los alimentos comerciales.

7.4 Excreción de fósforo y nitrógeno amoniacal al medio

El fósforo presente en las heces de los tratamientos con proteína vegetal se redujo comparación del registrado con tratamientos HP y AC (Figura 9). Esto se debe a que las materias primas de origen animal suelen contener grandes cantidades de fósforo en forma hydroxyapatita o fosfatos provenientes de huesos molidos, pues para fabricar harinas de pescado se secan y maceran los peces sin separar el musculo del hueso incrementando la cantidad de fosforo no asimilado por los organismos y que se desecha al medio.

Como lo demuestran los resultados de la figura 9, la disponibilidad del fósforo en los organismos de este experimento se incremento por la adición de phytasa

a los tratamientos vegetales, aumentando la facilidad para ser asimilado por los organismos (Vielma, et al., 2000; Vielma, et al., 2002; Dalsgaard, et al., 2009), esto porque aproximadamente dos tercios del fósforo en fuentes vegetales es parcialmente disponible para los peces, pues se encuentra unido a un phytato, además contener ácido phytico que tiene una gran capacidad de almacenar fósforo (Cheryan, 1980; Dalsgaard, et. al., 2009). Estos elementos provocan que el fósforo sea poco aprovechado presumiblemente por los bajos niveles de phytasa en el intestino de los peces (Coloso, et al., 2003). Además se redujo por la cantidad de fósforo presente en los vegetales a comparación de la harina de pescado (Green, et al., 2002) lo cual resultó en una excreción significativamente reducida de fósforo en heces por los organismos.

El hecho de que se presente una reducción significativa en las emisiones de fósforo en heces de organismos alimentados con STMSS, representa un punto a favor en la utilización de tratamientos con materias alternativas para lograr una reducción en fósforo proveniente de las efluentes de granjas trutícolas y con esto mejorar la calidad del medio ambiente.

El fósforo excretado al medio por orina y branquias no presenta diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (Figura 10). Esto coincide con lo reportado por Ogunkoya, et al. (2006) donde no encuentra diferencias significativas en fósforo y excretado por organismos alimentados con dietas que utilizan harina de soya como sustituto de harina de pescado. En cuanto al amonio excretado por orina, hubo una reducción significativa en la excreción por los organismos alimentados con los tratamientos 50-S y HP (Figura 11). Los demás tratamientos no difirieron del control AC. Esto implica que la utilización de STMSS no produce más emisiones de amonio por este medio, que las que actualmente se presentan con los alimentos comerciales.

Si bien únicamente el tratamiento 50-S reduce el amonio en comparación con los tratamientos control y los tratamientos STMSS no reducen fósforo excretado en orina, si existe una reducción en la emisión de fósforo por heces. La utilización de STMSS en dietas de trucha arcoíris reduce significativamente

las emisiones de fósforo al medio ambiente, previniendo procesos que conlleven a su deterioro.

7.5 Respuesta inmune

Debido a que en este trabajo los tratamientos no provocaron más del 20 % de muertes en los organismos (Figura 12), no se considera que representarían pérdidas económicas por muertes en una granja trutícola.

Los resultados de actividad lisoenzimática en el tratamiento 75-S junto con HP fueron más elevados que en los demás tratamientos (Figura 13). Estas diferencias en la actividad de la lisoenzima se deben a que específicamente en trucha arcoíris, el estrés agudo induce un incremento simultáneo en cortisol y actividad lisoenzimática, este fenómeno se ha interpretado como una respuesta "fight-or-flight" de los peces al estrés (Demers, Bayne, 1997; Caruso, et al., 2002). Esto sugiere que la alta concentración de *Spirulina* en las dietas, vuelve más propensos a los organismos al estrés, puesto que a todos los organismos en todos los tratamientos fueron sometidos a las mismas fuentes de estrés y sólo los alimentados con 75-S y HP presentaron mayor estrés. Los demás tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí, por lo que la actividad lisoenzimática no se ve afectada con la utilización de mezclas fuentes de proteína vegetal.

Los niveles de proteína en sangre del tratamiento 75-S resultaron significativamente más bajos que los demás tratamientos (Figura 14). Los niveles de proteína bajos repercuten directamente sobre los organismos pues los anticuerpos son asociados con las pseudoglobulinas, que son proteínas en la sangre (Lepkovsky, 1930). La baja concentración de proteína en sangre de este grupo coincide con la mayor mortandad y elevada actividad lisoenzimática (Figura 12) en los organismos alimentados con el tratamiento 75-S. Los organismos de este tratamiento presentaron lordosis, nado errático, coloración opaca, letargo, menor apetito y nado cerca de la superficie y finalmente morían de enfermedades por organismos oportunistas como bacterias y hongos. Por

otro lado, los organismos alimentados con tratamientos 50-S y 25-S de STMSS no difirieron en la concentración de proteína en sangre con los tratamientos control, AC y HP.

La evaluación de crecimiento de bacterias expuestas a medios de cultivo con suero sanguíneo de los organismos alimentados con STMSS no mostró diferencias. Esto debido a que estas bacterias se encuentran comúnmente en los peces y sólo bajo condiciones de estrés comienzan a causar daño a los organismos. el estrés se considera un factor que contribuye a la virulencia de la enfermedad causada por estas bacterias (Cipriano, 2001, Swann, White, Sin año). Por esta razón los resultados de Rainger y Rowley (1993) muestran que la utilización de suero sanguíneo de organismos alimentados con alimento comercial en cultivos de bacterias no muestra una disminución en el crecimiento de colonias. Por esto se puede decir que la patogenicidad de estas bacterias depende de la concentración en la que se les encuentren en el medio y el grado de estrés al cual este sometido el organismo al cual puede infectar. Adicionalmente, el efecto que mostraron las bacterias en este trabajo no difirió con el de los tratamientos control, por ello, alimentar organismos con los tratamientos STMSS no altera la respuesta a estos agentes en comparación de organismos alimentados con dietas comerciales.

8. Conclusión

El tratamiento 25-S se considera la mezcla óptima para sustituir totalmente la harina de pescado en alimentos de trucha arcoíris; debido a que no disminuye significativamente el crecimiento de los organismos, reduce las emisiones de fósforo al medio, es el más económico y no afecta la respuesta inmune no específica en los organismos en comparación con el alimento comercial.

Se aconseja la ampliación de los tiempos de prueba de alimentación para observar si los tratamientos elaborados con mezclas de harina de soya y polvo de *Spirulina* son capaces de provocar daños en los intestinos (enteritis) en organismos que los consumen.

9. Literatura citada

Adeliz P.; Rosati ,R.; Warner, K.; Wu, Y.; Muench y White,. Brown, P.1998. Evaluation of fish-meal free diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Nutrition*. 4: 255-262.

APHA, AWWA, WPCF. 1992. Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, Ediciones Díaz de Santos S.A.

Austin, B; Austin, DA. 1999. Bacterial pathogens: Disease of farmed and wild fish. 3era edicion.Praxies publishing. Reino Unido.

Austreng, E.; Storebakken, T.; Åsgård, T. Growth rate estimates for cultured Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture*. 60: 157-160.

Balebona, M.C.; Andreu, MJ; Angeles, BM; Zorrilla, I; Moriñigo, MA; Borrego, JJ. 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for Cultured Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 4269-4275.

Barajas, DCA. 2009. Harina de Linaza (*Linum_usitatissimum*) como sustituto de la harina de pescado para reducir descargas de fósforo y nitrógeno en aguas residuales en cultivos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis de Licenciatura. UNAM FES-Iztacala.

Bardach, J., Ryther J y Mclarney W. 1986. Acuicultura: crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce. A.G.T. Editores. México.

Barrows, FT; Stone, DAJ; Hardy, RW. 2007. The effects of extrusion conditions on the nutritional value of soybean meal for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 265: 244–252.

Black, K. 2001. The environmental impacts of marine fish cage culture. Sheffield Academic press. Reino Unido.

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

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: No. b1.

Cheryan, M., 1980. Phytic acid interactions in food systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 13: 297–335.

Cirpiano, R.C. 2001. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemia of fish. Fish Disease Leaflet 68. United States Department of the Interior. Fish and Wildlife Service Division of Fishery Research Washington, D. C.

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.

Dalsgaard, J; Ekmann, KM; Pedersen, PB; 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.

Dallaire, V; Lessard, P; Vandenberg, G; de la Noüe, J. 2007. Effect of algal incorporation on growth, survival and carcass composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Bioresource Technology.* 98: 1433–1439.

Demers, NE; Bayne, CJ. 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental & Comparative Immunology*, Vol. 21, No. 4, pp. 363-373.

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.

Fernandez-Inhas, F; Reis-Henriques, GE; Coimbra, J.1999. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of Nile tilapia: digestibility and growth performance. *Aquaculture International.* 7: 57–67.

Fontainhas-Fernandes,A; Gomes, E; Reis-Henriques, MA;Coimbra, J. 1999. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of Nile tilapia: digestibility and growth performance. *Aquaculture International.* 7: 57–67.

Francesco, M; Parisi, G; Médale, F; Lupi, P; Kaushik, SJ; Poli, BM. 2004. Based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 220: 801–820.

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:Issues 2-3 177-186.

- Green, JA; Hardy, RW; Brannon, EL. 2002. Effects of dietary phosphorus and lipid levels on utilization and excretion of phosphorus and nitrogen by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), laboratory-scale study. *Aquaculture Nutrition*. 8: 279-290.
- Greene, D.H.S & Selivonchick, DP. 1990. Effects of dietary vegetable, animal and marine lipids on muscle lipid and hematology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 89: 165-182.
- Halver, J. y Hardy, R. 2002. *Fish Nutrition*. Tercera Edición. Academic Press. EUA. 824 p.
- Hardy, RW; Barrows, FT., 2002. Diet Formulation and Manufacture. En Halver, J. y Hardy, R. 2002. *Fish Nutrition*. Tercera Edición. Academic Press. EUA. 824 p.
- Heikkinen, J; Vielma, J; Kemiläinen, O; Tirola, M; Eskelinen, P; Kiuru, T; Navia-Paldanius, D; Wright, AV. 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.
- Hepher, B y Pruginin Y. 1991. Cultivo de peces comerciales; basado de las granjas experimentales en Israel. Editorial Limusa. México.
- Hernandez, HLH; Teshima, S; Koshio, S; Ishikawa, M; Tanaka, Y; Alam, MS. 2007. Effects of vitamin A on growth, serum anti-bacterial activity and transaminasa activities in the juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 262: 444-445.
- Hua, K., Lange, C., Niimi, A., Cole, G., Moccia, R., Fan, M., Bureau, D. 2008. A factorial model to predict phosphorus waste output of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*. 39: 1059-1068.
- Inglis, V; Roberts, RJ; Bromage, NR. 1993. Bacterial diseases of fish. Blackwell Science. EUA.
- Lepkovsky, S. 1930. The distribution of serum and plasma proteins in fish. *The Journal of Biological Chemistry*. 667-673.
- Rainger, GE y Rowley, AF. 1993. Antibacterial activity un the serum and mucus of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, following immunization with *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish immunology*. 3: 475- 482.
- RØed, KH.; Larsen, HJS.; Linder, RD.; Refstie, T. 1993. Genetic variation in lysozyme activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 109: 237-244.

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.

Nandeesh, MC; Gangadhar, B; Varghese, TJ; Keshavanath, 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.

Ogunkoya, AE; Page, GI; Adewolu, MA; Bureau, DP. 2006. Irration of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 254: 466–475.

Olvera-Novoa, M; Dominguez-Cen, L; Marinez-Palacios, C; Olivera-Castillo, I. 1998. Effect of the use of the microalga *Spirulina maxima* as fish replacement in diets for tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters), fry. *Aquaculture Research* 29, 709-715.

Palmegiano, GB; Agradi, E; Forneris, G; Gai, F; Gasco, L; Rigamonti, W; Sicuro, B; Zoccarato, I. 2005. *Spirulina* as a nutrient source in diets for growing sturgeon (*Acipenser baeri*). *Aquaculture Research*. 36: 188-195.

Panigrahi, A; Kirana, V; Puangkaewa, 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.

Pereira, JOB; Reis-Henriques, MA; Sanchez, JL; Costa, JM. 1998. Effect of protein source on the reproductive performance of female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*. 29: 751-760.

Peters, G; Faisal, M; Lang, T; Ahmed, I. 1988. Stress caused by social interaction and its effect on susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout *Salmo gairdner*. *Dis. aquat. Org.* 4: 83-89.

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

Romarheim, O; Skrede, A; Gao, Y; Krogdahl, A; Denstadli, V; Lilleeng, E; Sotrebakken, T. 2006. Comparison of white flakes and toasted soybean meal partly replacing fish meal as protein source in extruded feed for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 256: 354–364.

Sumpter, JP. 1992. Control of growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 100: 299-320.

Storebakken, T.; Refstie, S; Ruyter, B. 2000. Soy products as fat and protein sources in fish feeds for intensive aquaculture. In: Drackley, J.K. (Ed.), Soy in Animal Nutrition. Federation of Animal Science Societies, IL, USA, pp. 127–170.

Swann, L; White, M.R. Sin año. Diagnosis and Treatment of “*Aeromonas hydrophila*” Infection of Fish. Aquaculture Extension. Illinois - Indiana Sea Grant Program. Fact Sheet AS-461

Taoka, Y; Maeda, H; Jo, JY; Kim, SM; Park, S; Yoshikawa, T; Sakata, T. 2006. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science*. 72: 755-766.

Verlhac, V; Obach, A; Gabaudan, J; Schulep, W; Hole, R. 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*. 8: 409–424.

Vielma, J., Mäkinen, T., Ekholm, P., Koskela, J. 2000. Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and algal availability of phosphorus load. *Aquaculture*. 183: 349–362.

Vielma J., Ruohonen K y Peisker M. 2002. Dephytinization of two soy proteins increases phosphorus and protein utilization by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 204: 145–156.

Volkman, H; Imianovsky, U; Oliveira, JLB; Sant’Anna, S. 2008. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina platensis)* in dealinator wastewater and salinates dynthetic medium: protein content and amino-acid profile. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39: 98-101.

Weaton, F. 1982. Acuacultura. A.G.T. Editor. México.

Yamamoto, T; Sugita, T; Furuita, H. 2005. Essential amino acid supplementation to fish meal-based diets with low protein to energy ratios improves the protein utilization in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 246: 379– 391.

Zorrilla, I; Moriñigo, MA; Castro, D; Balebona, MC; Borrego, JJ. 2003. Intraspecific characterization of *Vibrio alginolyticus* isolates recovered from cultured fish in Spain. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 1106–1116.

10. Anexo

Anexo 1

Reagente de Lowry

Se preparo el Reagente de la solución de Lowry agregando 40ml de agua destilada a un recipiente con reagente de lowry en polvo. Se mezcló bien evitando un exceso de espuma hasta que se disolvió el componente completamente.

Reagente de Fenol Folin & Ciocalteu's.

Se preparó la solución transfiriendo 18 ml de Reagente de Fenol Folin & Ciocalteu's a un envase ámbar. Se agregaron 10 ml de agua destilada. Se mezcló apropiadamente y posteriormente se agregaron 80 ml de agua destilada a la solución.

Solución Estándar de Proteínas

Para preparar la solución estándar de proteínas se agregaron 5ml de agua destilada a un recipiente con extracto de proteína. Esta solución se debe almacenar en refrigeración y sólo dura 3 meses.

Procedimiento

1. Se elaboró una curva patrón

Solución proteína Estándar (ml)	Agua Destilada (ml)	Concertación de Proteína (µg / ml)
.125	.875	50
.250	.750	100
.500	.500	200
.750	.250	300
1.000	0	400

2.

Se elaboro un tubo blanco con 1 ml de agua.

3. Se agregó la muestra de muestra a tubos debidamente etiquetados y se diluyo con 1 ml de agua.

4. Se agregó 1ml de la Solución Reagente de Lowry a los tubos patrón, blanco y muestras. Se mezcló bien.
5. Se reposaron las soluciones 20 minutos a temperatura Estándar.
6. Se agregaron rápidamente 0.5 ml de la solución Reagente de Fenol Folin & Ciocalteu's a cada tubo con solución.
7. Se dejó reposar por 30 minutos.
8. Se transfirieron las soluciones a cubetas. Se ajustó a 540nm con la solución en blanco y el resto se midió para registrar las absorbancias.
9. Multiplicar por el factor de dilución.

Anexo 2

Digestibilidad, Cromo en Heces.

Muela finamente las heces, a las cuales se les habrá eliminado previamente escamas y cualquier otra materia extraña; manténgalos a sequedad. Pese con precisión de 0.0001g de 50 a 100mg de muestra, colóquela en un matraz kjeldahl de 100 ml y pese nuevamente la charolilla para ajustar peso de la muestra. Adicione 5ml de HNO₃ y ponga a digerir en ebullición suave en una campana de extracción encendida por un mínimo de 30 min hasta que desaparezcan los vapores amarillentos. En caso de que disminuya notablemente la cantidad de líquido y continúe habiendo vapores nitrosos, adicione otros 5ml de ácido nítrico y siga digiriendo. Se recomienda que se agite cuidadosamente los recipientes con un guante que prevenga quemaduras para acelerar el proceso, para esto no se debe de remover el matr az de el dispositivo. Al término la solución debe ser de un color verde claro, translucida y no debe desprender vapores ocreos. Deje enfriar.

Ya fría la solución, agregar cuidadosamente resbalando por las paredes del matraz 3ml de ácido perclórico. Realizar la adición dentro de una campana de extracción y con mucho cuidado, ya que en caso de una digestión incompleta se puede presentar una reacción explosiva. Coloque nuevamente el matraz en el digestor y continúe la ebullición.

Primeramente rebullir  el contenido del matraz evaporando los residuos de HCL. Después en esta etapa se requerirá de una mayor cantidad calor que en la pasada para que el ácido perclórico embulla. Al lograr esto se comenzar  a formar una nube blanca dentro de la parte esférica del matraz. Debe permanecer así por el tiempo suficiente para que la solución torne de color amarillo oro. Apague el digestor y deje enfriar. Ya frío se debe formar un anillo rojizo en el borde del líquido; en caso de no formarse o si el líquido se torna verde nuevamente, volver a digerir hasta que el cambio sea permanente.

Pase el líquido frío a un matraz volumétrico de 25 ml, enjuagando el matraz kjeldahl varias veces con agua destilada y afore. Ajuste a 0 el espectrofotómetro con un blanco de reactivos y leer a 350 mm. El blanco se prepara simultáneo a la muestras usando solamente los ácidos y agua destilada no es necesario pasarlo por el mismo proceso de ebulliciones.

Cálculos

a) Calcule la cantidad de óxido de cromo (mg) presente en la muestra:

$$X = ((Y - 0.0032)/0.2089)/4$$

Donde

Y = absorbancia

0.0032 y 0.2089 son constantes

b) Calcule el % de óxido de cromo en la muestra:

$$\text{O.C.\%} = 100(X/A)$$

Donde

X = peso del óxido de cromo
A = peso de la muestra

Anexo 3

P React mo. Phosphorus, Reactive (Orthophosphate) Method 8114

1. Se enciende el Espectrofotometro HACH y se selecciona la opción de programas favoritos.
2. Se selecciona el programa 480 P React Mo.
3. Se prepara el blanco agregando 10 ml de agua destilada en un recipiente libre de fosfatos.
4. Para preparar la muestra se agregan 10 ml de la muestra en un recipiente debidamente etiquetado.
5. Se agregan 0.5 ml de Reagente Molybdovanadato (Molybdovanadate Reagent) a cada muestra y se mezcla bien.
6. La muestra se deja reposar por 7 minutos.
7. Cuando el tiempo expire, limpiar las paredes de las cubetas de lectura e introducir al espectrofotómetro. Introducir el blanco y presionar ZERO.

Limpia bien la cubeta de lectura, verter las muestras y leerlas presionando READ. Los resultados se expresan en mg/L PO_4^{3-}

Anexo 4

Método de Nessler. Method 8038

1. Se buscó en la opción de los programas guardados del espectrofotómetro HACH.
2. En el espectrofotómetro de HACH se utilizó el programa 380, N, Amonia , Ness
3. Se agregaron 16.66ml de muestra de agua en un recipiente.
4. Para preparar el blanco se agregó en otro recipiente 16.66 ml de agua destilada.
5. Se agregaron 2 gotas de estabilizador de minerales a cada recipiente.
6. Se agregaron 2 gotas de Agente Dispensor de alcohol polivinílico en cada recipiente. Se mezcló bien cada recipiente.
7. Con una pipeta y mucho cuidado se agregó 0.66 ml de Reagente de Nessler. Se mezcló bien cada recipiente.
8. Se dejó reposar 1 minuto.
9. Se transfirieron las soluciones a cubetas de vidrio para medir.
10. Se introdujo la cubeta en blanco en la ranura especial del espectrofotómetro y se ajustó a cero presionando la opción "ZERO".
11. Se retiró el blanco y se insertó la cubeta con la muestra.
12. Se presionó la opción " READ", los resultados se expresan en mg/L NH₃-N.

Anexo 5

Método 10127 Test 'N Tube Vials

1. Se enciende el Reactor (digestor) DRB 200 y se calienta a 150°C.
2. Se selecciona el programa de phosphoro, se debe esperar hasta que la temperatura marcada sea de 150°C para que comience el cronometro del aparato.
3. Se prepara el blanco con una pipeta de 5.0ml de agua destilada a un tubo de de "Total Phosphorus Test 'N Tube Vial".
4. Para preparar las muestras se agregan 5ml de muestra a un tubo de "Total Phosphorus Test 'N Tube Vial".
5. Posteriormente se agrego el contenido de un sobre de Persulfato de potasio en polvo (Potassium Persulfate Powder Pillow) a cada tubo. Se cerro y agito para disolver.
6. Una vez que el reactor se encuentra a 150°C se introducen los tubos (tapados) en los compartimentos.
7. Se presiona la opción TIMER>OK y comienza un cronometro en cuenta regresiva desde 30 min.
8. Una vez que el tiempo termino, se remueven los tubos del reactor y se dejan enfriar hasta que alcanzan temperatura ambiente.
9. Se agregan 2.0 ml de hidróxido de sodio al 1.54 N a cada tubo, se tapa y se mezcla.
10. Con un gotero de polyethyleno se agregan 0.5 ml de reagente de molybdovanadato (Molybdovanadate Reagent) a cada tubo, se tapa y mezcla.
11. Se dejan reposar 7 minutos las soluciones.
12. Ya transcurrido el tiempo se limpian con una toalla perfectamente los tubos para remover grasa u otra marca.
13. Se coloca el tubo blanco en la ranura del espectrofotómetro.
14. Se presiona ZERO.
15. Se saca el blanco y se introducen los tubos con las muestras preparadas.
16. Se oprime la opción READ y se leen. Los resultados se expresan en mg/L PO_4^{3-} .

Anexo 6

Actividad antibacterial del suero.

Se mezclaron las soluciones A, B y C en una proporción 1:1:1. De esta solución se tomo una alícuota para hacer 5 diluciones de 1:10 hasta 1:1X10⁵ (utilizando la solución A como solvente) y de estas se tomo una alícuota de 100 microlitros que fue colocada en una caja petri con medio TSA incubando a 25°C por 24 hrs. Las bacterias viables se contaron por el método de conteo de placa y se calculó la supervivencia. Se elaboró un grupo control sin suero que se considero como el 100% de supervivencia. Las cepas de bacterias se incubaron por 24 horas en medio TSA (Trypto-Soya agar).

Solución A)

Buffer Tris (ph 7.5, 0.05 M conteniendo 0.5 mmol/ml Ca²⁺).

Solucion B)

Suspensión de la bacteria (0.001 mg/ml).

Solucion C)

Suero sanguíneo y buffer tris (1:4).