



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Acción de los probióticos en la digestibilidad de dietas con altos contenidos de harina de soya en trucha arcoíris.”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A:**

**DANIEL SÁNCHEZ ÁVILA**



**ASESOR: DR. LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

Los Reyes Iztacala, Edo. de México

2012



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.

Este estudio fue realizado gracias al apoyo del programa PAPIIT IN 208509-3, y al programa IACOD IA 201311-1 de la Universidad Nacional Autónoma de México.

*Las experiencias son simplemente el nombre que le  
damos a nuestros errores  
-Oscar Wilde-*

## **Agradecimientos**

Ante todo quiero agradecer a mi familia por todo el apoyo que me otorgo, durante esta travesía, pues gracias a ellos he llegado hasta donde estoy.

A mi madre por que sin ella todo esto no seria posible, por que a pesar de todos los altibajos que hemos pasado siempre estuviste para mi y me diste la iniciativa para salir adelante, aunque no fuera el tiempo del mundo, nunca me abandonaste y siempre supe que estabas, estas y estarás para mi.

A mi hermana Diana por que eres mas que eso, sin tus regaños, apoyos, cobijo y gracias a que fuiste unas de las primeras en mostrarme otro mundo, en todo lo dichoso y satisfactorio que seria cuando obtuviera un titulo, una educación, gracias.

A mi hermano David, por mostrarme lo bueno y malo de todo lo que hay en este mundo, para que eso me hiciera una persona mas sensata y no dejarme de los demás.

A mis enanos, Nadia y Sebastian por que durante estos años de mi carrera siempre me lograron sacar una sonrisa día a día y darme ese impulso para mostrarles lo maravilloso que puede ser la ciencia en sus vidas, por mas que mis sobrinos son mi hijos.

Al Laboratorio de Producción Acuícola:

Profesores:

Doc. Héctor le agradezco por haberme convencido con las galletas y café, para integrarme al este equipo, por ahí me di cuenta de todo lo que se puede lograr, por que gracias por la libertad que me dio para trabajar y realizar mi proyecto, por que ahí fue donde aprendí y comprender lo que realice.

Prof. Omar te agradezco por que lograste que me quedara en Biología, ya que probaste que tengo la capacidad para hacerlo y bueno pues podría enumerar todo lo que he aprendido de ti pero hay mas personas a la cual hay que agradecer pero, sobre todo encontré un buen amigo.

Prof. Mario le agradezco inmensamente por que me enseñó a pensar siempre mas allá de la cosas, nunca quedarme con lo obvio y buscar la solución a los problemas, pues todo siempre esta relacionado con todo por que no podemos excluir las cosas. Gracias!!!

Chicos del Acuario:

Top, bueno pues que quieres que te diga, pues estuvimos apoyándonos toda esta travesía y me da mucho gusto y felicidad que confíes en mi para esas situaciones, que tu ya sabes. Calabacitas Leydi, Lupita, pues pobrecitas, pobrecitas, a donde fueron a caer, pero la verdad son todo unos personajes que me alegra haber conocido y mas por que saben muchas cosas que no se por que las fueron a saber uds. Pero sobre todo muchas gracias por escucharme en mi sufrir. Andy no bueno contigo, no no tu sabrás y por que lo digo, pero

encontré a un amigo en ti, a pesar de ti y de todo el stress que me generaste, estuviste incondicionalmente, aunque tiendo a pensar que es al revés. Bruno todo un caso muchacho, pero lograste que esta ultima temporada fuera entretenida incluso cuando dudaste de mi amistad, Aldo (cariño) por que hicieron que fuera participe de esa pequeña situación suscitada, verdad pero a pesar de eso eres la onda y buena persona. Gerardo, Esleban por que esa "pequeña" estancia fuera mas amena y divertida pero mas que nada recreativa.

Amigos:

Lisa, Clau, Fer, podría hacer otras tesis diciéndoles lo agradecido que estoy con uds. Por estar conmigo ya desde casi 9 años y dando todo ese cariño y amistad incondicional y mas por el apoyo que me dieron cuando ingrese a esta carrera, solo les diré que los adoro, amo y son mas que mis mejores amigos. Lilis, Angie las adoro cuzkas y su amistad fue y es fundamental durante estos años.

Al ultimo pero no por eso menos importantes Tere aunque siempre me caerás mal por lo que me hiciste en primer semestre, pero bueno, eres mi amiga y aunque me reclamen por que no se los digo seguido te quiero a mas no poder y gracias por aguantarme por esa ultima etapa que estuvo de locos. Yesell cariño bueno, odios vienen, odios van, pero en este caso eso nunca existió eso, aunque nos agarraramos del copete una temporada, superamos eso y seguimos adelante y miranos aquí, quien pensaría que seriamos inseparables durante todo este tiempo, te quiero pequeñilla y tal vez terminemos los 3 viviendo juntos. Ámenme no me odien que ya saben lo necesito (sufro en silencio).

Miguel, Itzel, Jael, Lalo, Moni, personajes y personas entrañables que agradezco que formen parte de mi vida y mas que nada que hayan estado conmigo en ese proceso de mi formación profesional, pues de cada uno tome lo mas importante, para yo ser mejor.

## Tabla de contenido

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Introducción</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>Antecedentes</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>Justificación</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>Objetivos</b> .....   | <b>10</b> |
| Objetivo general .....   | 10        |
| Objetivos particulares .....   | 10        |
| <b>Material y Métodos</b> .....  | <b>11</b> |
| Formulación y preparación de dietas .....                                    | 11        |
| Pruebas de alimentación .....  | 12        |
| Determinación de excreción de N amoniacal y P y contenido de P en heces..... | 13        |
| Análisis proximales .....  | 13        |
| Determinación de respuesta inmunológica innata .....                         | 14        |
| Digestibilidad .....   | 14        |
| Análisis estadísticos .....  | 14        |
| <b>Resultados</b> .....  | <b>15</b> |
| <b>Discusión</b> .....   | <b>25</b> |
| <b>Conclusiones</b> .....  | <b>30</b> |
| <b>Referencias</b> .....   | <b>31</b> |
| <b>Anexos</b> .....  | <b>37</b> |
| Anexo 1 .....  | 37        |
| Anexo 2 .....  | 39        |
| Anexo 3 .....  | 40        |
| Anexo 4 .....  | 41        |
| Anexo 5 .....  | 41        |
| Anexo 6 .....  | 42        |

## Introducción

De acuerdo a la Organización para la Alimentación y Agricultura (FAO) de la ONU, la acuicultura es el sector de producción de alimentos de crecimiento más acelerado. La producción mundial de pescado ha crecido substancialmente en la última década, alcanzando 52.5 millones de toneladas en 2008, comparado con 32.4 millones de toneladas en 2000. Actualmente representa casi el 50% de los productos pesqueros mundiales destinados a la alimentación. Con el estancamiento de la pesca de captura global y una población humana en aumento, la acuicultura se percibe que tendrá el mayor potencial para producir más pescado en el futuro y así atender la demanda creciente de alimentos acuáticos sanos y de calidad. Por ello se supone trabajar por un uso óptimo de sus insumos, con el fin de conseguir el mayor rendimiento de los productos acuáticos. Sin embargo, muchos recursos utilizados en la acuicultura, como los ingredientes que utilizan para formular dietas, se encuentran en escasa cantidad, por lo cual se emplean alternativas que cubran dicho impedimento.

La harina de pescado sigue siendo un ingrediente fundamental en las dietas para peces carnívoros (Olli *et al.* 1994, 1995) debido a su alto contenido proteico, excelente perfil de aminoácidos, alta digestibilidad de nutrientes y poca presencia de antinutrientes. Sin embargo, se espera que la demanda por los ingredientes de la proteína exceda el suministro mundial anual de harina de pescado en la próxima década, y este aumento demandara cambios a los paradigmas económicos y nutritivos. Por esto, la necesidad de una fuente de proteína con un costo reducido, esta en aumento. un ejemplo de estas son las proteínas de origen vegetal como la soya, que ha sido identificada por la potencial demanda de proteína vegetal en los alimentos acuáticos. Desde 1995, la United Soybean Board (USB) ha consolidado actividades de desarrollo en el mercado, principalmente en China que ha aumentado la demanda para la harina de soya en criaderos de peces, a un estimado de 5 millones de toneladas métricas en el 2005. Los productos de soya son considerados baratos y nutritivos dado que sus componentes tienen un alto contenido de proteína cruda y un razonable perfil de aminoácidos equilibrado.

No obstante, existen compuestos biológicamente activos denominados antinutricionales que limitan el uso de la harina en la formulación de dietas balanceadas para los peces de especies carnívoras. (NRC 1993; Olli & Krogdahl 1994).

Algunos de estos compuestos son, las altas concentraciones de oligosacáridos como la sacarosa, rafinosa y estaquiosa, que no son digeribles por los peces, debido a falta de la  $\alpha$ -galactosidasa que es necesaria para metabolizar estos azúcares complejos, la presencia del

ácido fítico y fitato, que genera una baja disponibilidad de fósforo y minerales catiónicos, ya que estos forman uniones con el ácido fítico y el fitato (NRC 1993). Estos compuestos no pueden ser metabolizados en el intestino de los organismos debido a la insignificante actividad de enzimas en la mucosa intestinal, a menos que en el tracto gastrointestinal habiten microorganismos capaces de hidrolizar dichos compuestos contribuyendo a que se metabolicen dichos compuestos (Pointillart *et al.* 1984).

Ante estas desventajas se ha empleado el uso de probióticos y/o enzimas para contrarrestar las deficiencias que presentan las harinas vegetales y evitar el desencadenamiento de epizootias (Hansen y Olafsen, 1999; Ringo y Birkbeck, 1999; Olafsen., 2001). Se ha descrito que la importancia y viabilidad de incorporar bacterias o levaduras con la habilidad de producir sustancias inhibitorias o antagonistas a ciertos metabolitos producidos por algunas microalgas y especies vegetales (Tovar *et al.* 2002), producen efectos benéficos sobre el hospedador modificando su comunidad microbiana relacionada con el, o con el medio ambiente en el cual este se desarrolla (Chabrilón 2004) mejorando la calidad del agua mediante su capacidad de bioremediación (Moriarty 1997, Gateosoupe 1999), además de una mejora del uso del alimento o de su valor nutricional y/o respuesta del hospedador ante las enfermedades, y/a la calidad del ambiente (Morónigo 2004).

Así como la fitasa agregada a la dieta, tiene el potencial de promover el valor nutritivo (Forster *et al.* 1999), la digestibilidad de los nutrientes y minerales (Cheng y Hardy, 2003; Yoo *et al.* 2005), la eficiencia de conversión de alimento y una disminución en la descarga de fósforo al medio ambiente. Estos efectos se han demostrado en otras especies como la carpa, bagre de canal y en trucha arcoiris, (Cheng y Hardy 2003), mientras que Forster *et al.* (1999) demostraron que la suplementación en la dieta en juveniles de trucha arcoiris resultó en una óptima liberación de fósforo y otros minerales.



## Antecedentes

A lo largo de los años setenta y ochenta se reportaron múltiples trabajos sobre el éxito del uso de la harina de soya en dietas balanceadas para trucha arcoíris. Sin embargo las dietas utilizadas en esos experimentos contenían múltiples ingredientes de la dieta ricos en proteína tales como los de Reinitz *et al.* 1978, Tacon *et al.* 1983, Dabrowski *et al.* 1989, pues en estos experimentos sus ingredientes difieren en la calidad nutricional

Así Dabrowski en 1989 determino el efecto del reemplazamiento parcial y total de la harina de pescado por la proteína extraída de harina de soya, donde la tasa de crecimiento específico se redujo cuando las sustituciones pasaban del 50% resultando en una detención del crecimiento y una alta mortalidad de los organismos. Pongmaneerat y Watanabe en 1992 observaron que cuando se reemplaza el 40% o mas de la proteína de alta calidad como la harina de pescado por la harina de soya en las dietas para la trucha arcoíris esta tiene un efecto negativo sobre su crecimiento.

En 1994 Olivia-Teles *et al.* determinaron el efecto del reemplazamiento del 20% 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.

Otros autores mencionan cual es la respuesta del organismo ante la presencia de esta harina vegetal en la dieta, como es el caso de Ståle en 1997 determinó cual era la adaptación que obtuvieron las crías de trucha arcoíris antes las dietas con un 60% de sustitución de harina de soya (HS), dicho proyecto fue dividido en tres fases, encontrando que cuando los organismos son sometidos en etapas tempranas del desarrollo a la HP y después a las altas concentraciones de HS, estos muestran un buen crecimiento el cual se puede equiparar a los organismos con dieta control, pero cuando estos desde un inicio de su desarrollo se someten a la HS se presenta una limitante en el crecimiento así como problemas fisiológicos a nivel intestinal.

Dentro de las investigaciones en otras especies afines en la familia de los salmónidos Harald *et al.* en 2004 evaluaron el crecimiento, la eficiencia de la dieta y la digestibilidad de los nutrientes en juveniles del *Salmo salar L.* ante las altas cantidades de mezclas de harinas vegetales principalmente HS.

## Justificación

Con la necesidad de establecer un óptimo aprovechamiento de las harinas vegetales, tal como la harina de soya (HS), para la formulación de dietas “amigables con el ambiente” que disminuyen las descargas de fósforo (P) y nitrógeno (N) emitidas por los organismos en aguas afluentes a granjas acuícolas y cauces naturales. Por tal motivo se plantea el uso de una elevada sustitución de la harina de pescado (HP) por HS, además de la aplicación de levadura como probiótico con el fin de mejorar el uso de la HS, ya que dicho probiótico provocara efectos benéficos sobre los organismos en los cuales se esta utilizando, como una mejora en el crecimiento y la respuesta inmunológica. Tomando en cuenta que en la producción de la trucha arcoíris, uno de los principales objetivos es la obtención de una buena talla de los organismos así como una reducción de los costos mediante la compra de alimento, ya que esta mediara lo mencionado anteriormente, además generara una alta sobrevivencia y resistencia a enfermedades, lo cual se vera reflejado en el volumen de producción.

## Objetivos

### Objetivo general

- Establecer el efecto de dietas con altos contenidos de harina de soya adicionados con levadura (*Sacharomyces cereviseae*) y/o fitasa en truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

### Objetivos particulares

- Determinar la tasa de crecimiento en juveniles de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con levadura y/o fitasa, en dietas con altos contenidos de harina de soya.
- Determinar la composición proximal del cuerpo de juveniles de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con levadura y/o fitasa, en altas concentraciones de harina de soya.
- Determinar la digestibilidad de la dieta en los tratamientos para juveniles de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con levadura y/o fitasa, en altas concentraciones de harina de soya.
- Determinar la excreción metabólica de N amoniacal en branquias y orina en juveniles de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con levadura y/o fitasa, en altas concentraciones de harina de soya.
- Determinar la excreción metabólica de P por branquias y orina, así como el contenido de P en heces en juveniles de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con levadura y/o fitasa, en altas concentraciones de harina de soya.
- Determinar la respuesta inmune no especifica de juveniles de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con levadura y/o fitasa, en altas concentraciones de harina de soya.

## Material y Métodos

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Producción Acuícola (Acuario) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Los organismos se obtuvieron de la granja acuícola privada “El Zembo” ubicada en el municipio de Huasca de Ocampo en el estado de Hidalgo, México.

### Formulación y preparación de dietas

Se formularon 4 dietas; 3 experimentales con combinaciones de harina de soya (HS) y harina de pescado (HP) en una sustitución del 75% (HS) y 25% (HP) para cada una de las dietas, en la cual la dieta Lev+Fit incluía levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y fitasa (Fitasa Ronozyme P5000, DSM Nutritional Products de México, S.A. de C.V., Guadalajara, México), la dieta Lev incluía levadura y la dieta Fit incluía fitasa y una dieta control CHP a base de 100% (HP), la formulación se observa en la tabla 1. Así mismo se utilizó un alimento comercial (Malta-Cleyton) como una segunda dieta control AC. Las dietas que contenían levadura se les adicionó un aproximado de  $1.282 \times 10^{11}$  de células vivas para la elaboración de 1000 g de dieta.

Las dietas se prepararon de acuerdo a Hernández *et al.* (2004), los ingredientes se pesaron en una balanza digital, posteriormente se mezclaron en una batidora Hamilton Beach (modelo 63220) y se agregó agua purificada en un 35% p/v. La masa resultante se pasa por un molino de carne con un cedazo de 0.5 mm de diámetro. El secado se realizó en un horno a una temperatura de 70 °C durante 24 horas. Las dietas secas se guardaron en el congelador a -24 °C hasta su uso.

Para confirmar la presencia de células vivas en la dieta, después del proceso de extrusión, se preparó un medio de cultivo con Agar Dextrosa Sabouraud, en el cual se sembró porciones de dieta. Una vez asegurada la existencia de la levadura, se procedió a cuantificar el número de células a los 45 días y 70 días de la fase de alimentación. Obteniendo que a los 45 días existía la cantidad de  $7.547 \times 10^{10}$  células y a los 70 días  $4.124 \times 10^{10}$  células de levadura.

Tabla 1. Cantidad (g) utilizada de los ingredientes en la elaboración de las dietas para juveniles de trucha arcoiris (Total de alimento 1000 g).

| Ingredientes                           | Dietas Experimentales |     |       | Dieta Control |
|--|-----------------------|-----|-------|---------------|
|  | Lev+Fit               | Lev | Fit   | CHP           |
|  | Tratamientos          |     |       |               |
| <b>Harina de Pescado</b>               | 200                   | 200 | 200   | 600           |
| <b>Harina de Soya</b>                  | 400                   | 400 | 400   | -             |
| <b>Aceite de Hígado de Bacalao</b>     | 50                    | 50  | 50    | 50            |
| <b>Lecitina de Soya</b>                | 50                    | 50  | 50    | 50            |
| <b>Mezcla de Vitaminas y Minerales</b> | 40                    | 40  | 40    | 40            |
| <b>Dextrina</b>                        | 100                   | 100 | 100   | 100           |
| <b>Gluten</b>                          | 50                    | 50  | 50    | 50            |
| <b><math>\alpha</math>-celulosa</b>    | 94.6                  | 95  | 109.6 | 110           |
| <b>Levadura</b>                        | 15                    | 15  | -     | -             |
| <b>Fitasa</b>                          | 0.4                   | -   | 0.4   | -             |

### Pruebas de alimentación

Las pruebas de alimentación se realizaron en un sistema de recirculación con tanques de polipropileno de 100 L por un periodo de 70 días. Cada una de las dietas se dio a grupos por triplicado de 15 crías de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) por tanque, las cuales se seleccionaron registrando un peso inicial de  $1.2 \pm 0.06$  g. Se alimentaron en un porcentaje diario del 7% de la biomasa total, distribuidos en 2 porciones al día.

Los parámetros de crecimiento que se consideraron son (Hernández *et al.* 2004):

### **Peso final (g)**

### **Ganancia en peso GP (g)**

$$GP = [(peso\ final - peso\ inicial) / peso\ inicial] \times 100]$$

### **Tasa de Crecimiento Especifico TCE (%)**

$$TCE = [(\ln\ peso\ final - \ln\ peso\ inicial) / tiempo\ de\ alimentación] \times 100]$$

### **Tasa de Eficiencia de la Dieta (TED)**

$$TED = [ganancia\ en\ peso\ (g) / total\ de\ dieta\ ingerida\ en\ base\ seca\ (g)].$$

### **Tasa de Eficiencia de la Proteína (TEP)**

$$TEP = [ganancia\ en\ peso\ (g) / total\ de\ proteína\ consumida\ (g)].$$

## **Determinación de excreción de N amoniacal y P y contenido de P en heces**

Para realizar la determinación de fósforo (P) y nitrógeno (N) amoniacal excretado por orina y branquias, se seleccionaron 15 organismos de cada tratamiento aleatoriamente, los cuales se colocaron individualmente en una cámara de flujo cerrado con concentraciones de fosforo, nitrógeno amoniacal y oxígeno disuelto conocidas, durante un periodo de 30 min. Una vez transcurrido el tiempo se tomaron muestras, las cuales se procesaron de acuerdo a las técnicas de Nessler (método 8083, reactivos Hach, Hach Co., Colorado, USA) y de molibdovanato (método 8114, reactivos Hach, Hach Co., Colorado USA) para N-NH<sub>4</sub> y PO<sub>4</sub> (ortofosfatos), respectivamente. Se determinó estos parámetros, con el uso de un espectrofotómetro (modelo DR 2800, Hach Co., Colorado, USA).

Para la determinación del contenido de P en heces, se utilizaron heces liofilizadas que se trataron de acuerdo al método 10127 Test' N Tube Vials, usando 0.05 g de muestra disueltas de 5 ml de agua destilada.

## **Análisis proximales**

Se determinó el contenido de proteína de las dietas experimentales así como de hígado, músculo e intestino de acuerdo a la técnica de Micro Lowry descrita en el producto "Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification" (Sigma Diagnostics, MO, EUA).

El contenido de lípidos se determinó con la técnica de extracción por Metanol-Cloroformo reportada por Blight y Dyer (1959).

### **Determinación de respuesta inmunológica innata**

Finalizado el periodo de alimentación se tomaron muestras de sangre de 15 organismos al azar de cada tratamiento, dicha muestra se obtuvo de la vena caudal de los organismos y se dejaron coagular a 4°C por tres horas. Transcurrido este período, las muestras se centrifugarán a 7000 rpm por 10 min y se colecta el sobrenadante (suero sanguíneo) esto de acuerdo a la técnica reportada por Taoka, *et al.* (2006).

Para determinar el contenido de proteína en el suero, se utilizara kit de determinación de proteína por la técnica de Micro Lowry descrita en el producto "Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification" (Sigma Diagnostics, MO, EUA).

Para la determinación de actividad de la lisozima, se utilizará la técnica acuosa de *Micrococcus lysodeikticus* (células liofilizadas, Sigma-Aldrich chemical, MO, EUA) y se incubará a 25 °C, se midió en una absorbancia de 530 nm a 0.5, 4.5, 20 y 40 min. La actividad de la lisozima se expresará como unidades de actividad de la lisozima (UI) y se define como la cantidad de enzima que causo un decremento en la absorbancia de 0.001 por mg de proteína.

### **Digestibilidad**

Una vez transcurrido 60 días de alimentación se prepararon de nuevo cada una de las dietas experimentales y el control de harina de pescado a las cuales se le adiciono el 1% de oxido de cromo, al total de alimento preparado, como marcador, con las cuales se alimentaron a los organismos por 10 días mas. Se colectaron las heces durante este período y se le determino el cromo presente de acuerdo a Furukawa y Tsukahara (1996). Utilizando 50 mg de heces liofilizadas.

### **Análisis estadísticos**

Se realizó un análisis de ANOVA de un factor para evaluar si existían diferencias significativas entre los tratamientos en las diferentes variables que se registraron. Posteriormente, se aplicó una prueba de Tuckey en los casos que se presentaron efectos significativos para determinar cuales medias eran diferentes. El análisis estadístico se realizo mediante el programa SPSS v.17.

## Resultados

El crecimiento de los organismos (Figura 1) que fueron alimentados con la dieta control CHP fue la que presento el valor alto entre las dietas, mientras tanto las dietas experimentales se mantuvieron dentro del promedio del peso obtenido por organismo siendo la dieta Fit la mas alta seguida de Lev y al final Lev+Fit, pero la dieta control de Alimento Comercial quedo por debajo de las demás dietas.

Por otro lado la Ganancia en Peso (Figura 2), no mostro diferencias significativas entre ninguna de las dietas tanto como experimentales así como las dietas control. Al igual la Tasa de Crecimiento Especifico (Figura 3) no mostro ninguna diferencia significativa entre las dietas. Pero a su vez muestra el mismo patrón que el crecimiento de los organismos.

Los valores que muestra la Tasa de Eficiencia de la Dieta (Figura 4) nos indica que de nueva manera que la dieta CHP fue la que obtuvo el valor más alto sobre las otras dietas, siendo la dieta Lev+Fit la que obtuvo el valor más bajo, pero teniendo semejanza con las otras dietas experimentales, Lev y Fit.

Y siguiendo la misma tendencia la Tasa de Eficiencia de la Proteína (TEP) (Figura 5) en donde nuevamente la dieta CHP fue la que obtuvo los valores más altos sobrepasando a las demás dietas y quedando por debajo la dieta Lev+Fit con los valores más bajos pero quedando a la par con las otras dietas experimentales.

La sobrevivencia de todos los organismos (Figura 6) con sus respectivas tratamientos experimentales y como los controles, fue mayor del 97%, siendo las dietas Lev, CHP y AC las cuales obtuvieron una sobrevivencia exitosa del 100%.



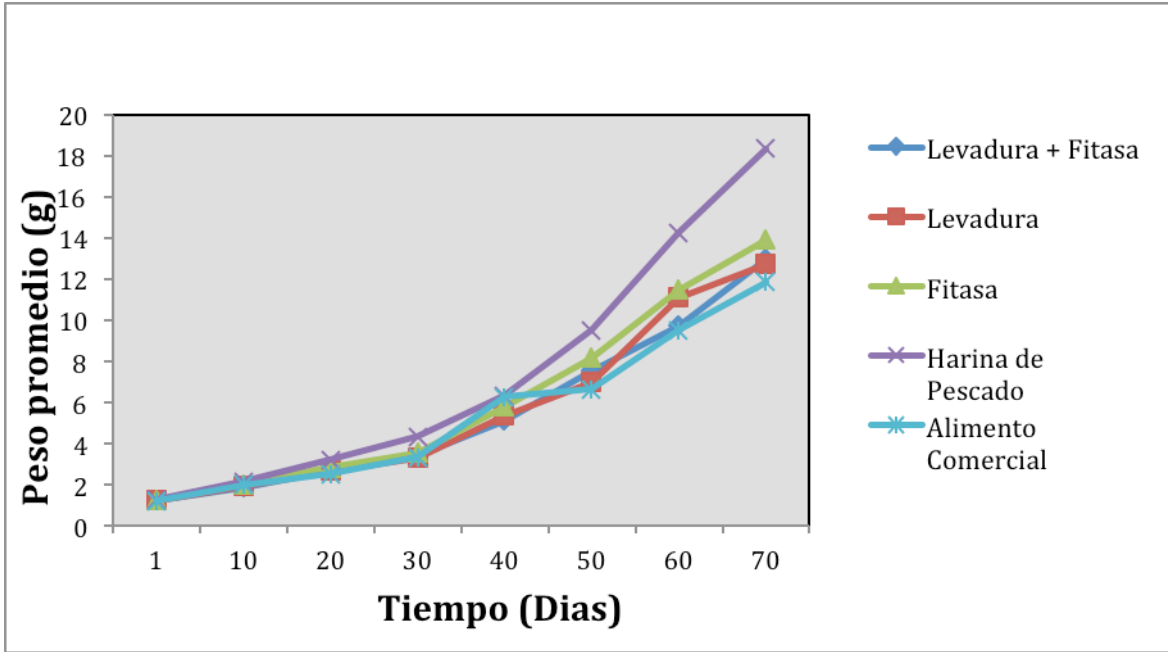


Figura 1. Peso promedio de las crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) al final del periodo de alimentación.

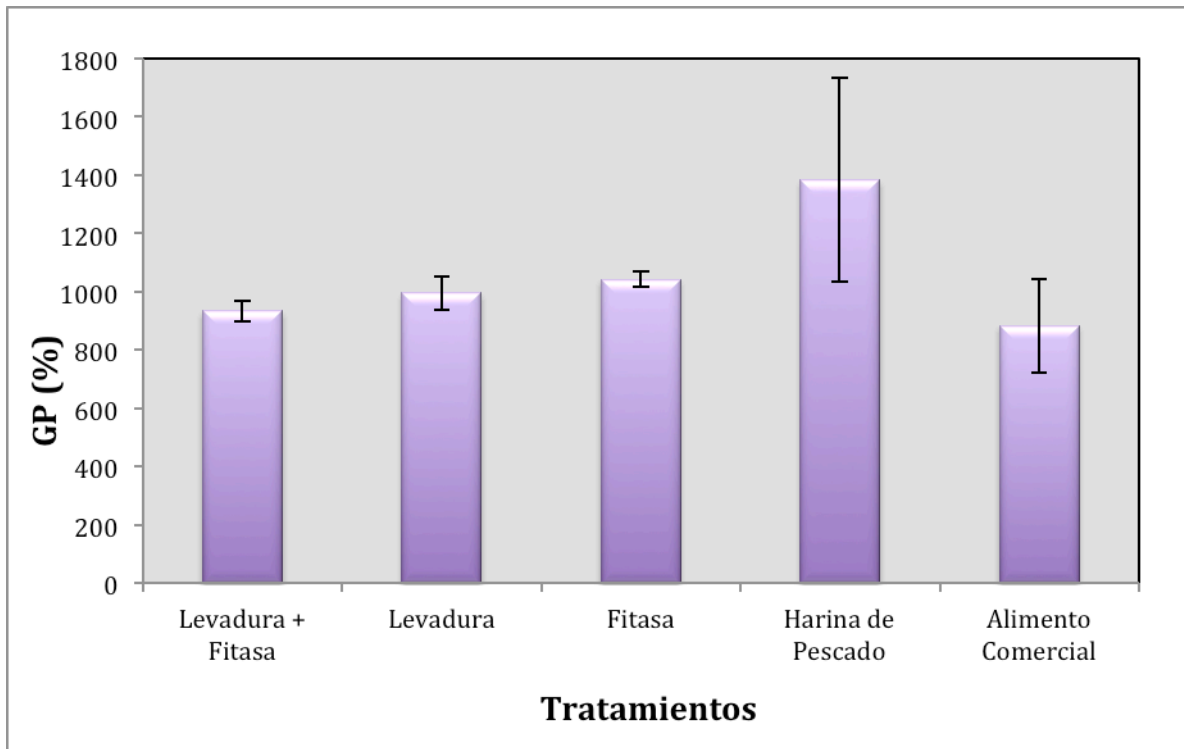


Figura 2. Ganancia en Peso final obtenido por las crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) al final de la fase de alimentación.

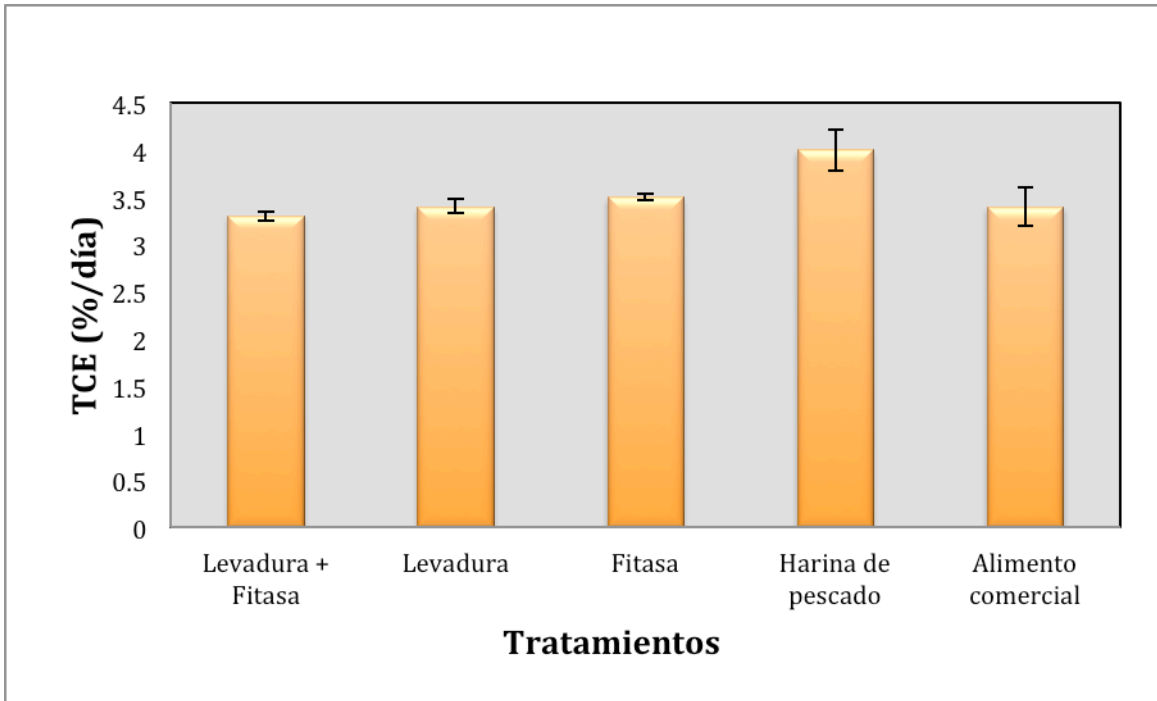


Figura 3. Tasa de Crecimiento Especifico obtenido las crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) al final de la fase de alimentación.

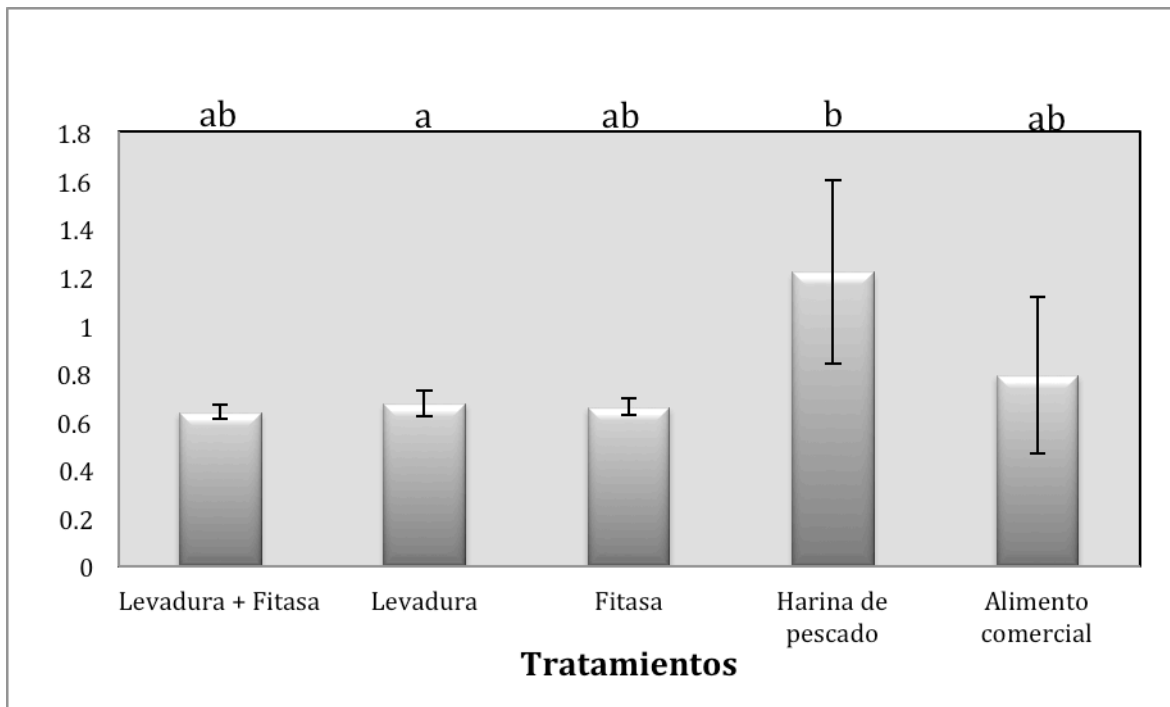


Figura 4. Tasa de Eficiencia de la Dieta, obtenido por las crías de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) al final de la fase de alimentación. Las letras indican cuales medias obtenidas por los tratamientos son distintas.

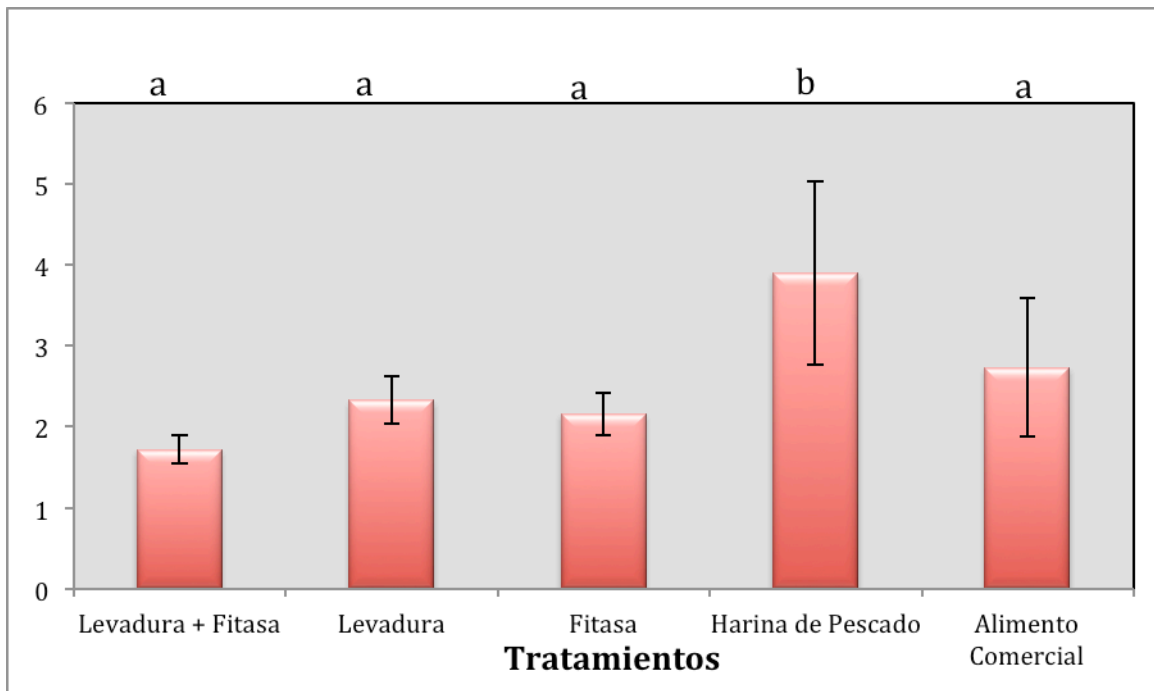


Figura 5. Tasa de Eficiencia de la Proteína, obtenido por los crías de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) al final de la fase de alimentación. Las letras indican cuales medias obtenidas por los tratamientos son distintas.

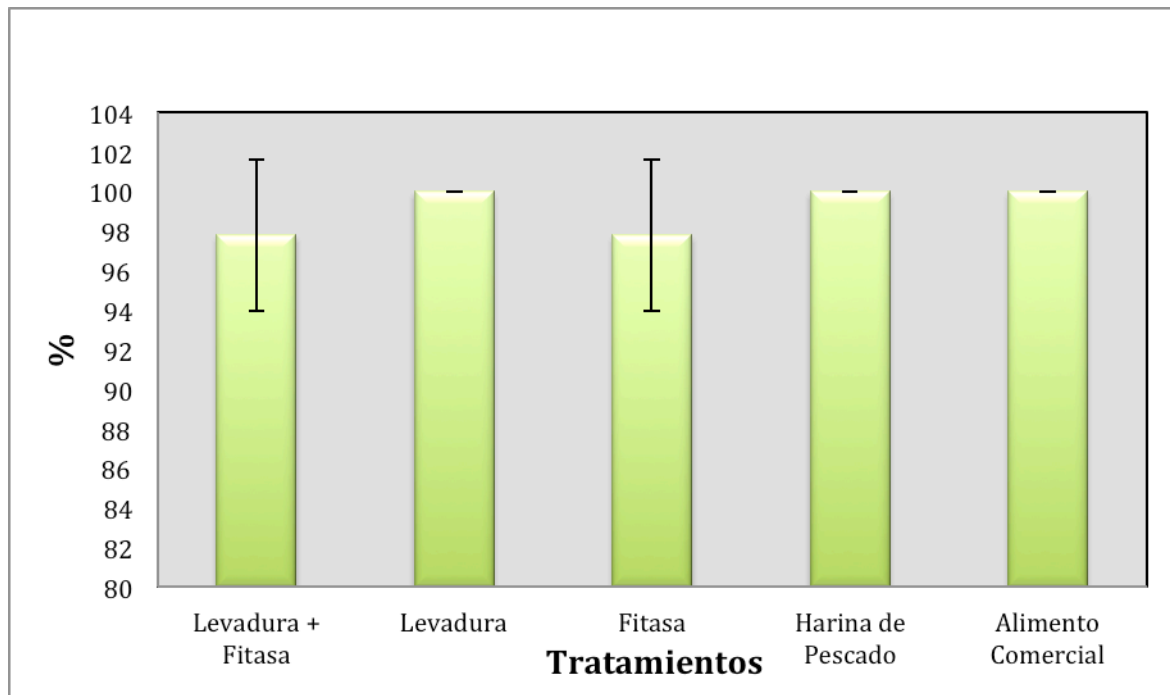


Figura 6. Porcentaje de sobrevivencia obtenido por las crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Los análisis proximales del cuerpo de los organismos utilizados fueron contenido de proteína, porcentaje de lípidos presentes, en los cuales fueron obtenidos de musculo, hígado e intestino de los mismos.

Para el caso de musculo la dieta Lev dentro de las dietas experimentales fue la que obtuvo el mayor porcentaje de lípidos igualándose a los controles y estando por debajo la dieta Lev+Fit siendo el porcentaje mas bajo. Siendo esta misma tendencia fue para el porcentaje de lípidos en intestino al ser la dieta Lev el porcentaje mas alto y el menor la dieta Lev+Fit. Pero en hígado nos muestra diferencias entre las dietas, pues la dieta control AC fue la que obtuvo un porcentaje mas alto que los demás tratamientos estando los restantes en valores similares (Figura 7).

El porcentaje de proteína contenido en musculo nos muestra que la dieta control HP fue el valor mas alto pero no difiriendo las demás dietas, siguiendo esta tendencia en el contenido de proteína en hígado. En intestino podemos observar de igual manera que no hay diferencias significativas pero si siendo la dieta Fit con el valor mas alto (Figura 8).

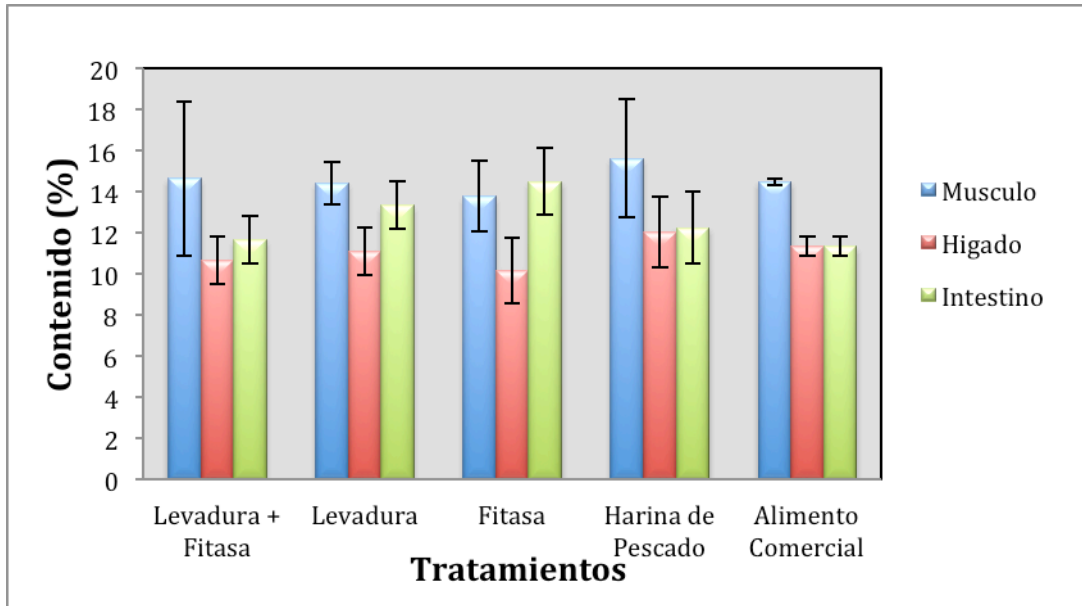


Figura 7. Contenido del porcentaje de lípidos presentes en las viseras obtenido por las crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

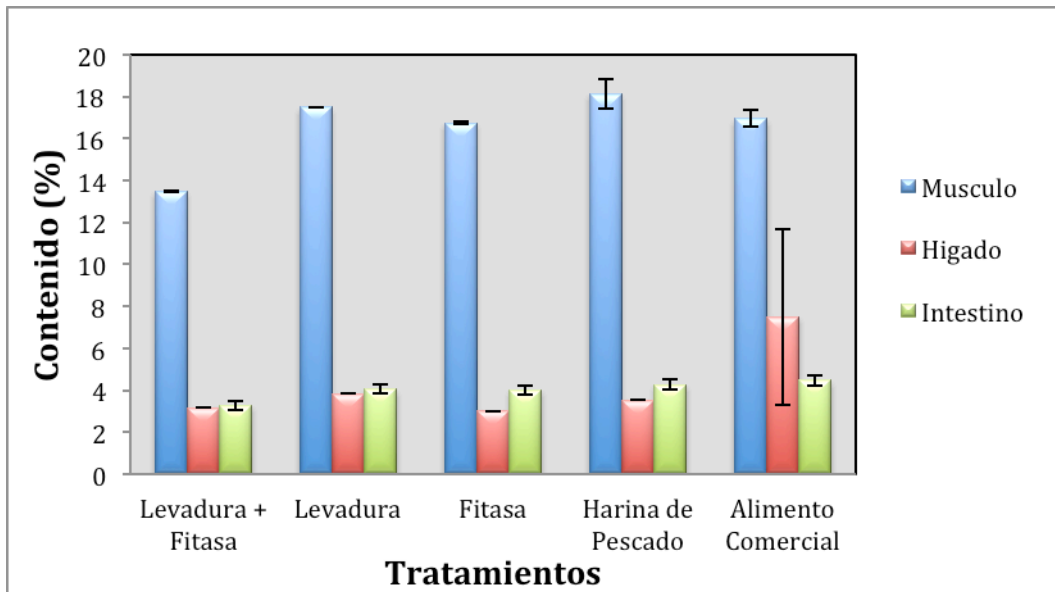


Figura 8. Contenido del porcentaje de proteína obtenido por las crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

El coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) (Figura 9) de la proteína de las dietas que contenían fitasa (dieta Fit) y levadura (dieta Lev) por separado fueron las que obtuvieron resultados mayores que las demás, tanto la que incluía ambos, como el control CHP.

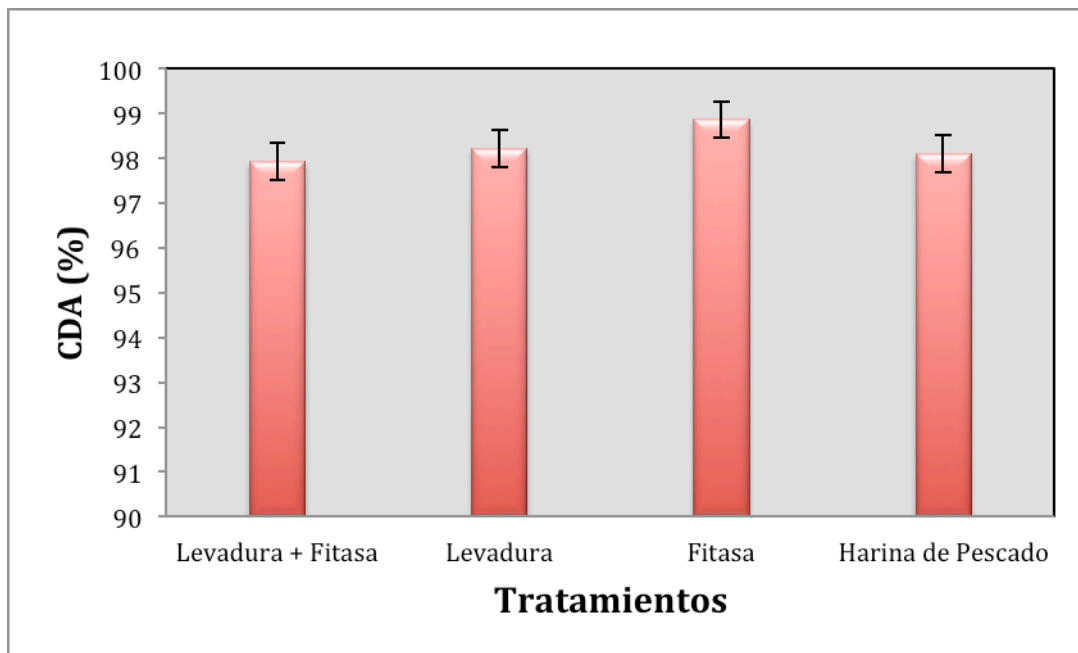


Grafico 9. Coeficientes de Digestibilidad Aparente de la proteína, obtenido por las crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Los resultados pertenecientes al el oxígeno consumido (Figura 10) por los organismos de la dieta Fit fue similar al de la dieta AC pues estos consumieron menor cantidad de oxígeno presente en el agua. Observando que las dietas que incluían la enzima y el probiótico mezclados provocó un mayor consumo de este elemento que estos por separado.

Para el caso del nitrógeno amoniacal excretado por orina y branquias (Figura 11) nos muestra que los organismos alimentados con las dietas experimentales lograron una disminución notable en la emisión de dicho compuesto, siendo las dietas controles a base exclusivamente de HP las que obtuvieron los valores más altos de mg/l excretados.

En el fósforo excretado por orina (Figura 12), de los organismos alimentados con las mezclas de levadura y fitasa, tanto juntas (dieta Lev+Fit) como por separado (dieta Lev, y dieta Fit) mostraron una disminución significativa ante los controles siendo los organismos alimentados con la dieta Lev+Fit la que logró la mayor disminución del compuesto.

En cuanto a él fósforo contenido en heces (Figura 13) de los organismos que fueron alimentados con las dietas experimentales nos muestran la misma tendencia que el P

excretado en orina y branquias, dado que cuando se agregan la enzima y probiótico generan una disminución en su emisión al medio.

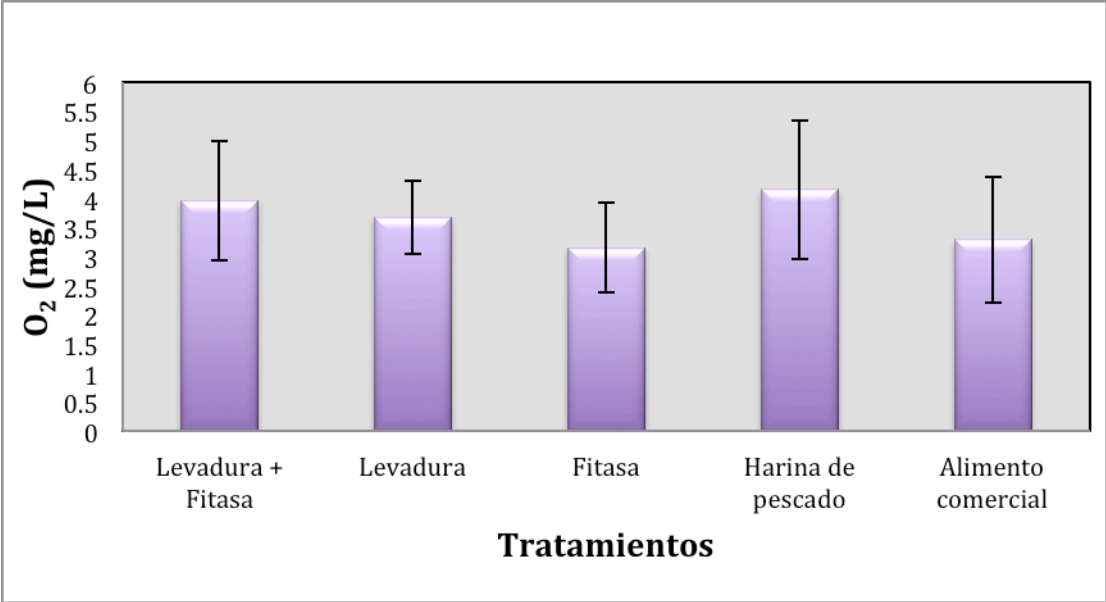


Figura 10. Consumo de Oxigeno Disuelto en agua por las crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

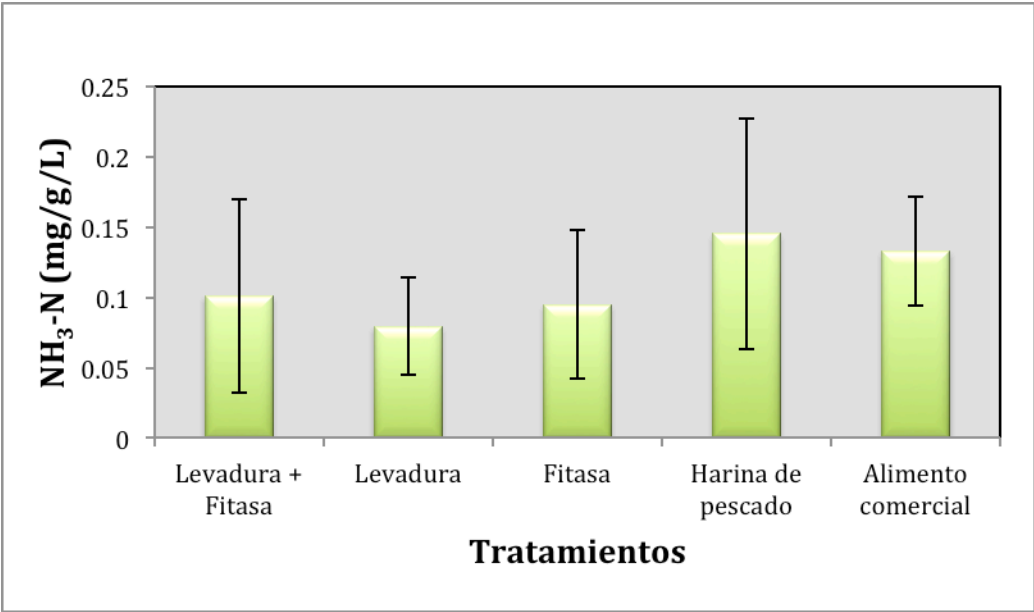


Figura 11. Excreción de Nitrógeno amoniaco en branquias y orina por las crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

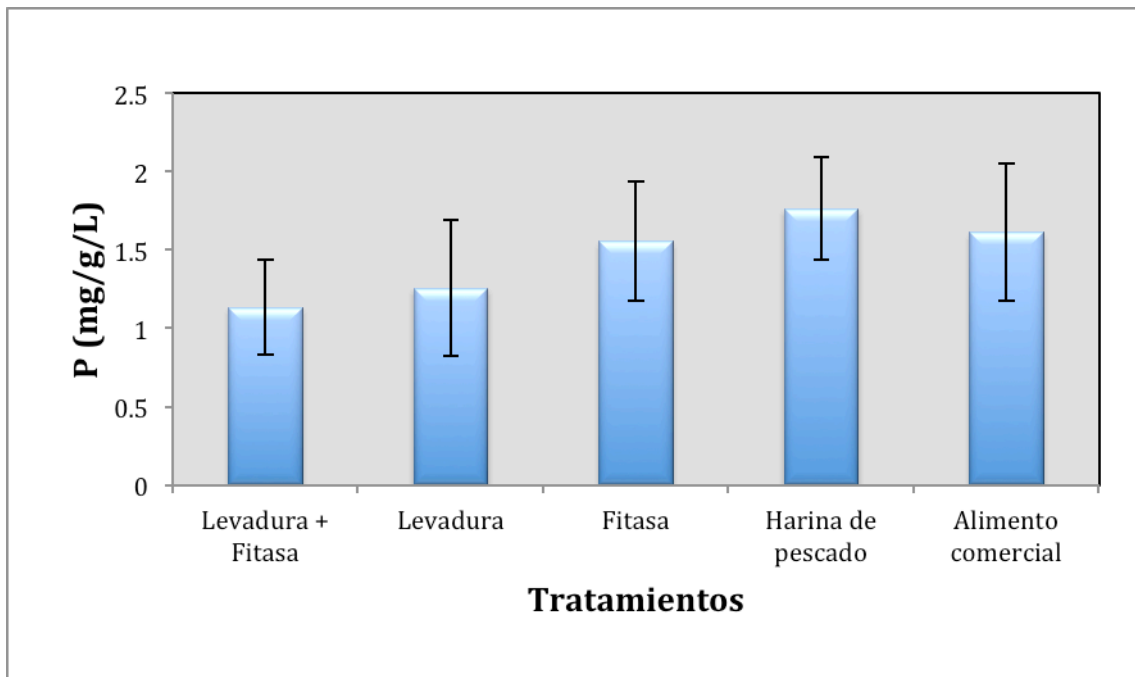


Figura 12. Fósforo excretado en branquias y orina por las crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

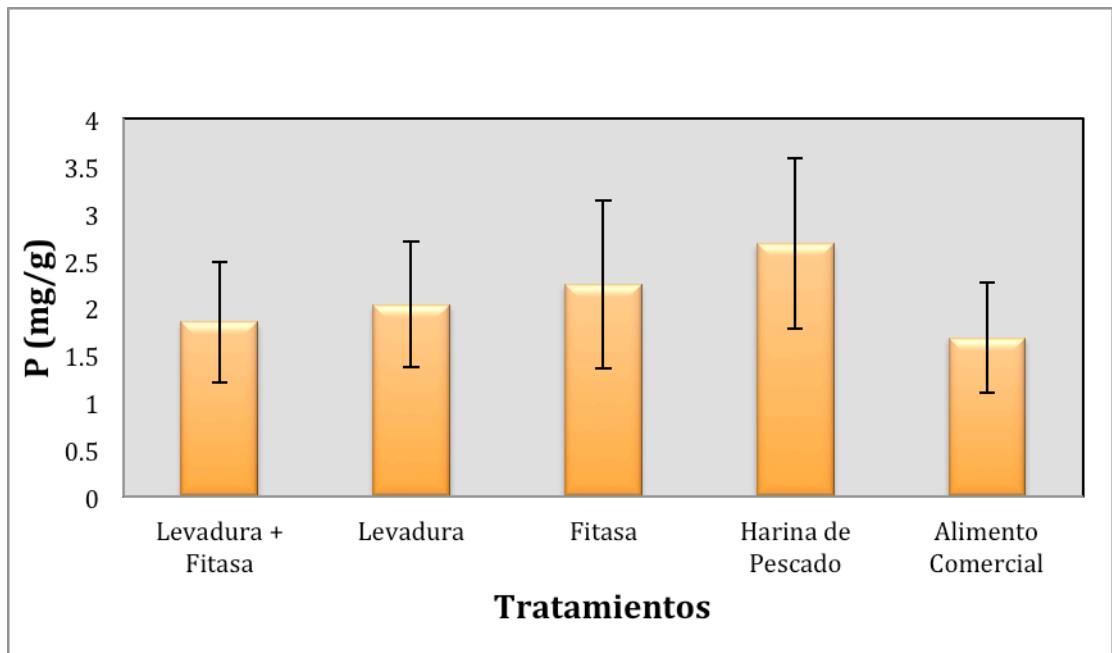


Figura 13. Contenido de P presente en las heces excretadas por las crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).



Los resultados de la actividad de la lisozima obtenida del suero sanguíneo (Figura 14) nos muestra que el tratamiento Lev obtuvo un promedio de 900 UI (Unidades de Lisozima Activa) siendo esta la mayor actividad que se presento en el presente experimento a su vez la dieta Lev+Fit en un segundo lugar y la dieta Fit en tercer lugar, mostrándonos una relación directa entre el uso de la levadura como probiótico.

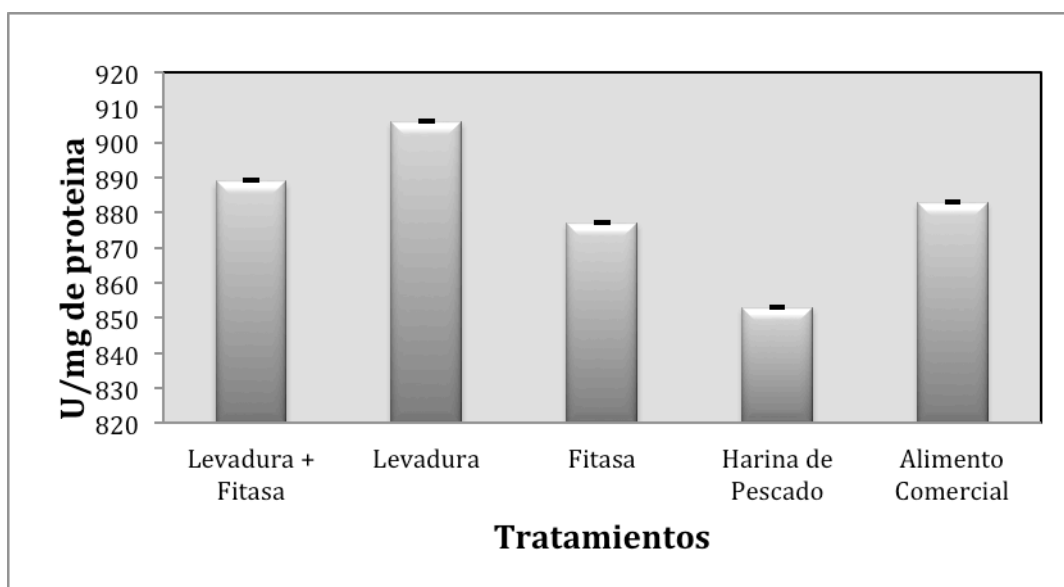


Figura 14. La actividad de la lisozima presente en el suero sanguíneo obtenido por las crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

## Discusión

Se comprobó que la aplicación de la levadura como probiótico en las dietas con una sustitución del 75% de HS a crías de trucha arcoiris no repercute en el crecimiento de los organismos, aún cuando se adiciona en forma libre o en combinación de fitasa. En especial, los organismos alimentados con las dietas Lev y Fit que son las mostraron un mejor efecto sobre el desempeño del crecimiento de los organismos.

Nikoskelainen *et al.* (2001) refiere que la aplicación y una correcta asimilación de la HS en dietas para crías de trucha arcoiris se manifestará en beneficio, obtenido en la composición proteica del cuerpo del organismo y la tasa de crecimiento, promoviendo la digestión de la proteína y la absorción en el tracto digestivo. A lo cual la incorporación de complementos tanto enzimáticos, bacterianos o a base de levaduras llamados probióticos, llevarán a una mejor disposición de nutrientes y utilización de dicha harina vegetal (Tovar *et al.* 2002).

Esto, es particularmente relevante para la utilización de HS en peces carnívoros, pues lo observado en trucha arcoiris es que causa efectos perjudiciales sobre el crecimiento y su respuesta inmunológica. En investigaciones previas Olli y Krugdahl (1995) indican que sustituciones mayores a un 40% de HS reducen drásticamente la GP y TED, pero Cruz Castro *et al.* (2011) comprobaron que una sustitución del 75% con la adición de la enzima fitasa que mejora la digestibilidad de la dieta y su capacidad para sostener un desarrollo y crecimiento normal en los juveniles de trucha arcoiris; al igual Wang *et al.* (2009) sugieren que el uso de la fitasa permite mejorar la digestibilidad reflejado en el crecimiento. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la alta sustitución de la HS puede ser empleada sin afectar significativamente el crecimiento de los organismos cuando es aplicada la inclusión de la levadura en su forma viva y/o fitasa. Los peces que fueron alimentados con Lev+Fit, Lev y Fit mostraron un peso corporal comparado con el control AC, pero a esto la dieta CHP superó dicho resultado, así la GP mostró el mismo patrón, tal como lo reportado por Cruz Castro *et al.* (2011) e igual con Sealey W *et al.* (2009) donde usaron un suplemento con composición a base de levadura como probiótico en una sustitución del 20% de HS mostrando el mismo patrón de crecimiento.

Esta respuesta positiva de las crías, se debe a que la adición de la fitasa en las dietas, incrementa la especificidad de las enzimas digestivas en los bordes de sus membranas celulares, tal como las enzimas proteolíticas, pepsinas, amilasas y amolopsinas (Aubin 2005; Quentel *et al.* 2005) debido a que algunos estos complejos hidrolizan durante la digestión, el fitato no digerible presente en la HS (Cao *et al.* 2007), al igual la levadura aumenta dicho comportamiento, mediante la acidificación del contenido intestinal activando la flora nativa

del organismo y el aporte de vitaminas y enzimas que colaboran con la degradación del alimento consumido, que sinérgicamente actúan como promotores del crecimiento debido a la acción que se ejerce sobre el intestino, favoreciendo a la mayor absorción y utilización de los nutrientes (Yann 2006).

Al tomar en cuenta que la absorción de los nutrientes participa en uno de los principales roles para que en los organismos se fomente el crecimiento, la fracción de la proteína sera de gran importancia en etapas de tempranas del desarrollo del mismo, pues necesitaran nutrientes facilmente disponibles.

El CDA de la proteína de las tres dietas experimentales fue mayor al obtenido por Sajjadi y Carter (2004) en salmón del Atlántico con 200 UF/kg (unidades de fitasa) adicionadas a la dieta y 50% de sustitución de HS, obteniendo un 83% en promedio de CDA en ellas. De acuerdo a Sugiura *et al.* (2001) el porcentaje obtenido en el la CDA de la dieta dependerá de las UF/kg adicionadas a ellas, se ha observado que en la trucha arcoiris que fueron alimentadas con sustituciones no mayores a un 50% de HS y 200 UF alcanzan CDA del 90%, pero cuando las UF aumentaron a 1000 UF solo alcanzaron un 62% de CDA. Por lo tanto Cao *et al* (2007), Foster et al (1999) plantean el empleo de una dosis óptima de 250-1500 UF/kg según la especie, para incrementar y obtener una eficiente digestibilidad de la proteína. Sin embargo las dietas de este experimento que incluian fitasa Lev+Fit y Fit, contenían 2000 UF/kg, lo cual sobrepasa la dosis recomendada y aún a esto los CDA fueron superiores a un 97% sin afectar lo mencionado por Jackson *et al* (1996) que cuando esta dosis se sobrepasa genera un efecto negativo como en la retención de P ocasionando grandes descargas al medio del mismo. La dieta Lev de igual manera obtuvo un CDA mayor a un 97%, lo que propone que la levadura alienta a que el organismo aproveche dicho macronutriente apropiadamente, por que de acuerdo a Steffens et al (1989) la digestión de la proteína en la trucha es considerablemente lenta en el estómago, Kitamikado y Tochino (1960) reportan que la actividad proteolítica en el estómago e intestino en crias de trucha arcoiris no es tan fuerte y que su actividad aumenta conforme al desarrollo del mismo, estos argumentos nos llevan a proponer que la actividad de la levadura en el tracto digestivo conlleva a una maduración del mismo.

Estos dos tratamientos Lev y Fit muestran un mejor desempeño en la utilización de la proteína vegetal, que a su vez estas dietas presentaron los valores mas bajos de consumo de oxígeno y excreción de N amoniacal.

De acuerdo a Bureau et al (2002) los parámetros de excreción de N amoniacal y el consumo de oxígeno puede ser usados para estimar la oxidación de nutrientes de la dieta, usualmente valores bajos indican un mejor uso de la fuente de la proteína (menor excreción) y menor

gasto de energía en su oxidación (menor consumo). Esto nos indica que cuando estos los dos componentes la levadura y fitasa actúan por separado, realizan un mejor trabajo al aprovechar los nutrientes presentes en la dieta, por que cuando los dos forman una mezcla podrían generar un doble trabajo en la oxidación de los nutrientes tal como el tratamiento Lev+Fit, así que probablemente esto sugiere el pobre crecimiento logrado, comparado con las otras dietas experimentales.

El P es un importante constituyente de ácidos nucleicos y membranas celulares, así que es el mayor constituyente de componentes estructurales, como en el desarrollo del esqueleto y tejidos y está directamente implicado en la producción de energía (NRC 1993). Sin embargo el P ingerido por los peces a través del agua es casi nulo y no cubre sus requerimientos; así que el alimento será su principal fuente de suministro (Asgard *et al* 1997). Se sabe que el fitato presente en las harinas vegetales funge como almacenaje de P el cual está disponible hasta en un 80%, pero éste puede combinarse con proteínas y vitaminas como complejos insolubles que reduce su utilización, eficiencia, actividad y digestibilidad (Sugiura *et al*, 2001). Al presentar este comportamiento, la biodisponibilidad del P se verá afectada y será excretado vía orina y en las heces (Coloso *et al*. 2003). Mientras tanto el P es un contaminante crítico en los ambientes acuáticos, en excesivas concentraciones es la causa más común de eutrofización de cuerpos acuáticos aledaños a la granjas (Correll *et al* 1999) lo cual es la mayor preocupación de las actividades acuícolas.

Los resultados de la excreción P, muestran que el probiótico y enzima adicionados generan una disminución en la descarga de dicho elemento y más cuando ambos están presentes en la dieta (Dieta Lev+Fit) pues esta fue la que logró la menor excreción del elemento y su contenido en heces, comparado con los organismos que fueron alimentados con HP, a su vez esto nos indica que la aplicación de estos pueden promover su retención y disminuir su excreción como lo reportado por Cruz *et al* (2011). Según Rodehutscord *et al* (1995) la aplicación de la fitasa logra una disminución en la descarga de P total al ambiente de 30-50% en especies de salmónidos, carpas y tilapias, corroborando lo obtenido por la dieta Lev+Fit que esta alcanzó una disminución del 40%, esto ocurre debido a la alta especificidad de la fitasa conlleva a que durante la digestión de la dieta en el tracto digestivo del organismo se lleve a cabo la hidrólisis de la unión fitato-P (Cao *et al* 2007), también reporta la actividad de la fitasa microbiana que es generada por grupos de bacterias, hongos y levaduras pues se son utilizados para alimentar a peces, estos aumentan la biodisponibilidad del P para ser metabolizado, lo cual genera lo ya mencionado, disminución de las descargas del elemento a los ambientes acuáticos (Debnath *et al* 2005).

Para el cultivo de cualquier organismo en acuicultura se deben mantener las condiciones óptimas que estos requieran para logren un desarrollo exitoso, pero cuando esto se ve afectado puede repercutir sobre la producción que se obtenga. De ahí el control de las concentraciones de compuestos o elementos, que pueden provocar contaminación así como crecimientos bacterianos y de microalgas (Liebert *et al* 2005). De ahí la importancia de la nutrición en el mantenimiento de la salud de los peces con respecto a la relación nutricional sobre la inmuno-competencia y resistencia a enfermedades, como bien es el rol de la mediación del stress. (Regulation, EC No, 1831).

Los peces presentan diversas defensas inmunitarias innatas, la primera de ellas la constituye la piel y las mucosas que recubren las branquias y el tracto gastrointestinal pues estas contienen una variedad de compuestos antimicrobianos: lisozimas y proteasas, proteínas C reactivas, etc. (Manning *et al.* 1998; Buchmann *et al.* 2001). La lisozima es una importante molécula de defensa del sistema inmune innato, la cual es importante en la mediación de la protección contra la invasión microbiana, especialmente en bacterias Gram-positivas (Jolles y Jolles 1984; Manning *et al.* 1998). Y su actividad dependerá del grado, intensidad, duración del stress así como el tipo al cual este sometido (Yildiz 2006).

Los resultados de la actividad de la lisozima del experimento en las dietas experimentales muestran valores significativamente mayores a los obtenidos por los organismos alimentados con las dietas a base solamente de HP, siendo las dietas Lev+Fit y Lev, las cuales incluían levadura, las que obtuvieron los valores mas altos. Según Verlhac *et al.* (1996) los valores óptimos de las unidades de lisozima presentes en el suero sanguíneo de la trucha arcoíris van de 600-1000 U, cuando estos son alimentados con dietas balanceadas a base de HP, cuando se aplican inmuno-estimulantes como productos de HS, Kroghdahl y Roed (2000) mencionan que en el salmón del Atlántico ocurre un aumento de la actividad de la lisozima.

Panigrahi *et al* (2004) muestran que la actividad de la lisozima fue significativamente mas alta cuando se le alimento a la trucha arcoíris con una mezcla de *Lactobacillus rhamnosus*. Al igual Sharifuzzaman S.M. y Austin B. (2009) cuando alimentaron a juveniles de trucha arcoíris con el probiótico Kocuria SM1 aislado del tracto digestivo de los organismos, estos mostraron niveles de lisozima de 900-1850 UI, lo que nos indica que cuando aplicamos la levadura a las dietas estas si generan un efecto positivo sobre la respuesta inmune innato de los organismos, pues estas alteran, equilibran, fortalecen la flora intestinal, estimulando las defensas naturales, induciendo efectos locales o sistémicos para la salud del huésped.

Se han purificado y extraído compuestos presentes en las paredes celulares de levadura como receptores que reconocen las uniones de  $\beta$ -glucanos y manoligosacáridos (MOS) que

trabajan localmente en el intestino, que promueven la salud intestinal, por la adhesión y bloqueo de receptores glicoproteicos y patógenos (Robertsen 1995; Newman 2001; Fernandez *et al.* 2002).

Durante este experimento se confirmó la presencia de la levadura en la dieta al final del periodo de alimentación. Sin embargo, el numero total de células adicionadas a la dieta, disminuyó conforme transcurrían los días de experimento, hasta solo quedar una tercera parte de la cantidad inicial de células. Pero aún de este fenómeno, la levadura provoco un efecto benéfico sobre los organismos, algunos autores como Verschuere *et al.* (2000) menciona que los mecanismos de los probióticos están sujetos a un continuo debate y multifactores verosímiles incluyendo la producción de componentes de inhibidores antibacteriales, como bien la modulación inmune del hospedero y la modificación de los componentes dietéticos para incrementar su utilización por el hospedero. Y esto puede ser influido por diversos factores, pues la mayoría de las células en el tránsito intestinal de los peces son eliminadas rápidamente debido al constante flujo de agua, situación que pone en duda de una microflora natural en estos tejidos. De acuerdo a Nayak (2010) algunos probióticos tienen solo un efecto benéfico sobre la utilización de los nutrientes, cuando estos son suministrados en forma y dosis regulares. Sin embargo, se ha demostrado que algunas especies de levaduras dentro del género *Saccharomyces* poseen mecanismos que les permite colonizar el intestino de los peces y eventualmente amplificar la población por la participación de adhesinas específicas y por la hidrofobicidad típica de las células (Andlid 1995).

## Conclusiones

Se considera que para aprovechar la HS en altas concentraciones se debe agregar levadura como probiótico y fitasa, debido a que no genera un efecto negativo en el crecimiento de los organismos, reduce las emisiones de P y N amoniacal, mejora la respuesta inmune innata y su aplicación a las dietas no crea un gasto excesivo para la formulación de las mismas.

Así mismo la adición individual de la levadura a las dietas crea el mismo efecto benéfico sobre los organismos. Dando pauta a que esta sí genera una mejora en el metabolismo, como en la respuesta inmune de los organismos.

Debido a la pérdida de células de levadura en las dietas, se aconseja mantener constante la cantidad para poder crear un mejor aprovechamiento de las dietas. Y confirmar la existencia de la misma dentro del tracto digestivo en los organismos.

## Referencias

- Anadlid, T., 1995, Ecological physiology of yeast colonizing the intestine of fish. PhD tesis. -University of Goteborg, Sweden. 75pp.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Anal. Chem., Virginia, USA, pp. 69-78.
- Aubin, J., Gatesoupe, F.J., Quentel, C., Labbé, L., Forraz, M., 2005b. Ofimer probiotic study on rainbow trout. III. Flesh quality assessment of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) submitted to probiotic treatment with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. In: Howell, B., Flos, R. (Eds.), Lessons from the Past to Optimise the Future, Aquaculture Europe 2005, Trondheim, Norway, 5–9 August 2005. EAS Special Publication, vol. 35. European Aquaculture Society, Oostende, Belgium, pp. 115–116.
- Asgard T, Shearer KD. The dietary phosphorus requirement of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) and its relationship to the phosphorus requirements reported for other fishes. *Aquacult Nutr* 1997;3:17–23
- Barrows F. T., Brow P., Dabrowski K., Gatlin D. M., (2007), Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeed: a review, *Aquaculture Research*, 38, 551-579.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911–917.
- Buchmann K, Lindenström T, Bresciani J. Defence mechanisms against parasites in fish and the prospect for vaccines. *Acta Parasitol* 2001;46:71-81.
- Cao L., Wang W., Yang C., (2007), Application of microbial phytase in fish feed, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 497-507.
- Chambrillón Mariana y Moróñigo Miguel. Pueden comer los peces yogur. *Uma.es*. 2004.
- Coloso, r. M., King, J. W. Fletcher, M. A. Hendrix, M. Subramanyam, P. Weis & r. P. Ferraris. 2003. Phosphorus utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed practical diets and its consequences on effluent phosphorus levels. *Aquaculture* 220: 801-820.
- Correll DL. Phosphorus: a rate limiting nutrient in surface waters. *Poult Sci* 1999;78:674–82.



- Dabrowski, K., Poczyczynski, P., K&k, G. and Berger, B., 1989. Effect of partially or totally replacing fishmeal protein by soybean meal protein on growth, food utilization and proteolytic enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). New in vivo test for exocrine pancreatic secretion. *Aquaculture*, 17: 29-49.
- Debnath D, Pal AK, Sahu NP. Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth and nutrient digestibility of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings. *Aquacult Res* 2005;36(2):180–7.
- FAO. State of World Aquaculture. (2006) FAO Fisheries Technical Paper. No.500. Rome,FAO,145pp..[fao.org/ogis/servlet/static?dom=root&xml=aquaculture/regional\\_reviews\\_list.xml](http://fao.org/ogis/servlet/static?dom=root&xml=aquaculture/regional_reviews_list.xml).
- Fernandez, F., Hinton, M., van Gils, B., 2002. Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella enteritidis* colonization. *Avian Path.* 31, 49–58.
- Forster I, Higgs DA, Dosanjh BS, Rowshandeli M. Potential for dietary phytase to improve the nutritive value of canola protein concentrate and decrease phosphorus output in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) held in 11 ° C fresh water. *Aquaculture* 1999;179(1):109–25.
- Gatesoupe, F.-J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquacult.* 180, 147–165.
- H. Furukawa and H. Tsukahara., (1966), On the acid digestion method for determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 32 (1966), pp. 207–217
- Hansen, G.H. y J.A. Olafsen, 1999. “Bacterial interactions in early life stages if marine cold water fish”. *Microb. Ecol.* 38(1): 1-26.
- Hernandez, H.L.H., Teshima, S.-I., Ishikawa, M., Koshio, S. 2004. Effects of dietary vitamin A on juvenile red sea bream *Chrysophrys major*. *J. Worl Aqucult. Soc.* 35: 436-444.
- Iida, T., Takahashi, K., Wakabayashi, H., 1989. Decrease in the bactericidal activity of normal serum during the spawning period of rainbow trout. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 55: 463–465.
- Jackson L, Li MH, Robinson EH. Use of microbial phytase in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets to improve utilization of phytate phosphorus. *J World Aquacult Soc* 1996;27(3):309–13.
- Jolles P. & Jolles J. (1984) What’s new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Molecular and Cellular Biochemistry* 63,165^189.

- Krogdahl B.M. & Roed B. (2000) Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products: effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. *Aquaculture Nutrition* 6,77-84.
- Liebert F, Portz L. Nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase. *Aquaculture* 2005;248:111.
- Manning MJ. Immune defence systems. In: Black KD, Pickering AD editors. *Biology of farmed fish*. Sheffield: Sheffield Academic Press; 1998:180-221.
- Moriarty, D.J.W., 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*. 151,333-349.
- National Research Council (NRC), 1993, *Nutrient Requirements of Fish* National Academy Press, Washington, DC, USA, 114pp.
- Nayak S.K., 2010, Probiotics and immunity: A fish perspective, *Fish & Shellfish Immunology* 29 2-14.
- Newman, K.E., 2001. Effect of mannan oligosaccharide on the microflora and immunoglobulin status of sows and piglet performance. *J. Anim. Sci.* 79, 189.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Bylund, G., 2001. Protection of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquacult.* 198, 229-236.
- Ochoa, J.L., y R. Vazquez-Juarez, 2004, Las levaduras marinas como herramienta científica y biotecnológica, *Universidad y Ciencia*, no. Especial I: 39-50.
- 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
- Olli J.J., Krogdahl Å., van der Ingh T.S.G.A.M. & Brattås L.E. (1994) Nutritive value of four soybean products in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Acta Agriculturae Scandinavica Section A, Animal Science* 44,50-60.
- Olli, J., Krogdahl, A., 1995. Alcohol soluble components of soybeans seem to reduce fat digestibility in fish-meal-based diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Research* 26, 831-835.
- Panigrahi A., Kiron V., Kobayashi J., Puangkaew J., Satoh S. & Sugita H. (2004) Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and*

Immunopathology 102, 379-388.

- Pongmaneerat, J. and Watanabe, T., 1992. Utilization of soybean meal as protein source in diets for rainbowtrout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 1983-1990.
- Quentel, C., Gatesoupe, F.J., Aubin, J., Lamour, F., Abiven, A., Baud, M., Labbé, L., Forraz, M., 2005. Ofimer probiotic study on rainbow trout. I. Resistance against *Yersinia ruckeri* and humoral immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) submitted to probiotic treatment with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. In: Howell, B., Flos, R. (Eds.), *Lessons from the Past to Optimise the Future*, Aquaculture Europe 2005, Trondheim, Norway, 5–9 August 2005. EAS Special Publication, vol. 35. European Aquaculture Society, Oostende, Belgium, pp. 380–381.
- Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition (Text with EEA relevance). <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0029:0043:EN: PDF>.
- Reinitz, G.L., Orme, L.E., Lemm, C.A. and Hitzel, F.N., 1978. Full-fat soybean meal in rainbow trout diets. *Feedstuffs*, 50: 23-24.
- Robertsen, B., 1999. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 269–290.
- Rodehutsord M, Pfeffer E. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Water Sci Technol* 1995;31(10):143–7.
- Sajjadi M, Carter CG. Effect of phytic acid and phytase on feed intake, growth, digestibility and trypsin activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquacult Nutr* 2004;10(2):135–42
- Sallenave-Namont, C., Y.F. Pouches, 2000, Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas, *Mycopathology* 149: 21-25
- Ståle Refstie a, Øyvind J. Korsøen b, Trond Storebakken a, Grete Baeverfjord a, Ingrid Lein a, Andries J. Roem, 2000, Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and Atlantic salmon *Salmo salar*, *Aquaculture* 190 . 49–63
- Ståle Refstie, Grete Baeverfjord, Rudi Ripman Seim, Odd Elvebø, 2010, Effects of dietary yeast cell wall  $\beta$ -glucans and MOS on performance, gut health, and salmon

lice resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed sunflower and soybean meal, *Aquaculture* 305 109–116.

- Sugiura SH, Gabaudan J, Dong FM, Hardy RW. Dietary microbial phytase supplementation and the utilization of phosphorus, trace minerals and protein by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) fed soybean meal-based diets. *Aquacult Res* 2001;32:583–92.
- Pointillart, A., Fontaine, N., Thomasset, M., 1984. Phytate phosphorus utilization and intestinal phosphatases in pigs fed low phosphorus: wheat or corn diets. *Nutr. Rep. Int.* 29, 473–483.
- Tacon, A.G.J., Haaster, J.V., Featherstone, P.B., Kerr, K. and Jackson, A.J., 1983a. Studies on the utilization of full-fat and solvent extracted soybean meal in a complete diet for rainbow trout. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 49: 1437-1443.
- Tovar, D., J. Zambonino, C. Cahu, F.J. Gatesoupe, J., Vazquez-Juárez y R. Lesel, 2002. “Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae”. *Aquaculture*. 204(1-2): 113-123.
- Verlhac V., Gabaudan J., Obach A., Schuep W. & Hole R. (1996) Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 143, 123-133.
- Verschuere, Laurent; Rombaut, Geert; Sorgeloos, Patrick And Verstraete, Willy. Probiotic bacteria as biological Control agents in aquaculture. En: *Microbiology and Molecular Biology Review*. Bélgica: American Society for Microbiology, Vol. 64, No. 4 (Dic, 2000). 655 – 671
- Yann W., Françoise A., François-Joël G., 2006, Cross effects of the dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing condition on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fry., *Aquaculture* 258 (2006) 470–478
- Yildiz H.Y. (2006) Plasma lysozyme levels and secondary stress response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after exposure to Leteux-Meyer mixture. *Turkey Journal of Animal Science* 30, 265-269.
- Yokohama, S., Koshio, S., Takakura, N., Oxida, K., Ishikawa, M., Gallardo-Cigarroa, F.J., Catacutan, M.R., Teshima, S.-I. 2006. Effect of dietary bovine lactoferrin on growth response, tolerance to air exposure and low salinity stress conditions in orange spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*. 255: 507-513.

- Yu FN, Wang DZ. The effects of supplemental phytase on growth and the utilization of phosphorus by crucian carp *Carassius carassius*. J Fish Sci Chin 2000;7(2):106–9.



El porcentaje de oxido de cromo en la muestra

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

Donde: X= Contenido de oxido de cromo en mg en la muestra.

A= Peso de la muestra.

## Anexo 2

### Determinación de fósforo y nitrógeno excretados al medio

#### Método de Nessler

1. Se utiliza en el espectrofotómetro el programa 380 N Amonia de Ness.
2. Se prepara un blanco con 10 ml de agua destilada 3 gotas de estabilizador de minerales, 3 gotas de alcohol polivinilico y 1 ml de reactivo de Nessler.
3. Se utilizan también 10 ml de muestra de agua y se le agregan de igual manera 3 gotas de estabilizador de minerales, 3 gotas de alcohol polivinilico y 1 ml de reactivo de Neesler.
4. Se deja reposar 1 min
5. Se transfiere la solución “blanco” en cubetas de vidrio para medir y se preciona la opción zero para calibrar el aparato.
6. Después se introducen las muestras y se presiona la opción read y los resultados se expresan en mg/L de NH<sub>3</sub>-N.

#### Método de reactivo de molybdvanadato

1. Se utiliza el espectrofotómetro en el programa 480 P React. Mo.
2. Se prepara el blanco con 10 ml de agua destilada en un recipiente libre de fosfatos y se le agrega 0.5 ml de reagente de molybdovanadato.
3. Para las muestras se toman 10 ml de las mismas y se le agregan de igual manera 0.5 ml de reagente de molybdovanadato.
4. Se deja reposar 7 min y se lee el blanco presionando la opción zero para calibrar el aparato.
5. Las muestras de igual manera se dejan reposar por 7 minutos y se leen presionando la opción read y los resultados se expresan en mg/L PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.



### Anexo 3

#### Determinación de fósforo total en heces y plasma

1. Para la determinación de fosforo total en heces y plasma se utiliza el digestor, calentándolo a 150°C.
2. Se prepara un blanco sin muestra, solo agregando los reactivos que se mencionaran a continuación.
3. Se agregan 50 mg de muestra en el caso de las heces y 10 µl de plasma a los tubos de "Total Phosphorus Test´N Vial".
4. Se agrega el contenido de un sobre de persulfato de potasio a cada tubo se cierra y se agita para disolver.
5. Cuando el digestor alcanza la temperatura de 150°C se introducen los tubos en los compartimentos muy bien cerrados por 30 min.
6. Terminado el tiempo se sacan los tubos y se dejan enfriar a temperatura ambiente.
7. Una vez fríos se agregan 2 ml de hidróxido de sodio a cada tubo y 0.5 ml de reagente de molybdovanadato se tapa para agitar.
8. Se dejan reposar por 7 min y se leen
9. La lectura se lleva a cabo en el espectrofotómetro
10. Para calibrar el aparato se lee el blanco y se presiona zero.
11. Una vez calibrado se leen las muestras y los resultados se obtienen en mg/L de  $PO_4^{3-}$ .

#### Anexo 4

Actividad de lisozimas.

1. La sangre se obtiene de la vena caudal, cortando la cola y almacenando la sangre en frascos opendora, manteniéndolos en hielo.
2. Una vez obtenida la muestra se centrifuga para obtener el suero sanguíneo.
3. Se vierte 100µl en tubos de ensayo previamente etiquetados para su mejor manejo.
4. Se agregan 900µm de *Micrococcus lysodeikticus* a cada tubo y las muestras se leen a 530 nm en un espectrofotómetro (Hach), a 0.5 min, 4.5 min, y 20 min.

#### Anexo 5

Determinación de porcentaje de proteína

1. Colocar 50 mg de muestra en un tubo de ensayo.
2. Agregar 1ml de agua destilada y homogenizar durante 2 minutos.
3. Agregar 1ml de reactivo de Lowry, dejar reposar por 20 min.
4. Agregar .5 ml de folín, se deja reposar por 30 min.
5. Aforar con agua destilada a 10 ml, y si es necesario centrifugar un poco.
6. Leer a 540 nm, en un espectrofotómetro Hach.

## Anexo 6

Determinación de porcentaje de lípidos.

1. Colocar 200 mg de muestra en un tubo de ensaye
2. Agregar 3 ml de metanol y 1.5 ml de cloroformo.
3. Homogenizar por 2 min, dentro de un recipiente con hielo.
4. Agregar 1.5 ml de cloroformo y homogenizar por 2 min dentro de un recipiente con hielo.
5. Centrifugar 10 min a cinco mil revoluciones por minuto.
6. Vaciar sobrenadante en embudos de separación y agregar .8 ml de agua destilada y agitar el embudo.
7. Hasta que se formen las fases, se toma la capa de abajo y se vierte en tubos de ensaye para ponerse a secar.
8. Una vez seca la muestra, se agregan .5 ml de solución de clorometanol 1:1 y se vierte en los Vidales, previamente pesados.
9. Se ponen a secar nuevamente y se pesan por ultima vez.