



Universidad Nacional Autónoma de México

Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

“Uso de proteína aislada de soya y de concentrado de proteína de soya con la adición de (Proteasa y DL- metionina) como sustitutos de harina de pescado en dietas balanceadas de crías de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*”

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Limnología)

P r e s e n t a

Topacio Meza López

Director de Tesis:

Dr. Luis Héctor Hernández Hernández

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Comité Tutorial:

Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortez Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación del SISAL

Dra. Crisantema Hernández González

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Mazatlán

Dra. María Cristina Chávez Sánchez

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Mazatlán

Dr. Armando García Ortega

UNIVERSITY of HAWWII HILO

Asesor externo: M. en C. Mario Alfredo Fernández Araiza

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

México D.F. Enero del 2013



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.

Todo lo que hagas en la vida será insignificante, pero es muy importante que lo hagas porque nadie más lo hará. Como cuando algo llega a tu vida y una parte de ti dice: no estás mínimamente preparado para esto; pero la otra parte dice: hazlo tuyo para siempre

Mahatma Gandhi

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el Dr. Luis Héctor Hernández Hernández, quien desde un principio me apoyo en la elaboración y conclusión de mi tesis, por su apoyo y sus comentarios.

A mi sinodal el M. en C. Mario Alfredo Fernández Araiza, por su forma diferente de enseñanza, por orientarme a cada momento que se le solicitaba y compartir más de lo que se tenía duda, por ayudarme a mejorar mis características profesionales para ser una buena PROFECIONISTA por los momentos gratos dentro y fuera del laboratorio.

A mis sinodales la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortes Dr. Armando García Ortega, Dra. Crisantema Hernández Gonzáles, Dra. María Cristina Chávez Sánchez por su disposición en la mejoría de la tesis y sus observaciones.

Al Biol. Omar Angeles López por su disposición y apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio por todos sus buenos consejos y compartir momentos tan agradables.

A EVONIK (Manuel Alvares), por el apoyo.

MUCHAS GRACIAS POR TODO.

Dedicatoria

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A la mujer más valiosa de mi vida que sin su apoyo no estaría en el lugar en donde me encuentro, gracias mami (Virginia López Cruz) por darme la vida y sobre todo por ser ese motor que me da la fuerza para seguir adelante. A mi tía (Ma. Esther López Cruz) por estas ahí desde el inicio de esta aventura.

A ti abuelo Mauro López (†) por enseñarme lo fuerte y diferente que era y sobre todo saber que hasta el último momento siempre fui importante para ti.

A dos personas magníficas que entraron a mi vida cuando estaba apunto de flaquear muchas gracias Don Magdaleno López Barrón (†) y a ti Christian López Osuna porque me demostraste que no se necesita compartir la misma sangre o genes para quererlos tanto.

Al Dr. Antonio Murillo Olmeda por apoyarme con sus valiosos consejos porque sin ellos no estaría logrando esta meta.

Todos mis amigos del Acuario Daniel (el Dany), Yes, Tere, Moni (monte), Moni, Lupe (calabacita), Leydi (puchunga), Félix, Alan, Andy, Santiago, Omar Jasso, Omar (Ozono), Nancy, Anel, Yolo, Mirna, Esmeralda, Rene, Gerardo, Esleban, Jorge Ricardo (mi laboratorista) por compartir los buenos y malos momentos.

A mis amigos a quienes el mar nos juntó, porque con ellos entendí que no es necesario llevar mucho tiempo de conocerlos para poder llamar a alguien hermano, Armando Pacheco, Javier Rojo, Pablo Meza, Rosario, Christian. Emmanuel Gracias por tantas cosas vividas por las risas, lágrimas, los consejos, por su compañía y su amistad sincera, por ser parte de mi vida, los quiero mucho amigos.

Índice

Introducción.....	4
Antecedentes.....	7
Hipótesis.....	10
Objetivo.....	11
Objetivo General.....	11
Objetivo específico.....	11
Materiales y Métodos.....	12
Diseño experimental.....	12
Dietas.....	12
Obtención de peces.....	15
Pruebas de alimentación.....	16
Prueba de Digestibilidad.....	18
Determinación de excreción de P y N y El Consumo de Oxígeno.....	19
Pruebas de concentración de Fosforo (P) y Proteína en plasma sanguínea	19
Análisis Proximales	20
Análisis estadístico.....	20
Resultados.....	21
Discusión	33
Conclusiones.....	37
Referencias.....	38
Anexo 1.....	45
Anexo 2.....	47
Anexo 3.....	49
Anexo 4.....	50
Anexo 5.....	51
Anexo 6.....	52

INTRODUCCION

La Acuicultura es una de las actividades productoras de alimento con más crecimiento a nivel mundial, pues aumentó del 3.9 % de la producción total de productos pesqueros en 1970 al 27.1 % en 2000 y al 32.4 % en 2004. El crecimiento medio de este sector es del 8.8 % al año, mientras que en el mismo periodo, la pesca de captura creció solamente a razón del 1.2 % (Vela et al. 2007)

Las estadísticas mas recientes (CONAPESCA-SAGARPA 2008) reportan un incremento anual aproximado del 10% de la producción acuícola de México, con una producción por acuicultura en el 2008 de 283,625 toneladas, que representa el 16.25% de la producción total de productos pesqueros.

Este crecimiento de la actividad acuícola, ha sido acompañado por un aumento en la demanda de alimentos balanceados (Gatlin *et al.* 2007) y de acuerdo con la FAO (2006), empieza a generar algunos efectos negativos en la industria y el ambiente como:

- El aumento en las capturas del medio natural de especies pelágicas que sirven de materia prima para harina y aceite de pescado y que son los ingredientes principales de las dietas comerciales de especies carnívoras y omnívoras.
- El enriquecimiento de productos orgánicos en las aguas de los estanques de cultivo, creando sedimentos y zonas con poca cantidad de oxígeno.
- Cambios en las comunidades del bentos.
- Eutrofización de lagos y zonas costeras cercanas a las granjas de cultivo.

Particularmente importante, el problema de la eutrofización es a nivel mundial y actualmente hay diferentes propuestas para reducir las descargas de P y N de las granjas. Entre ellas una de las más prácticas y baratas es el uso de alimentos conocidos como “DIETAS AMIGABLES CON EL AMBIENTE” ya que, la formulación de estas dietas considera: (i) el uso de ingredientes con una cantidad limitada de P, (ii) que el P disponible tenga una alta bio-disponibilidad y (iii) que las dietas tengan una alta tasa de digestiva.

La harina de pescado, fuente de proteína en las dietas comerciales, es el ingrediente que más aporta P y N y se ha sugerido que su reemplazo por proteínas alternativas podrían reducir las descargas de estos nutrientes al medio. Las fuentes de proteína que sustituya a la harina de pescado deberán estar fácilmente disponibles, ser accesibles económicamente y tener una calidad adecuada en el aporte de nutrientes. En la actualidad se han evaluado ingredientes, tanto de origen vegetal como de origen animal, que cumplan estas características.

Dentro de los ingredientes vegetales, la soya es cada vez más común en la alimentación de organismos acuáticos por su composición química, perfil de aminoácidos, con excepción de la metionina y en menor grado la lisina como aminoácidos limitantes (Tacon et al. 1983), elevado contenido de vitaminas y menor costo al de HP (Akiyama, 1992). Sin embargo, contiene factores antinutricionales y reducen la palatabilidad de los alimentos cuando se preparan con niveles elevados de este material (Tacon et. al., 1983; Webster et al., 1992b). Otros ingredientes de origen vegetal analizados son los subproductos de semillas de oleaginosas, proteínas unicelulares, concentrados proteínicos. Así como semillas y hojas de leguminosas. Han obtenido resultados muy variados pero predomina el hecho que a niveles de inclusión de proteína de origen vegetal en alimentos acuícolas, producen una reducción del crecimiento y una pobre eficiencia alimentaria en los organismos que los consumen. Mientras que la composición química del CdS sugiere que tiene potencial como ingrediente en las dietas para salmónidos.

En México una de las especies más importantes de cultivo es la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*): en el 2010 la *Sagarpa* dio a conocer que la producción nacional de trucha registró un crecimiento anual del 8%, con lo que se contabilizan más de 5 mil toneladas, con un valor de más de 218 millones de pesos. Por lo tanto, la producción de trucha arcoíris en México es un sistema productivo con grandes avances. Gran parte de esta producción se realiza de forma intensiva, en la que se utilizan dietas balanceadas comerciales, las cuales tienen entre un 25 y 40 % de HP.

Para poder sostener este desarrollo en la producción, se requiere dietas nutricionalmente balanceadas que para el caso de salmónidos y otros peces carnívoros. La trucha arcoíris se ha logrado adaptar a diferentes condiciones, mostrando una buena aceptación a los alimentos balanceados, lo que hace una de las razones mas importantes de su amplia distribución, en especial considerando que no todas las especies se adaptan a distintos ambientes (Zamora,G. 1999).

El principio de la alimentación y nutrición para la producción de la trucha arco iris inicia desde el conocimiento de sus hábitos alimenticios. Sin embargo en los sistemas de cultivo intensivo es necesario incorporar al alimento elaborado con los nutrientes indispensables (Barnabè, 1989), Según Harris (1980), las dietas para peces, deben ser ricas en proteínas. La cantidad requerida de este nutriente en dietas formuladas, depende de la composición de los aminoácidos de la dieta. Los peces como otros animales, no presentan necesidades absolutas de proteínas, pero demandan una mezcla bien balanceada de aminoácidos indispensables y dispensables.

La trucha necesita para su desarrollo 10 aminoácidos esenciales, de los cuales la lisina y la metionina son las más importantes (Tabla 1). Estos aminoácidos pueden encontrarse en proteínas de origen animal, ya que las proteínas de origen vegetal no las contiene en su totalidad y calidad.

Tabla 1. Requerimientos de aminoácidos en la trucha (% de aminoácidos por cada 100 grs de dieta)

Aminoácidos	Cantidad (%)
Arginina	1.4 - 3.5
Fenilalanina	2.5 - 6.5
Histidina	0.6 - 1.6
Isoleucina	1.0 2.4
Leucina	1.8 - 4.4
Lisina	2.1 - 5.3
Metionina	0.5 - 0.8
Treonina	1.4 - 3.4
Triptófano	0.2 - 0.5
Valina	1.2 - 3.1

ANTECEDENTES

Varios trabajos han demostrado que fuentes alternativas de proteína pueden sustituir a la harina de pescado en dietas balanceadas para peces en cultivo.

Asimismo, se ha demostrado que el uso de harina de soya tiene un efecto positivo en la utilización del P y por lo tanto, hay una menor cantidad de este elemento en los productos de desecho de los organismos.

Por otra parte Olivia-Teles et al. (1994) Observaron el efecto del remplazamiento del 25% de la harina de pescado (HP) por mezclas de harina de soya previamente procesadas en crías de trucha arcoíris, en la cual obtuvieron que estas dietas tuvieron un resultado favorable sobre el crecimiento y la tasa conversión alimenticia, pero dicha mejora no se vio reflejada en la digestibilidad tanto de la proteína así como la de energía.

Moyano et al. (1992) comprobó que niveles de sustitución de hasta un 45% de la proteína de HP por harina de soya no afecta en el crecimiento, aceptación y conversión del alimento, así como en las propiedades organolépticas de la trucha arcoíris. Gomes *et al.* (1995) remplazaron hasta un 66% de HP por harina de soya sin efectos adversos para trucha. Sin embargo, Pereira *et al.* en 1998, al sustituir completamente proteína animal por proteína de soya, obtuvo un menor crecimiento de trucha arcoíris. Al igual que (Adeliz *et al.* 1998) encontraron que se reduce el crecimiento aunque la tasa de ingesta permanece igual en comparación de un alimento comercial.

Posteriormente Kaushik *et al.* (1995) suministro dietas a trucha arcoíris con sustituciones de 33 a 100% de harina de pescado por CdS. Las dietas con el más alto nivel de inclusión de CdS (reemplazando de 66 a 100% de harina de pescado) fueron suplementadas con L- metionina. La ganancia final de peso, el coeficiente de crecimiento diario, la eficiencia del alimento y la proporción de eficiencia de proteína no fueron significativamente diferentes en los peces alimentados con todas las dietas con CdS y la dieta de control con HP.

En cuanto al remplazo que realizo Mambrini et al (1999) de HP por CdS en la dieta de trucha arcoíris, observando que la digestibilidad de la proteína fue del 92% y la digestibilidad de los lípidos y energía fue reducida al 19% cuando la HP fue sustituida totalmente. Concluyendo que el efecto negativo consistió en la alta incorporación de isoflavonas o la interacción entre la proteína de la soya y el componente de lípidos en la dieta. Un año mas tarde Carter y Hauler (2000) realizaron una sustitución de HP por proteína vegetal en la dieta del salmón del atlántico (*Salmo salar*), encontrando que la ganancia en peso del control en una dieta comercial fue significativamente mayor que los tratamientos, además se observó que el aumento en peso y la tasa de eficiencia del alimento fue mayor que el control cuando se utilizo harina de soya.

Por otra parte Refstie et al. (2001) reemplazaron parcialmente la HP con CdS (30% de la proteína dietaría) en dietas de lípidos media y alta (32 y 39% de grasa, respectivamente) para salmones del Atlántico maduros. La ganancia de peso y la acreción de proteína en peces alimentados con dietas de CdS fueron significativamente más altas que en los peces alimentados con la dieta de control de HP. Storebakken et al. (2000) lo corrobora usando una sustitución aproximada del 75% de HP por CdS en la dieta de salmónidos demostrando que no efecto el crecimiento y disminuyo la cantidad de P en la excreción fecal y metabólica. A su vez Sajjadi y Carter (2004) encontraron que la adición de fitasa a dietas de salmón del Atlántico *Salmo salar*, mejoró la digestibilidad de proteína cuando se adicionó ácido fitico, un compuesto anti nutricional, a las dietas.

Thiessen et al. (2004) realizaron un estudio similar encontrando que en dietas comerciales para trucha arcoíris la sustitución de HP por harina de grano de canola sin ácido fitico no afecto el crecimiento. Mientras que Drew *et al.* (2005) obtuvieron que la adición de proteasa comercial mejoro la digestión de proteína de harinas de canola y arvenjón, así como la eficiencia del alimento en la trucha arco iris.

Hemre *et al.* (2005) concluyeron que el uso de harina de soya normal y genéticamente modificada en dietas de salmón del Atlántico no afectó el crecimiento, composición proximal del cuerpo y química de la sangre, comparando con una dieta con HP.

Por otra parte hasta la fecha no se ha evaluado ampliamente el AdS en alimentos acuícolas, siendo lo más conveniente como una fuente de proteína para los peces carnívoros, aunque no se ha establecido firmemente, a pesar de la digestibilidad de los nutrientes es mayor que el CdS, cuando se utiliza un remplazo del 40% de la harina de pescado para dietas de trucha arcoíris (Glencross *et al.* 2005)

HIPOTESIS

Durante el procesamiento para la obtención de la proteína aislada de soya y del concentrado de proteína de soya se eliminan sustancias anti nutrientes, y se pierden algunos aminoácidos indispensables, por lo que el uso de estos en dietas balanceadas mas la adición de proteasa y DL-metionina, tendrán un efecto positivo en el crecimiento de los organismos, así como en la utilización del P y N, disminuyendo la cantidad de P y N en las heces y excreciones metabólicas.

OBJETIVOS.

Objetivo general.

Determinar el efecto de dietas con proteína aislada de soya, concentrado de proteína de soya y la adición de proteasa en el crecimiento y excreción de fosforo y nitrógeno de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

Objetivos particulares.

- Determinar el efecto del uso de la proteína aislada de soya, concentrado de proteína de soya y la adición de proteasa en el crecimiento de trucha arco iris.
- Determinar el efecto de las dietas con la proteína aislada de soya y de concentrado de proteína de soya, en la excreción de fósforo y compuestos nitrogenados en trucha arco iris.
- Determinar el efecto de las dietas con el concentrado de proteína de soya con la adición de DL-metionina (cubierta y s/ cubrir) en el crecimiento de trucha arco iris.
- Determinar el efecto de la proteína aislada de soya y de concentrado de proteína de soya, en la composición proximal del cuerpo de trucha arco iris.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Producción Acuícola de la FES Iztacala, considerando dos pruebas de alimentación con juveniles de trucha arco iris: en la primera se evaluaron cuatro dietas con sustitución completa de la harina de pescado con el CdS o AdS. Para la segunda prueba, se eligió la dieta que genero mayor crecimiento y se suplemento con DL-metionina cubierta y sin cubrir.

Dietas

Para la primera prueba de alimentación se formularon cuatro dietas (contenido de proteína mínimo de 40%), considerando una sustitución de 100% de la harina de pescado; dos con el AdS (contenido de proteína cruda, 88%) con y sin proteasa y las dos restantes con el CdS (contenido de proteína cruda, 62%), también con y sin proteasa. Como dieta control se formulo una dieta con harina de pescado como fuente única de proteína. Las formulaciones completas se muestran en la Tabla 2.

Para la segunda fase se utilizo la Dieta 4 (CdS y proteasa) y se agregó DL-metionina (Evonik de Mexico). Se agregaron 0.07 g/kg de DL-metionina en forma libre (Dieta 5) y recubierta con liposomas (Dieta 6). El recubrimiento se realizó con una capa lipídica elaborada de colesterol y fosfatidilcolina, de acuerdo a. Como dieta control se suministro alimento comercial. La formulación completa de las dietas se muestra en la Tabla 3.

Tabla 2. Formulación de las dietas experimentales y control.

Ingredientes (g/kg)	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Control
Harina de pescado	0	0	0	0	700
CdS	0	0	645.1	645.1	0
AdS	340	340	0	0	0
Harina de soya	50	50	0	0	0
Aceite de pescado	50	50	50	50	50
Lecitina de soya	50	50	50	50	50
Mezcla de vit. y min.	40	40	40	40	40
Dextrina	100	100	100	100	100
Gluten	150	150	50	50	50
α -celulosa	220	219.2	64.9	64.1	10
Proteasa	–	0.8	0	0.8	0
Composición Proximal (%)			proteína		
	41.2	41.2	48.9	48.9	
			(%) amino ácidos		
Metionina	0.49	0.49	0.64	0.64	
Cistina	0.53	0.53	0.65	0.65	
Metionina + Cistina	1.02	1.02	1.29	1.29	
Lisina	2.03	2.03	2.55	2.55	
Treonina	1.36	1.36	1.69	1.69	
Arginina	2.65	2.65	3.1	3.1	
Isoleucina	1.7	1.7	1.99	1.99	
Leucina	2.94	2.94	3.41	3.41	
Valina	1.73	1.73	2.09	2.09	
Histidina	0.9	0.9	1.12	1.12	
Fenilalanina	2	2	2.22	2.22	
Glicina	1.57	1.57	1.88	1.88	
Serina	1.94	1.94	2.21	2.21	
Alamina	1.49	1.49	1.85	1.85	
Acido aspártico	4.08	4.08	4.74	4.74	
Acido glutámico	8.04	8.04	8.81	8.81	

Tabla 3. Formulación de las dietas experimentales

Ingredientes (g/kg)	Dieta 5	Dieta 6
Harina de pescado	0	0
CdS	645.1	645.1
Aceite de pescado	50	50
Lecitina de soya	50	50
Mezcla de vit. y min.	40	40
Dextrina	100	100
Gluten	50	50
α - celulosa	54.09	54.09
Proteasa	0.8	0.8
DL-metionina	0.07	0.07
Composición Proximal	Proteína	
	46.42	46.49

(%) aminoácidos		
Metionina	0.67	0.67
Cistina	0.68	0.69
Metionina + Cistina	1.35	1.36
Lisina	2.72	2.74
Treonina	1.81	1.80
Arginina	3.33	3.36
Isoleucina	2.12	2.14
Leucina	3.62	3.65
Valina	2.21	2.25
Histidina	1.21	1.21
Fenilalanina	2.42	2.43
Glicina	1.98	1.99
Serina	2.39	2.38
Prolina	2.88	2.91
Alamina	1.98	1.99
Acido aspártico	5.00	5.03
Acido glutámico	9.49	9.56

Las dietas se prepararon de acuerdo a Cruz *et al.* (2011): los ingredientes en polvo se pesaron y homogenizaron en una batidora por 20 min, después se agregó el aceite de pescado y la lecitina de soya previamente mezclados y se mezclaron por otros 20 min. Finalmente se agregó agua purificada en una concentración final de 40% (peso/volumen) y se homogenizo hasta obtener una masa, la cual se hizo pasar por un molino para carne equipado con un cedazo de 0.5 mm de diámetro. Los pellets obtenidos se secaron en un horno a 60° por 4 hrs y se almacenaron a -24 °C hasta su uso.

Obtención de peces

Las crías de trucha arco iris se obtuvieron del Centro Acuícola “El Zarco”, ubicado en el municipio de Ocoyoacac, Estado de México. Los organismos fueron transportados al Laboratorio de Producción Acuícola en bolsas de plástico con oxígeno y sobre una cama de hielo para mantener a los organismos a una

temperatura aproximada de 5 °C. Las crías se mantuvieron en tanques de 500 L con aireación y filtración constantes, a una temperatura de 15°C y se alimentaron con una dieta para trucha (alimento Malta Cleyton). Los organismo estuvieron bajo estas condiciones hasta el inicio de las pruebas de alimentación.

Pruebas de alimentación

Para las pruebas de alimentación, se utilizo un sistema de recirculación que consta de 35 tanques de plástico de 100 L de capacidad cada uno (Figura 2). En la primera etapa, se distribuyeron aleatoriamente 15 organismos por tanque con una biomasa inicial 1.95 ± 0.3 g por pez, y cada dieta se dio a grupos por triplicado. Para la segunda etapa se utilizaron 15 organismos con una biomasa inicial de 1.33 ± 0.3 g por pez, con cada tratamiento por triplicado. Los organismos se alimentaron diariamente con una porción del 7% de la biomasa por tanque por día, dividida en dos raciones ofrecidas en la mañana y en la tarde. Los organismos se pesaron cada 10 días y el tamaño de ración se ajusto de acuerdo al peso. Treinta minutos después de alimentados, se realizo un sifoneo de cada tanque para la colecta del alimento remanente y de heces fecales las cuales se utilizaron para la determinación de fosforo.

Durante las pruebas de alimentación, la temperatura del agua fue de 15 ± 2 °C en la primera etapa y de 18 ± 2 °C en la segunda etapa, oxigeno disuelto de 6 ± 1 mg/L y el pH de 8 ± 1 para ambas pruebas. Los tanques fueron provistos con aireación constante y se mantuvo un flujo de agua de 1.5 L/min.

La primera prueba tuvo una duración de 60 días y la segunda de 50 días. Al termino de estos periodos, los organismos se mantuvieron 24 hrs sin alimentación y posteriormente, se pesaron para obtener los parámetros de crecimiento. Aleatoriamente se seleccionaron 10 peces y se regresaron a los tanques respectivos para alimentarlos 10 días mas con las dietas añadidas con óxido de cromo (J.T.Baker) como marcador inerte a una concentración del 1% y coleccionar heces para determinar los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de la porción de la proteína. Los peces restantes se utilizaron para evaluar el consumo de oxígeno, excreción de P y N.



Figura 2. Sistema de recirculación donde se llevaron a cabo las pruebas de alimentación de las truchas.



Figura 3. Alimentación manual



Figura 4. Recolección de excretas

Los parámetros de crecimiento considerados fueron (Adelizi *et al.* 1998; Refstie *et al.* 1997; Mundheim *et al.* 2004):

Ganancia en peso, GP (%) = $[(\text{Peso final organismos} - \text{Peso inicial organismos}) / \text{Peso inicial organismos}] \times 100$;

Tasa de Crecimiento Especifico, TCE (%/dia) = $[(\ln \text{Peso Final} - \ln \text{peso inicial}) / \text{Número de días de alimentación}] \times 100$;

Tasa de ingesta, TI (g/día/pez);

Tasa de conversión del alimento, TCA = Alimento consumido (g en base seca) /
Ganancia en peso (g)

Determinación de la digestibilidad

Para determinar los CDA de la proteína, se cuantifico el contenido de proteína y el oxido de cromo en las heces. El contenido de proteína se determino mediante la técnica reportada por la AOAC (1990), mientras que el oxido de cromo mediante una digestión acida con una mezcla de ácido perclórico y ácido nítrico a 250 °C. El contenido de oxido de cromo se determino con la formula (Furukawa y Tsukahara, 1966):

$$CR_2O_3 = \left(\frac{y-0.032}{0.2089} \right) \div 4$$

Donde,

y = absorbancia de 350 nm.

Los valores de CDA (%) se calcularon con la ecuación (Austreng 1978):

$$CDA = 100 - [(\% IA / \% IH) \times (\% PH / \% PA) * 100]$$

Donde:

IA=indicador en el alimento

IH indicador en las heces

PH = proteína en heces

PA = proteína en el alimento

Determinación de excreción de P y N y el consumo de oxígeno

Para la determinación de consumo de oxígeno y excreción de P y N, se utilizó un sistema de flujo cerrado, el cual consiste de frascos individuales de 1 L conectados por mangueras en serie (Figura 5). Los frascos se llenaron lentamente con agua y una vez llenos, se colocó un organismo por cada recipiente. Se determinó la concentración inicial de oxígeno disuelto y se tomaron muestras de agua para determinar el P y N inicial, posteriormente los frascos se cerraron herméticamente. Después de 30 min, los frascos se abrieron, se midió el oxígeno disuelto y se tomaron de nuevo muestras de 50 ml. Para determinar la concentración de P y N amoniacal se utilizaron las técnicas de molibdovanadato y Nessler, respectivamente (Clesceri *et al.*, 1998). La determinación de oxígeno disuelto se realizó con un oxímetro digital (YSI 85 Yellow Springs, Ohio 45387, USA) y el oxígeno consumido se calculó como la diferencia entre las concentraciones inicial y final-



FIGURA. 5. Cámara de flujo cerrado (Respirometro).

Pruebas de concentración de Fosforo (P) y proteína en plasma sanguíneo.

Para la prueba de concentración de P y N en plasma. Se tomaron muestras de sangre de 3 ó 4 organismos de cada tratamiento seleccionados aleatoriamente, para obtener un volumen de 2 ml de sangre, el plasma se obtuvo por el método de Taoka. (2006). Para la determinación de proteína en plasma se utilizaron la

técnica Micro Lowry, descrita en el producto “Total protein kit, Micro Lowry, Petersons modificación (sigma)”.La determinación del P se hará por el método molibdovanadato digestión ácida con persulfato (HACH).

Análisis proximales

El contenido de proteína en las dietas y cuerpo de los organismos, se determinara con un equipo Kjeltex 2100. El contenido de lípidos se determinara con la técnica de extracción Metanol-Cloroformo reportada por Blight y Dyer (1959) t. El contenido de humedad y cenizas se determinará con la técnica reportada por la AOAC (1990).

Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando un análisis de varianza (ANDEVA) de una variable de acuerdo a Durán *et al.* (2003). Si se encuentran diferencias entre las medias se evaluarán con un prueba de Duncan de rango múltiple, utilizando un error de 5% ($P < 0.05$) para cada grupo de comparaciones.

RESULTADOS

Primera fase.

Los datos de crecimiento se muestra en la Tabla 6 y se observó una tendencia de valores de peso final (PF), ganancia en peso (GP) y tasa de crecimiento específico (TCE) significativamente más altos en los organismos alimentados con la dieta D4 y la dieta control HP. Con respecto a la tasa de ingesta (TI), se observó valores más altos en los organismos alimentados con las dietas que contienen proteasa, pero solo se presentaron diferencias significativas en el grupo alimentado con la dieta D4. El grupo control presentó valores más altos que los grupos alimentados con las dietas experimentales. En el TCA y TED no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 6. Parámetros de crecimiento y alimento

Tratamientos	PF	GP (%)	TCE	TI	TCA	TED
D1	11.8 ± 1.1a	538 ± 65a	2.49±0.23a	0.38 ± 0.003a	0.67 ± 0.071	1.49±0.15
D2	11.8 ± 2.1a	549 ± 118a	2.52±0.16a	0.42 ± 0.005a	0.72 ± 0.178	1.46±0.30
D3	10.1 ± 1.9a	455 ± 107a	2.40±0.21a	0.41 ± 0.03a	0.83 ± 0.110	1.21±0.17
D4	17.1 ± 0.3b	817 ± 2b	3.17±0.002b	0.55 ± 0.01b	0.61 ± 0.012	1.63±0.03
HP	17.6 ± 2.7b	848 ± 134b	2.93±0.53b	0.64 ± 0.08c	0.73 ± 0.220	1.46±0.46

GP Ganancia en peso.

TCE Tasa de Crecimiento Específico.

TI. Tasa de Ingesta diaria

TCA. Tasa de Conversión del Alimento

TED. Tasa de Eficiencia de la Dieta.

En la Figura 7 muestra el factor de condición (K) de los organismos y se observa una tendencia de valores más altos en los grupos de juveniles alimentados con el D1.

La supervivencia obtenida por los organismos alimentados con las dietas experimentales alcanzo un promedio de 91.54% sin diferencias significativas lo cual se presenta en la figura 6.

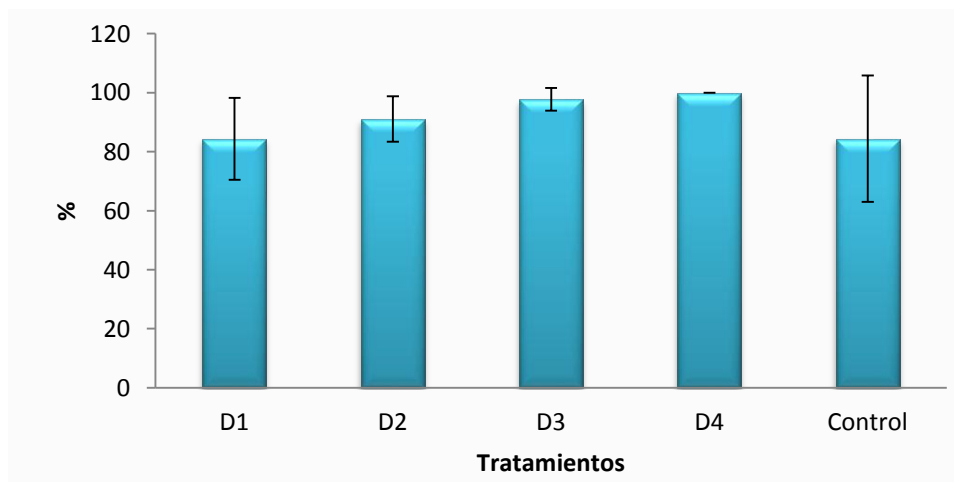


Figura 6. Porcentaje de supervivencia de crías de trucha arco iris. Las barras son la media \pm la desviación estándar. No hay diferencia significativa entre los tratamientos.

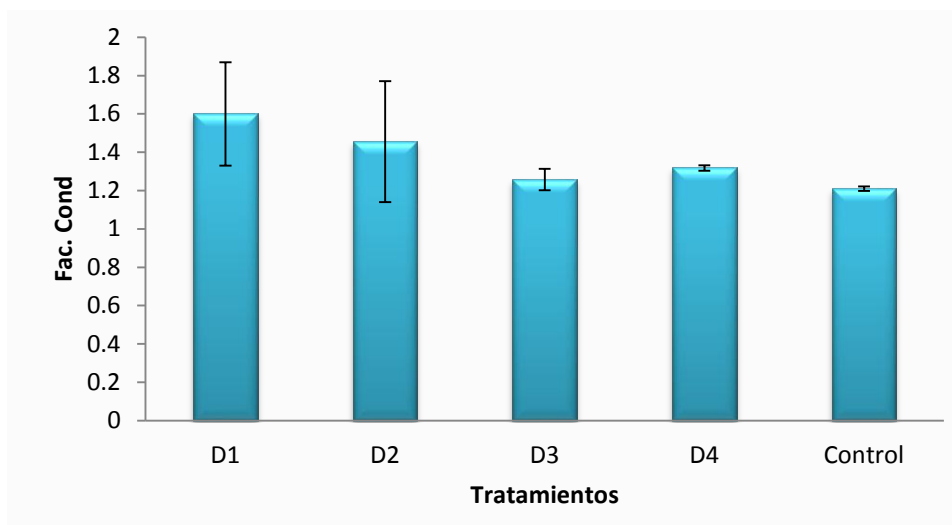


Figura 7. Factor de condición de crías de trucha arcoíris. Cada barra es la media \pm la desviación estándar. No hay diferencia significativa entre tratamientos.

Con respecto al CDA, se observaron valores más altos en los organismos alimentados con las dietas que no contienen proteasa, pero solo se presentaron diferencias significativas en el grupo alimentado con la dieta control (Figura 8).

El consumo de oxígeno resulto menor en el tratamiento D3, esta dieta oxida mejor los nutrientes y esta relacionada con la excreción de nitrógeno, produciendo la mayor cantidad. Presentando diferencias significativas al compararla con el control (Figura 9).

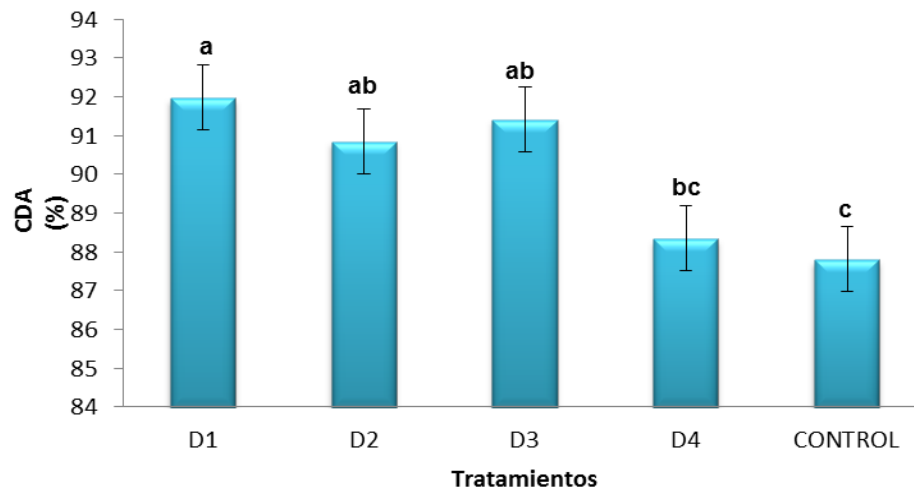


Figura 8. Coeficiente de digestibilidad aparente de crías de trucha arcoíris. Las barras son la media \pm la desviación estándar. Letras diferentes expresan que hay diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$).

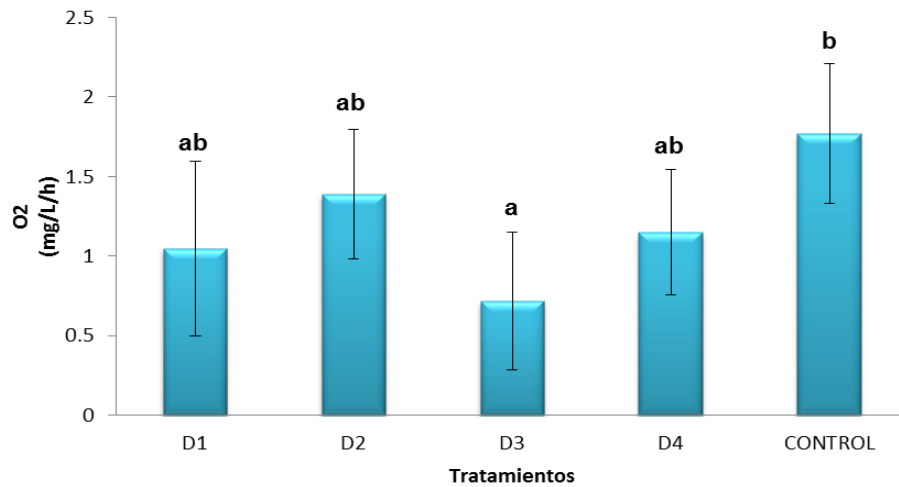


Figura 9. Consumo de oxígeno por crías de trucha arco iris. Cada barra es la media \pm la desviación estándar. Letras diferentes expresan que hay diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$).

En los resultados del contenido de P excretado por orina (Figura.10) muestra que los valores mas altos se alcanzaron en los tratamientos D1 y HP, observando una disminución en los tratamientos D2, D3 y D4. Respecto a las excreciones de nitrógeno se observa que los grupos alimentados con las dietas experimentales mostraron diferencias significativas entre los organismos alimentados con la D3 y D4 excretaron la mínima, comparado con las otras dos dietas experimentales y la control. (figura.11)

El valor más alto del contenido de P en heces lo obtuvo la dieta control, a diferencia de los tratamientos D2 y D4 que obtuvieron la excreción mínima, presentando diferencias significativas (Figura 12).

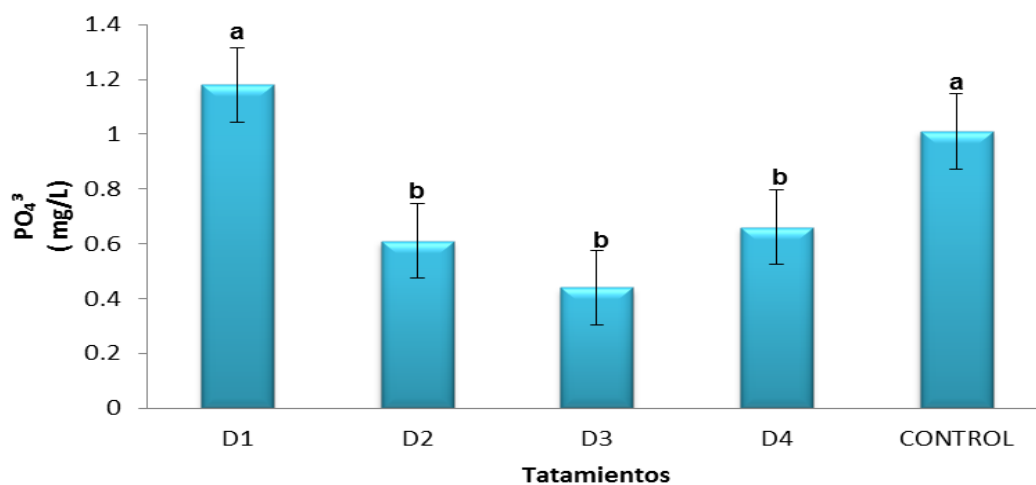


Figura 10. Fósforo excretado por crías de trucha arco iris. Cada barra es la media \pm la desviación estándar. Letras diferentes expresan que hay diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$).

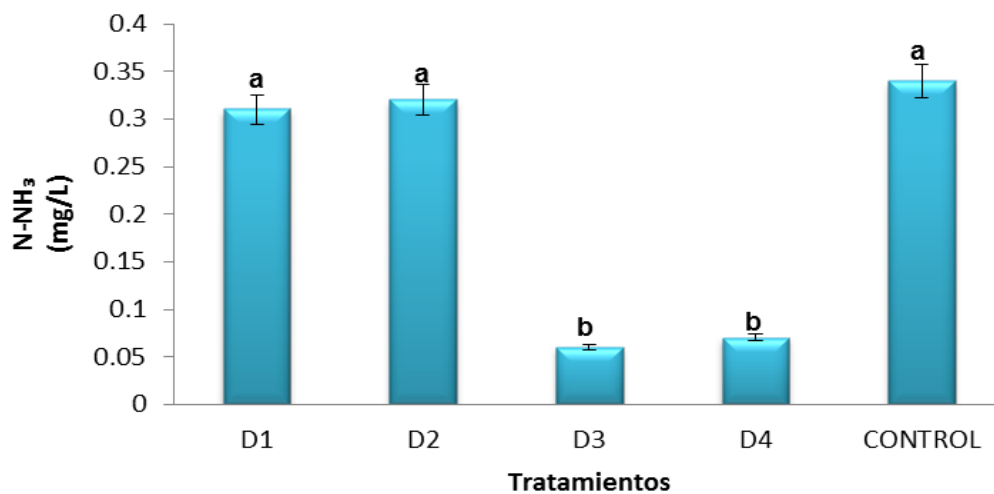


Figura 11. N amoniacal excretado por crías de trucha arco iris. Cada barra es la media \pm la desviación estándar. Letras diferentes expresan que hay diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$).

La mayor concentración de P en plasma sanguíneo correspondió a las dietas experimentales presentando diferencia significativa.

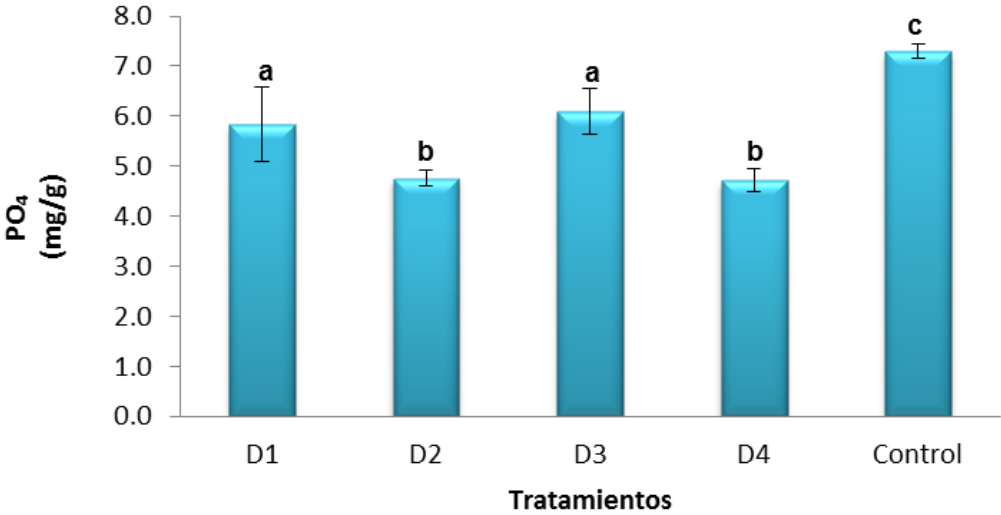


Figura 12. Fósforo excretado en heces por crías de trucha arco iris. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar. Letras diferentes expresan que hay diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$).

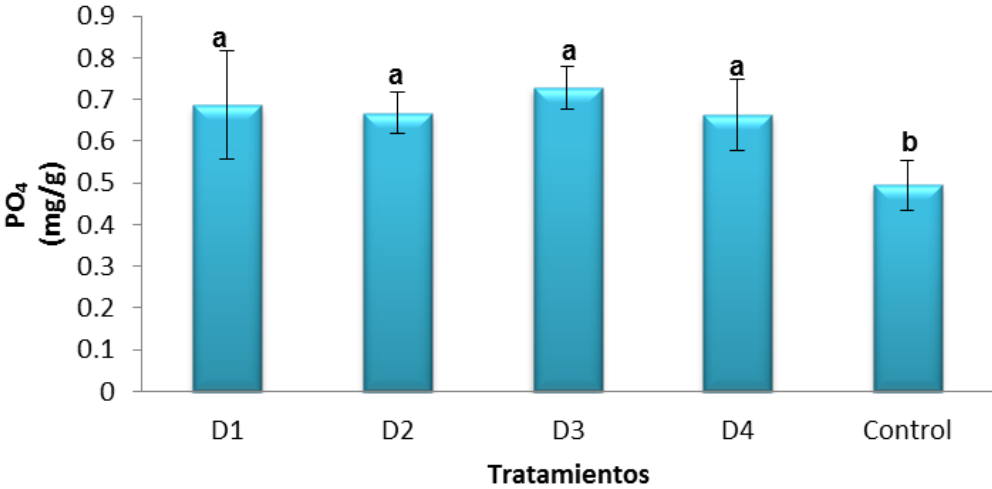


Figura 13. Fósforo excretado en plasma por crías de trucha arco iris. Cada barra es la media \pm la desviación estándar. Letras diferentes expresan que hay diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$).

Con respecto al contenido de proteína en músculo no presento diferencia significativa entre los tratamientos, al igual que el contenido de proteína en hígado y plasma sanguíneo (Figura 14). Los contenidos de lípidos en músculo e hígado no mostraron diferencias significativas entre tratamientos. (Figura 15).

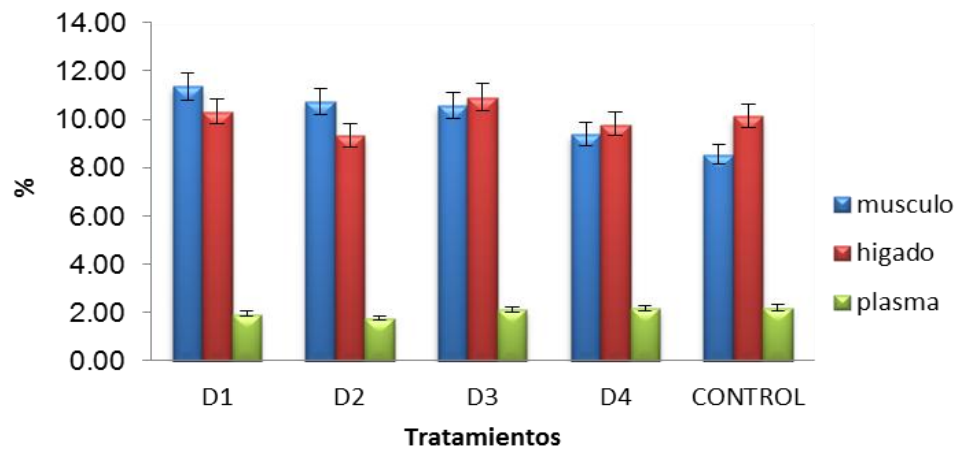


Figura 14. Porcentaje de proteína en hígado, músculo y plasma de crías de trucha arco iris. Las barras son la media \pm la desviación estándar. No hay diferencia significativa entre los tratamientos.

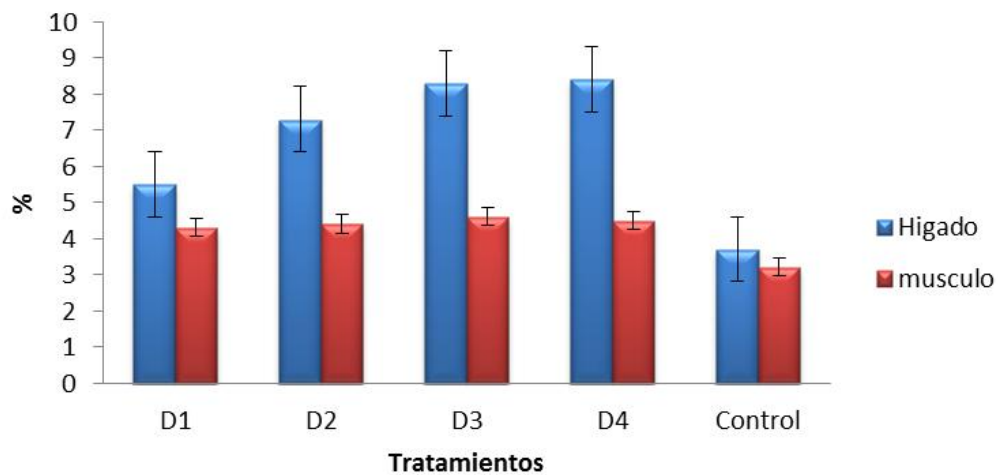


Figura 15. Porcentaje de lípidos en hígado y músculo de crías de trucha arco iris. Las barras son la media \pm la desviación estándar. No hay diferencia significativa entre los tratamientos.

Resultados de segunda fase

Los datos de crecimiento se muestran en la Tabla 7 y se observó una tendencia de valores de peso final (PF), ganancia en peso (GP) y tasa de crecimiento específico (TCE) significativamente más altos en los organismos alimentados con las dietas experimentales. Con respecto a la tasa de ingesta (TI), se observaron valores más altos en los organismos alimentados con las dietas D5 y Control, pero no se presentaron diferencias significativas. El grupo control presentó valores más bajos que los grupos alimentados con las dietas experimentales. En el TED y TCA no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 7. Parámetros de crecimiento.

Tratamientos	PF (g)	GP (%)	TCE	TI	TED	TCA
D5	11.91±2.44a	991.76 ± 187.96a	3.61±0.37a	0.07±0.01a	1.3±0.4a	0.85±0.18a
D6	11.07±0.98a	925.77 ± 84.87a	3.51±0.17a	0.06±0a	1.2±0.2a	0.72±0.17a
Control	9.12± 1.07b	598.26 ± 55.03b	3.23±0.12a	0.07±0.01a	0.80±0.10a	1.2±0.16a

GP. Ganancia en Peso.

TCE. Tasa de Crecimiento Específico

TI. Tasa de Ingesta diaria

TCA. Tasa de Conversión del Alimento.

TED. Tasa de Eficiencia de la Dieta.

En la Supervivencia se obtuvieron mortalidades mínimas de los organismos que fueron alimentados con las dietas experimentales alcanzando un promedio de 88.85% sin ninguna diferencia significativa (Figura 16).

Con respecto al factor de condición (K) se observa el valor mas alto en el grupo control presentando diferencias significativas en las dietas experimentales obteniendo niveles del factor de condición entre 1.19- 1.12 (Figura 17).

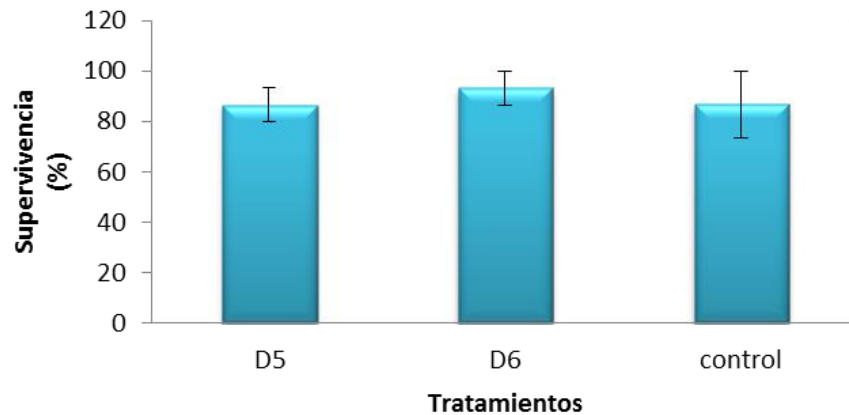


Figura 16. Porcentaje de supervivencia de crías de trucha arco iris. Las barras son la media \pm la desviación estándar. No hay diferencia significativa entre los tratamientos.

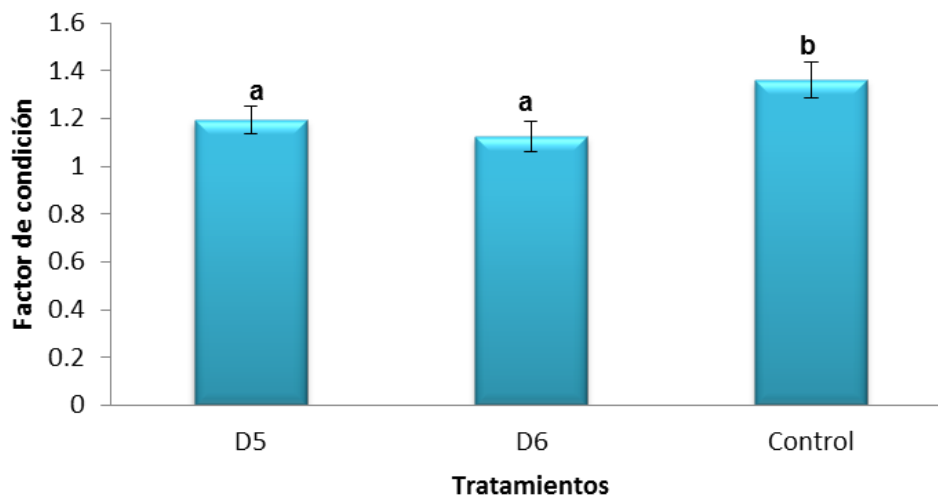


Figura 17. Factor de condición de crías de trucha arcoíris. Cada barra es la media \pm la desviación estándar. Letras diferentes expresan que hay diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$).

El CDA obtenido por los organismos que se alimentaron con las dietas experimentales muestra valores más altos en la D6, presentando diferencias significativas.

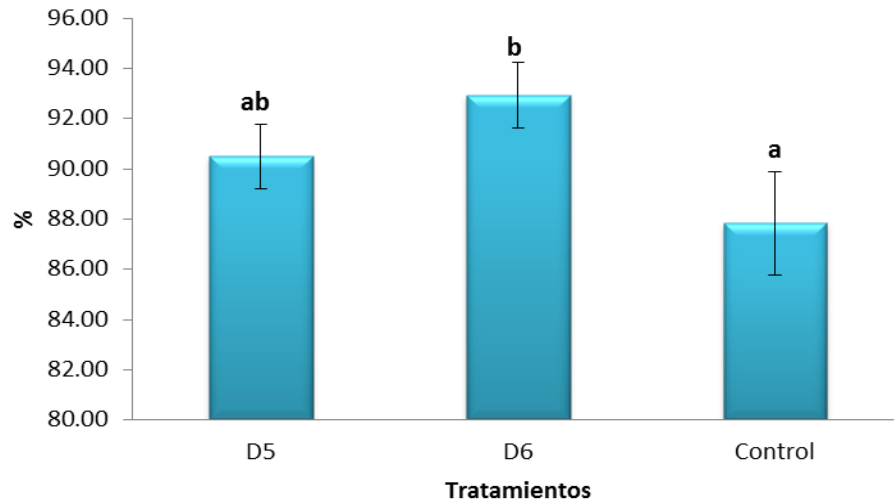


Figura 18. Coeficiente de digestibilidad aparente de crías de trucha arcoíris. Las barras son la media \pm la desviación estándar. Letras diferentes expresan que hay diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$).

El valor más alto de contenido de P en heces lo obtuvo la dieta control a diferencia de las dos dietas experimentales que obtuvieron niveles de excreción más bajos, presentando diferencias significativas (figura.19).

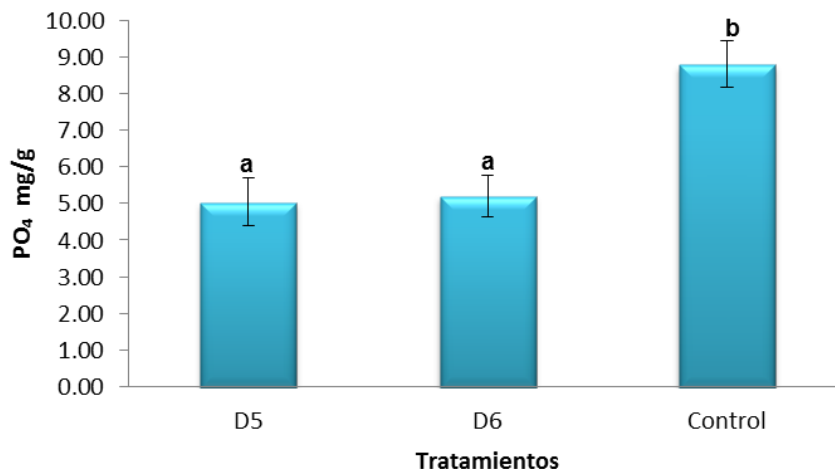


Figura 19. Fósforo contenido en heces de crías de trucha arcoíris. Cada barra es la media \pm la desviación estándar. No hay diferencia significativa entre los tratamientos.

En lo que respecta al contenido de proteína en músculo si presento diferencias significativas entre los tratamientos, obteniendo una tendencia similar el contenido de proteína en hígado y plasma sanguíneo (Figura 20).

Los contenidos de lípidos en músculo e hígado no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. (Figura 21).

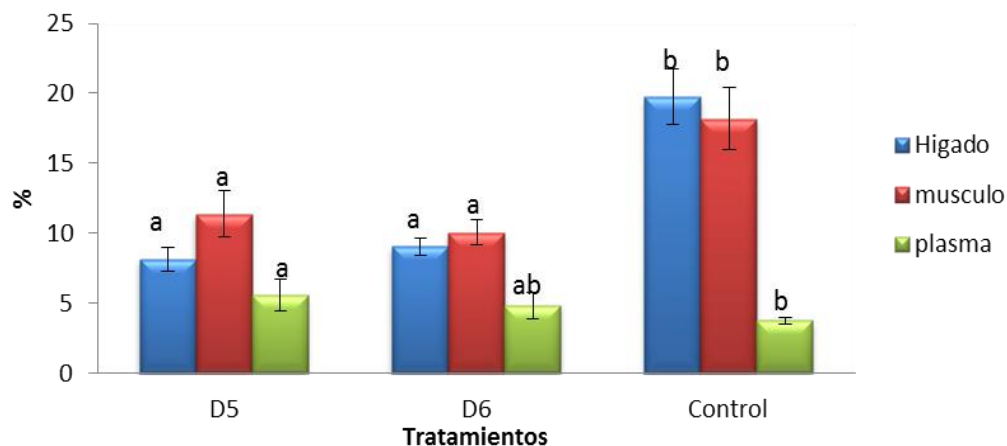


Figura 20. Porcentaje de proteína en hígado, músculo y plasma de crías de trucha arco iris. Las barras son la media \pm la desviación estándar. Letras diferentes expresan que hay diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$).

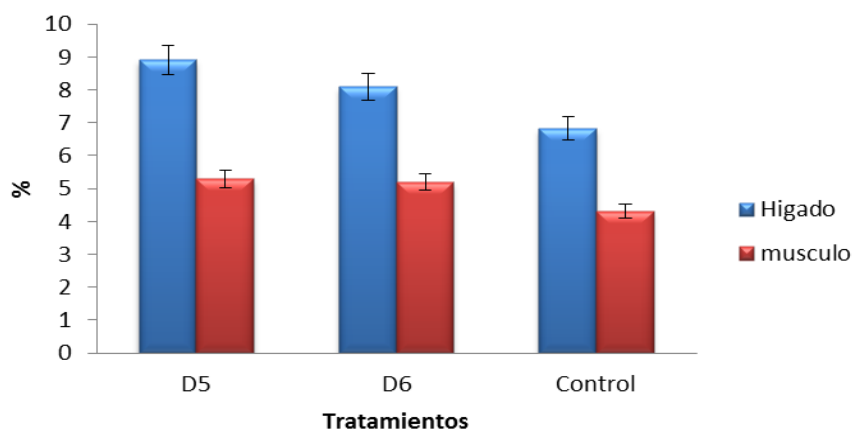


Figura 21. Porcentaje de lípidos en hígado y músculo de crías de trucha arco iris. Las barras son la media \pm la desviación estándar. No hay diferencia significativa entre los tratamientos.

DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación demuestran que el uso de CdS en las dietas para trucha arco iris puede sustituir a la harina de pescado al 100%. Representa una alternativa en la alimentación de estos organismos. Ya que pueden producir una respuesta similar en crecimiento a los alimentos comerciales que contienen harina de pescado, la cual puede ser semejante como fue el caso de la dieta de CdS mas proteasa que obtuvo una GP = 817 %, con una TCE de 3.17% (Tabla. 6), esto concuerda con lo obtenido por Stickney et al. (1996) quienes reportaron que para un 50% de inclusión de CdS el crecimiento de trucha arco iris fue similar a la dieta control a base de harina de pescado.

Por otra parte al suplementar con DL-metionina, cubierta y s/ cubrir la dieta con CdS y proteasa obtuvo un mejor resultado con un promedio de GP = 959% y TCE = 3.39 (Tabla.7). En general los datos de TED y TCA no mostraron diferencia al ser comparados con el tratamiento elaborado de HP como lo reporto Kaushink *et al.* 1995, donde las dietas con mas alto nivel de inclusión de CdS y que suplemento con L-metionina donde la ganancia final de peso, el coeficiente de crecimiento diario, la eficiencia del alimento y la proporción de eficiencia de proteína no fueron significativamente diferentes en los peces alimentados con las dietas con CdS y la dieta de control con HP. Al comparar los resultados de TCE de las dietas experimentales con el control no se ve diferencia significativa como lo reporta García *et al.* (2010).

Esto se ve reflejado en el factor de condición que indica el estado de nutrición de los organismos, asociado al estado de delgadez o gordura. Los valores de K que se obtuvieron se encuentran entre 1.10-1.60, lo que indica que los organismos se encuentran en condiciones aceptable y un buen estado siendo similares a los manejados por Barnham & Baxter (1998), para trucha arco iris.

Los resultados de CDA obteniendo en los organismos alimentados con los tratamientos experimentales adicionados con proteasa mejoro el CDA, y disminuyo las excreciones de P y N, por lo que se deduce que las dietas de D2 y D4 al tener proteasa, generan que su calidad sea mejor en los organismos como

lo reporta Drew, *et al.* 2005, el cual indica que la adición de proteasa para el tratamiento elaborado de Canola y Chícharo mejoro la eficiencia alimenticia. Por otra parte el valor de CDA en las dietas experimentales con la adición de proteasa más DL-metioninas fue mas alto como lo reporto Stickney *et al.* 1996.

Los resultados de digestibilidad se relacionan en gran medida con el consumo de oxígeno y la excreción amoniacal en donde vemos una relación inversa entre el aumento de la digestibilidad de la proteína, el consumo de oxígeno y la excreción de nitrógeno, cual podría estar influenciada por la actividad de la proteasa ya que reduce el esfuerzo del organismos por digerir la proteína presente en el alimento. Medale *et al.* (1998) reporto que se puede sustituir con CdS hasta un 75% sin ningún efecto negativo en el crecimiento en la trucha, pero cuando hay una sustitución total, las excreciones de amoniaco se incrementan.

Al comparar los valores de las excreciones de N obtenidos en este trabajo, se observó que en las dietas D3 y D4 se redujo la descargas de N al medio como lo menciona Rumsey *et al.* (1993) quienes realizaron una prueba de metabolismo con trucha arco iris y reportaron que la excreción total de nitrógeno en la dieta a base de CdS (81.6%) fue un 10% menor que la de la dieta control de harina de pescado (90.0%). Sin embargo la utilización de la proteína de soya a diferencia de las proteínas animales reducen las perdidas de fosforo y mejora la retención de este Medale *et al.* (1998), lo cual genera un impacto positivo sobre el medio ambiente, esta característica se debe principalmente a que la concentración de fosforo disponible en las proteínas vegetales son mucho menores al de las proteínas animales. Esto se observa al comparar los valore de las excreciones de P, obteniendo como resultado una disminución de excreción de P, en las dietas experimentales D2, D3, D4, D5 y D6 lo cual muestra que el Cds y la proteasa adicionados generan una disminución en las descargas de dicho elemento contrastando con Kim *et al.* (1998) quienes reportaron que la excreción de fósforo fue significativamente mayor en las truchas alimentadas con la dieta a base de Cd S.

El P ingerido es distribuido de tres maneras: a) retenido para el crecimiento, b) residuos en las heces, y c) disuelto en la orina (Green *et al.* 2002). El límite de la concentración de P en plasma se encuentra por debajo de la excreción mínima de P en excreciones metabólicas y se eleva, cuando la excreción de P es proporcional al incremento de P en plasma (Bureau y Cho, 1999), la disminución significativa en heces nos demuestra una buena disponibilidad de este macro elemento en las dietas experimentales D2 , D4, D5 y D6, lo que indica que debe existir una relación entre la concentración de P en plasma y la cantidad excretada en heces, esto se observa en los resultados obtenidos, mostrando que el P contenido en plasma es proporcional al P excretado, excepto por la dieta control en la que no hay una relación, probablemente porque para los organismos es más fácil digerir la dieta con harina de pescado que la dietas de harinas vegetales.

De acuerdo a Bureau *et al.*(2002) los parámetros de excreción de N amoniacal y el consumo de oxígeno puede ser usado para estimar la oxidación de los nutrientes de la dieta, usualmente valores bajos indican un mejor uso de la fuente de proteína (menor excreción) y menor gasto de energía en su oxidación (menor consumo). Al contener las dietas una gran cantidad de proteína se debe acentuar el peso de esta fracción sobre el consumo de oxígeno, así como también la probable influencia de la proteasa en la reducción de dicho consumo, ya que reduce el esfuerzo del organismo por digerir la proteína presente en el alimento, como lo observamos en las diferencias presentes entre las dietas experimentales y la control donde se obtuvo un valor más alto en el consumo de oxígeno al resto de las dietas.

La disminución de impacto ambiental como lo demuestra el presente trabajo depende de obtener una retención lo mejor posible de N y un nivel adecuado de P disponible en las dietas, es decir un aprovechamiento al máximo de las dietas por parte de los organismos, lo cual también debe generar un buen crecimiento y un producto de calidad, por tal motivo la composición química del cuerpo de los organismos utilizados durante la prueba de alimentación nos indicó el verdadero aprovechamiento de los nutrientes principalmente en la cantidad de proteína y

lípidos como lo observo Steven *et al.* (2007) reportando que el contenido de proteína y lípidos del salmón del Atlántico no se vio afectada por la alimentación con CdS y que era similar a los valores de los peces alimentados con la dieta control, o lo observado por Vielma *et al.* (2000) quienes indicaron que no hay diferencias significativas en los tratamientos experimentales en comparación con la dieta de CdS y la control.

CONCLUSIONES

El uso de CdS como fuente de proteína en dietas para trucha no afecta el crecimiento ni la sobrevivencia de los organismos.

La inclusión de proteasa y DL-metionina en las dietas experimentales generó una respuesta significativa en el aprovechamiento de las dietas.

Las dietas con CdS con o sin proteasa más la adición de DL-metionina disminuyeron significativamente la concentración de fósforo y nitrógeno en orina y heces.

El tratamiento de CdS más la adición de proteasa y DL-metionina se considera la mejor dieta, para ser utilizada en crías de trucha arco iris ya que no afecta el crecimiento, genera una alta digestibilidad de la proteína, reduce la excreción de P y N amoniacal al medio y obtiene un 88.85% de sobrevivencia.

REFERENCIAS

- Adelizi,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.
- Alam, M, S.,Teshima, S., Ishikewa, M. & Koshio,S. (2001) Effects of ursodeoxycholic acid on growth and digestive enzyme activities of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *Aquacul. Res.*, 32(S), 235-243.
- Anderson, R. L., and W. Wolf. 1995. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr.* 125:581S–588S.
- Aoac, 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Anal. Chem., Virginia, USA, pp. 69-78.
- Barnham, PSM.C.,Baxter, A. 1998. Condition factor, K, for salmonid fish. State of Victoria department of primary industries. 3 pp.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37; 911-917.
- Bureau, D.P., S. Gunther and C.Y. Cho. 2002. Chemical composition and preliminary theoretical estimates of waste outputs of rainbow trout reared on commercial cageculture operations in Ontario. *North American Journal of Aquaculture* 65: 33-38
- Bureau D.P., Cho C.Y. 1999. Phosphorus utilization by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* : estimation of dissolved phosphorus waste output. *Aquaculture* 179, 127–140.

- Clesceri, L. S., Greenberg A., Eaton A. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th. American Public Health Association. Washington, D.C., U.S.A.1325 p.
- CONAPESCA-SAGARPA. 2008. Anuario estadístico de pesca 2005. CONAPESCA. México.265 pp.
- Drew, M.D., Racz, V.J., Gauthier, R., Thiessen, D.L. 2005. Effect of adding protease to coextruded flax ; pea or canola : pea products on nutrient digestility and growth performarce of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*). Ani. Feed Sci. Technol. 119: 117-128.
- Durán, D.A., Cisneros, C.A.E. y Vargas, V.A. 2003. Bioestadística. UNAM FES Iztacala. México. 222 pp.
- El-Sayed. AM. 1994. Evaluation of soybean meal, *Spirulina* and chicken offal meal as protein sources for silver seabream (*Rhabdosargus sarba*) fingerlings. *Aquaculture* . 127: 169-176.
- FAO. 2006. Th estate of world fisheries and aquaculture 2006. FAO. Rome, Italy. 180 pp
- Furukawa, H. and Tsukahara, H., 1966. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish fed. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 32(6):502–508.

- Gatlin D.M., Barrows F.T., Brown P., Dabrowski K., Gaylord T.G., Hardy R.W., Herman E., Hu G., Krogdahl A., Nelson R., Overturf K., Rust M., Sealey W., Skonberg D., Souza E.J., Stone D., Wilson R., Wurtele E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, 38, 551–579.
- Glencross B., Both M., Allan G.L., 2007. A feed is only as good as its ingredients – a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture nutrition*.
- 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.
- Hardy, R.W. 2002. Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: En: Webster, C.D. y Lim, C. (Eds.). *Nutrient requirements and feeding of fish for aquaculture*. CAB International.
- Hart, S.D., F.T. Barrows, K. Dabrowski, S. Dasgupta, D.L. Garling, R.W. Hardy, J.A. Malison, D.I. Skonberg, C. Weeks, and P.B. Brown. 2007. Soybean antinutritional factors and their relative importance in limiting the use of soybean meal in salmonid diets. United Soybean Board, Chesterfield, MO, and American Soybean Association, St. Louis, MO, USA.
- Harris, L. E., 1980. *Feedstuffs*. pp. 111–170.
- Hemre, G.I., Sanden, M., Bekk-Mikkellep, A.M., Sagstad, A y Krogdahl, A. 2005. Growth, feed utilization and health of atlantic salmon *salmo salar* L.

fedgenetecally modified compared to non-modified commercial hidrid soybeans. *Aquicult. Nutr.* 11;157-167.

- Hernández, A. G.Y. 2012. Uso de la mezcla de concentrado de proteína de soya y polvo de *spirulina* adicionada con levadura y/o proteasa, como sustituto de harina de pescado en dietas balanceadas para trucha arco iris (*Oncorhynchus mikiss*) y su efecto en el crecimiento y las excreciones de fósforo y nitrógeno. Tesis de licenciatura. UAG (Unidad Académica de Ecología Marina).
- Kaushik, S.J., J.P. Cravèdi, J.P. Lallès, J. Sumpter, B. Fauconneau, and M. Laroche. 1995. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 133:257-274.
- Kim, J.D., S.J. Kaushik, and J. Breque. 1998. Nitrogen and phosphorus utilisation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with or without fish meal. *Aquatic Living Resources* 11:261-264.
- Mambrini, M., A.J. Roem, J.P. Cravèdi, J.P. Lallès, and S.J. Kaushik. 1999. Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate and of DL-methionine
- Moyano, F.J., Cardenete, G. y De la Higuera, M., 1992. Nutritive value of diets containing a high percentage of vegetable proteins for trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Living Resources*, 5: 23-29.

- Mundheim, H, Aksnes, A; Hope,B.2004. Growth, feed efficiency end 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.
- NRC. 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Academic Press, Washington D.C. USA, pp. 21-25.
- Oliva-Teles, A., Gouvenia, A. J., Gomes, E., Rema, P., 1994, The effect of different processing treatments on soybean meal utilization by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Aquaculture* 124 343-349.
- Refstie, S., Stile J. y Trond S. 1997. Adaptation to soybean meal in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 153: 263-272.
- Refstie, S., T. Storebakken, G. Baeverfjord, and A.J. Roem. 2001. Long-term protein and lipid growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with partial replacement of fish meal by soy protein products at medium or high lipid level. *Aquaculture* 193:91-106
- Rumsey, G.L., 1993. Fish meal and alternate sources of protein in fish feeds. Update 1993. *Fisheries* 18 (71, 14-19.
- Rumsey, G.L., A.K. Siwicki, D.P. Anderson, and P.R. Bowser. 1994. Effect of soybean protein on serological response, non-specific defense mechanisms, growth, and protein utilization in rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 41:323-339.

- Sajjadi M. & Carter C.G.2004. Dietary phytase supplementation and the utilisation of phosphorus by Atlantic salmon, *Salmo salar*, L. fed a canola-meal based diet, *Aquaculture* 240, 417-431
- Stickney, R. R., R. W. Hardy, K. Koch, R. Harrold, D. Seawright, and K. C. Masee. 1996. The effects of substituting selected oilseed protein concentrates for fish meal in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* diets. *J. World Aquacult. Soc.* 27:57–63.
- Storebakken, T., Shearer, K.D. and Roem, A.J. 2000. Growth, uptake and retention of nitrogen and phosphorus and adsorption of other minerals in Atlantic salmon *Salmo salar* fed diets with fish meal and soy-protein concentrate as the main sources of protein. *Aquacult. Nutr.* 6: 103-108.
- Thiessen, D.L., Maenz, D.D., Newkirk, R.W., Classen, H.L., Drew, M.D. 2004. Replacement of fishmeal by canola protein concentrate in diets fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Nutr.* 10; 379-388
- Vásquez-Torres W, Pereira Filho M, Arias-Castellanos JA. 2002. Estudos para composição de una dieta referencia semipurificada para avaliação de exigências nutricionais em juvenis de Pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818). *Revista Brasileira de Zootecnia.* 2002; 31(1): 283- 292.
- Vela, V, S. González-posada, O, J.2007. *Revolución Azul.* Editorial APROMAR.. Madrid. pp. 136-137.
- 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.

Anexo 1

Digestibilidad, Cromo en heces.

1. El blanco se preparará simultáneo a la muestra usando solamente los ácidos y agua destilada.
2. Moler finamente las heces hasta quedar pulverizada, manteniéndolas en sequedad.
3. Pesar con precisión ($\approx 0.0001\text{g}$) 50 mg de muestra, colóquela en un matraz Kjeldahl de 100 ml y pese nuevamente para ajustar el peso de la muestra.
4. Adicione 5 ml de HNO_3 y coloque en el digestor en ebullición suave en una campana de extracción encendida por un mínimo de 30 minutos hasta que desaparezcan los vapores ocreos. En caso de que disminuya notablemente la cantidad de líquido y continúen los vapores nitrosos, adicionar 5 ml de ácido nítrico y continuar digiriendo. Agitar con un guante constantemente para acelerar el proceso, sin remover el matraz del mechero.
5. La solución deber ponerse de un color verde claro, traslucido y no debe desprender vapores ocreos. Dejar enfriar.
6. En la campana de extracción, agregar cuidadosamente resbalando por una de las paredes del matraz, 3 ml de ácido perclórico.
7. Colocar nuevamente el matraz en el digestor para que continúe la ebullición.
8. Ebullicirá el contenido del matraz, evaporando los residuos de HCL.
9. Aumentar la cantidad de calor, y esperar hasta que se comience a formar una nube blanca dentro de la parte esférica del matraz, hasta que la solución se torne de un color amarillo oro. Apagar el digestor y dejar enfriar completamente.
10. Cuando este completamente frío se debe formar un anillo rojizo en el borde de la superficie del líquido. En caso de no formarse o si el líquido se torna verde nuevamente, volver a digerir hasta que el cambio sea permanente.

11. Verter el contenido en un matraz volumétrico de 25 ml, enjuagando el matraz Kjeldahl varias veces con agua destilada hasta que se afores.
12. Leer en el espectrofotómetro a 350 nm y con el blanco de reactivos.

ANEXO 2.

Determinación del porcentaje de proteínas.

Reagente de Lowry.

Preparar el reagente de la solución Lowry agregando 40 ml de agua destilada a un recipiente con reagente de lowry en polvo. Mezclar bien, evitando exceso de espuma hasta que se disuelva el componente completamente.

Reagente de Fenol Folin & Ciocalteu's

Preparar la solución transfiriendo 18 ml de Reagente de Fenol Folin & Ciocalteu's a un envase ámbar. Agregar 10 ml de agua destilada. Mezclar apropiadamente y posteriormente agregar 80 ml de agua destilada a la solución.

Solución Estándar de Proteínas

Agregar 5 ml de agua destilada a un recipiente con extracto de proteína. Esta solución se debe almacenar en refrigeración y sólo dura 3 meses.

Procedimiento.

1. Elaborar una curva patrón.

Solución de proteína estándar (ml)	Agua destilada (ml)	Concentración de proteína (µg/ml)
0.125	0.875	50
0.250	0.750	100
0.500	0.500	200
0.750	0.250	300
1.000	0	400

2. Elaborar un tubo blanco con 1 ml de agua.
3. Agregar las muestras a tubos debidamente etiquetados y diluir con 1 ml de agua destilada, homogenizar por 2 min.
4. Agregar 1 ml de la Solución Reagente de Lowry a los tubos patrón, blanco y muestras.
5. Dejar reposar las soluciones durante 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Agregar rápidamente 0.5 ml de la solución Reagente de Fenol Folin & Ciocalteu's a cada tubo con solución.
7. Dejar reposar por 30 minutos.
8. Ajustar el blanco en el espectrofotómetro a 540 nm y medir las muestras.
9. Multiplicar por el factor de dilución.

ANEXO 3.

Método de Nessler.

1. En el espectrofotómetro de HACH se utilizó el programa 380, N, Amonis, Ness.
2. Agregar 10 ml de muestra de agua en un recipiente.
3. Preparar el blanco agregando en otro recipiente 10 ml de agua destilada.
4. Agregar 2 gotas de estabilizador de minerales en cada recipiente.
5. Agregar 2 gotas de Agente dispersor de alcohol polivinílico en cada recipiente y mezclar bien.
6. Agregar 1 ml con una pipeta Reagente de Nessler y mezclar bien en cada recipiente.
7. Dejar reposar durante un minuto.
8. Transferir las soluciones a cubetas de vidrio para medir.
9. Introducir la cubeta del blanco en el espectrofotómetro y ajustar a cero.
10. Introducir las cubetas con las muestras una por una y presionar la opción READ, los resultados se expresan en mg/L $\text{NH}_3\text{-N}$.

ANEXO 4.

Molibdovanato para Ortofosfatos.

1. Se enciende el espectrofotómetro HACH y se selecciona la opción de programas favoritos (programa 480 P React Mo).
2. Preparar el blanco agregando 10 ml de la muestra en un recipiente debidamente etiquetado.
3. Para preparar la muestra se agregan 10 ml de la muestra en un recipiente debidamente etiquetado.
4. Agregar 0.5 ml de Reagente Molybdovanato s cada muestra y mezclar bien.
5. Dejar reposar la muestra por 7 minutos.
6. Limpiar las paredes de las cubetas de lectura e introducir al espectrofotómetro. Introducir el blanco y presionar ZERO.

ANEXO 5.

Determinación de fósforo total en heces.

1. Encender el Reactor (digestor) DRB 200 y calentarlo a 150 °C.
2. Seleccionar el programa "phosphoro", esperar hasta que la temperatura marcada sea 150 °C para que comience el cronómetro del aparato.
3. Preparar el blanco con una pipeta de 5 ml de agua destilada a un tubo de "Total Phosphorus Test'N Tube Vial".
4. Agregar el contenido de un sobre de persulfato de potasio en polvo a cada tubo. Cerrar y agitar para disolver.
5. Cuando el reactor se encuentre en 150 °C, introducir los tubos (tapados) en los compartimientos.
6. Comenzar el cronómetro en cuenta regresiva por 30 minutos.
7. Dejar enfriar los tubos hasta que alcancen la temperatura ambiente.
8. Agregar 2 ml de hidróxido de sodio al 1.54 N a cada tubo, se tapa y se mezcla.
9. Con un gotero de polietileno agregar 0.5 ml de reagente de molibdovanato a cada tubo, taparlos y mezclarlos.
10. Dejar reposar todas las soluciones por 7 minutos.
11. Limpiar perfectamente todos los tubos con una toalla limpia para remover grasa u otra marca.
12. Colocar el tubo blanco en el espectrofotómetro y presionar ZERO.
13. Se colocan cada una de las muestras preparadas y se leen. Los resultados se expresan en mg/L PO_4^{3-} .

ANEXO 6.

Extracción de lípidos con cloroformametanol.

1. Pesar 0.2 gr de muestra (seca completamente).
2. Mezclar un tubo para centrifuga etiquetado con tapa con 3 ml de metanol y 1.5 ml de cloroformo. Homogenizar durante 2 minutos.
3. Agregar 1.5 ml de cloroformo en una proporción 1:1 y homogenizar durante 2 minutos.
4. Centrifugar durante 10 minutos a la mayor cantidad de revoluciones por minutos.
5. Rescatar el sobrenadante en un embudo de separación.
6. Agregar 2.4 ml de agua, agitar fuertemente la mezcla.
7. Agregar con una pipeta pasteur con bulbo 1:1 de clorometanol, hasta que se observe que las fases se separan claramente.
8. Destapar cuidadosamente el embudo, abrir la llave y recuperar la capa inferior (los lípidos).
9. Pasar a un tubo vial completamente limpio y etiquetado con plumón previamente pesado. Se recomienda usar guantes apartir de este momento y para los paso siguientes.
10. Secado total con un tubo de vidrio mediante la aireación constante del contenido del tubo evitando que se vierta cualquier cantidad de la solución.
11. Una vez evaporado todo el clorometanol y observándose únicamente los lípidos en un color amarillento y aceitoso pesar nuevamente el tubo vial.
12. Los resultados se expresan en porcentaje en una regla de tres por diferencia de pesos.