



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

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y RESPUESTA INMUNE DE JUVENILES DE TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*) ALIMENTADOS CON FUENTES DE PROTEÍNA DE SOYA BAJO CONDICIONES PRÁCTICAS DE CULTIVO

TESIS

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

PRESENTA:
BIÓL. ESLEBAN ARVIZU SÁNCHEZ

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

COMITÉ TUTORAL: DRA. MARÍA CRISTINA CHÁVEZ SÁNCHEZ
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

DRA. CRISANTEMA HERNÁNDEZ GONZALES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

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

MÉXICO, D. F., ENERO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

Dedicado con especial cariño a:

Mi madre

Anastacia Sánchez Sánchez

Mi padre

Raúl Arvizu

Mi hermana

Irais Arvizu Sánchez

Mi sobrina

Abigail Montiel Arvizu

Agradecimientos

Al Doctor Luis Héctor Hernández Hernández, por su paciencia y apoyo en la realización de este trabajo.

A la Doctora Leticia Verdín por sus enseñanzas sobre el mundo de la inmunología, por su tiempo y dedicación para obtener las “tediosas” electroforesis e inmunoblot.

Al M. en C. Mario Alfredo Fernández Araiza por sus valiosas enseñanzas a lo largo de mi estancia en el acuario de la FES-Iztacala.

Al Biólogo Omar Ángeles López por su apoyo, confianza y amistad.

Al compadre Biólogo Gerardo Hernández Flores por todo el apoyo y la amistad.

A cada uno de los sinodales por sus valiosos comentarios y aportaciones en esta tesis.

Índice

Introducción	1
Antecedentes	5
Objetivos	7
Material y método	8
Resultados	17
Discusión	35
Conclusiones	42
Referencias	44

Evaluación del crecimiento y respuesta inmune de juveniles de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con fuentes de proteína de soya bajo condiciones prácticas de cultivo

Introducción

La acuicultura es una de las actividades productoras de alimento que más ha crecido a nivel global y en los últimos 50 años el suministro de productos pesqueros destinados al consumo humano ha superado el crecimiento de la población mundial. Actualmente el pescado constituye una fuente esencial de alimentos nutritivos y proteínas animales para gran parte de la población. Además, el sector proporciona medios de vida e ingresos, tanto directa como indirectamente (FAO, 2012), a tal grado que la producción por esta actividad se presenta como una alternativa al incremento neto de los volúmenes de producción pesquera a nivel mundial y nacional, contribuyendo a compensar la disminución de las capturas reportadas por las flotas pesqueras en algunos países.

En el caso de México, las últimas estadísticas de CONAPESCA (CONAPESCA, 2011) indican que por su volumen, la trucha se encuentra posicionada en el lugar 17 de la producción pesquera en el país; sin embargo, por su valor se encuentra en el lugar 7. La tasa media de crecimiento anual de la producción de esta especie en los últimos 10 años es positiva (3.98%) (Figura 1).

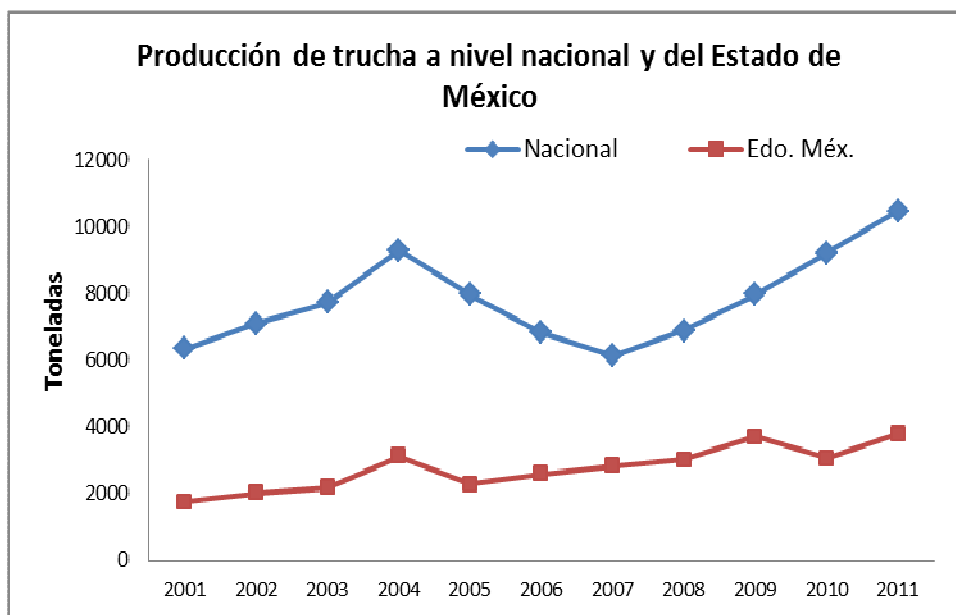


Figura 1.- Serie histórica de la producción de trucha a nivel nacional y en el estado de México (CONAPESCA, 2011).

Este crecimiento e intensificación de la acuicultura en el mundo, y particularmente en México, han sido acompañados por un aumento en la demanda de alimentos balanceados (Gatlin et al., 2007), que de acuerdo con la FAO (2006), genera los siguientes efectos en la industria y el ambiente:

- Un aumento en las capturas en el medio natural de especies pelágicas que sirven como materia prima de harina y aceite de pescado y que son los ingredientes principales de las dietas comerciales de especies carnívoras y omnívoras.
- Enriquecimiento de productos orgánicos de las aguas de los estanques de cultivo, creando sedimentos anóxicos.
- Cambios en las comunidades del bentos.
- Eutrofización de lagos y zonas costeras cercanas a la ubicación de las granjas.

Así, la acuicultura se enfrenta al reto de identificar nuevos ingredientes para sustituir harina y aceite de pescado en las dietas balanceadas comerciales. Particularmente, en el caso de la harina de pescado, se considera que los sustitutos deben de ser abundantes, baratos y que su demanda no compita con el uso humano, siendo las proteínas de origen vegetal (entre los cuales, se encuentra la harina de soya) candidatos para poder suplir a la harina de pescado en las dietas para organismos acuáticos de importancia comercial.

La harina de pescado es el ingrediente principal que brinda proteínas en el alimento para peces, pero es escaso y muy caro, particularmente en países en desarrollo, por lo cual existe una creciente demanda de fuentes alternativas de proteínas. Las leguminosas están consideradas como las fuentes de proteína vegetal más importantes, con características nutrimentales ventajosas para sustituir a la harina de pescado en dietas, a diferencia de las pesquerías, el cultivo de leguminosas prácticamente no tiene restricciones ya que su único límite sería la disponibilidad de tierra y agua en un medio ambiente propicio, elementos que se encuentran en abundancia en los trópicos, donde el clima es favorable para la agricultura casi todo el año (Olvera y Olivera, 2000).

Las semillas de cereales y leguminosas son alimentos completos; contienen simultáneamente carbohidratos, proteínas, lípidos, y algunos micronutrientes como vitaminas y minerales, disponibles para la alimentación directa e indirecta para humanos y animales, sin embargo algunas semillas, especialmente las leguminosas presentan en su composición sustancias antinutricionales. El término antinutrientes se utiliza para calificar a aquellos compuestos que afectan el valor nutricional de algunos alimentos, especialmente semillas, pues dificultan o inhiben la asimilación de nutrientes que provienen de alimentos generalmente de origen vegetal; los factores antinutricionales son sustancias naturales no fibrosas, generadas por el metabolismo secundario de las plantas como mecanismo de defensa a situaciones estresantes, llegando a generar diferentes efectos negativos, entre ellos, disminución en asimilación de alimentos y bajo crecimiento

en los organismos; entre estos factores se encuentra el fitato, particularmente presente en la harina de soya, el fitato es la forma principal de almacenamiento de fósforo en muchas plantas (por ejemplo en la soya), el cual no es asimilable para animales no rumiantes, es por ésta situación que las dietas se suplementan con fitasa, la cual es una enzima usada específicamente para hidrolizar fitato y aumentar la digestibilidad de las proteínas, ésta suplementación ha sido cada vez más utilizada en la alimentación de los peces durante las últimas dos décadas, principalmente en respuesta a la creciente preocupación por la contaminación por fósforo en el medio acuático (Cao, et al., 2007), además de fungir como probiótico, el cual estimula las defensas orgánicas en el organismo (Sajjadi y Carter, 2004).

Antecedentes

Olivia-Teles et al. (1994) obtuvieron un resultado favorable en el crecimiento y tasa de conversión alimenticia en crías de trucha arcoíris sustituyendo el 20% de harina de pescado por harina de soya.

Gomes et al. (1995) efectuaron un estudio, en donde se reemplazó hasta un 65% de la harina de pescado por harina de soya, sin observar efectos adversos en la trucha arcoíris. Sin embargo, Adelizi et al. (1998) observaron que aunque la tasa de ingestión fue igual a la observada con un alimento comercial, cuando sustituyeron completamente la harina de pescado por harina de soya el crecimiento se redujo, lo cual coincide con lo reportado por Pereira et al. (1998), que observaron un menor crecimiento de la trucha arcoíris causado por el reemplazo total de la proteína de origen animal por proteína de origen vegetal.

MCallum et al. (2000), realizaron un trabajo en el cual reportaron que una buena fuente de proteína para dietas de salmónidos es la harina de arvejón; asimismo Storebakken et al. (2000) reportaron que no hubo efecto negativo en el crecimiento al sustituir el 75% de la harina de pescado por concentrado de proteína de soya, aunado a la reducción de la excreción de fósforo, y Burrells (2001) afirma que la soya tiene un potencial indudable como fuente alternativa de proteínas en alimentos para peces.

Sajjadi y Carter (2004) encontraron que al adicionar fitasa a la dieta del salmón del Atlántico, la digestibilidad de proteína fue mejor, mientras que la adición de proteasa mejoró la digestión de proteína de harinas de alverjón y canola.

Hemre et al. (2005) observaron que el uso de harina de soya genéticamente modificada y sin modificar en la dieta de salmón del Atlántico, no modificó su crecimiento, en comparación con una dieta control con harina de pescado.

En el Laboratorio de Producción Acuícola de la FES Iztacala, se han realizado diversos trabajos relacionados con sustituciones parciales de la harina de pescado con harina de soya y harina de linaza (Cruz et al. 2008), polvo de *Spirulina* (Flores et al. 2009), sustituciones totales con combinaciones de harina de soya y polvo de *Spirulina* (Hernández et al. 2009) y sustituciones del 75 % de harina de soya suplementadas con fitasa y/o levadura (Sánchez-Ávila, 2012). En estos trabajos se reportó que el uso de las harinas de origen vegetal no afectó el crecimiento de los organismos, así mismo se redujo la excreción de fósforo y nitrógeno.

No existe información disponible sobre el efecto de las dietas en la actividad enzimática del sistema digestivo cuando se utilizan estas dietas y existen pocos reportes con respecto a la respuesta inmune: Dimes et al., en 1994 aislaron y purificaron distintas enzimas digestivas de los ciegos pilóricos de truchas alimentadas con alimento comercial, y mediante la técnica de electroforesis identificaron dos bandas correspondientes a tripsina y quimiotripsina. Rumsey et. al, en 1994, probaron diferentes dietas con alto contenido de proteína de soya, y sus resultados indicaron que en la trucha arco iris los componentes antigénicos de la proteína de soya afecta a los mecanismos no específicos de defensa inmune, el crecimiento y la utilización de proteínas. Burrells et al. (1999) reportaron que la sustitución de más del 30% de harina de soya causó un efecto negativo en la respuesta inmune de juveniles de trucha arco iris. Por otro lado, Escaffre et al. reportaron en 2007 que el uso de concentrado de proteína de harina de soya como sustituto total de la harina de pescado en las dietas de juveniles de trucha arcoíris no es causa de reacción inflamatoria del intestino y no afecta su morfología.

Hidalgo et al. en 2007 reportaron que los peces omnívoros presentan una actividad más alta de la enzima alfa-amilasa con respecto a los peces carnívoros, encontrándose la menor actividad de esta enzima en trucha arcoíris.

Kim y Austin en 2005 encontraron que el uso de probióticos en dietas de trucha arcoíris promueve el incremento en la actividad fagocítica de los macrófagos presentes en el riñón, así como un aumento en la concentración de lisozima en plasma sanguíneo, coincidiendo con Sealey et al. (2009) los cuales reportaron que cuando se utilizan altos niveles de inclusión de harina de soya en la dieta de juveniles de trucha arcoíris, el uso de probióticos puede ayudar a mejorar la respuesta inmune.

Objetivo general

Determinar el crecimiento, las respuestas inmunológicas y la excreción de P y N de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentada con una dieta con alto contenido de proteína de harina de soya condiciones prácticas de cultivo.

Objetivos particulares

Determinar el efecto de la dieta con alto contenido de proteína de harina de soya (75 %) sobre el crecimiento de trucha arco iris.

Determinar el efecto de la dieta con alto contenido de proteína de harina de soya (75 %) sobre la excreción de P y N de trucha arco iris.

Determinar el efecto de la dieta con alto contenido de proteína de harina de soya (75 %) sobre algunas respuestas inmunológicas no específicas.

Determinar la eficacia de las dietas experimentales en el crecimiento de trucha arco iris, comparado con la dieta comercial bajo condiciones prácticas de cultivo.

Material y métodos

Se realizó una prueba de alimentación con las dietas experimentales por 175 días en una granja trutícola ubicada en el Estado de México, donde se registraron los patrones de crecimiento y algunos parámetros inmunológicos, posteriormente se realizó una prueba para determinar la excreción de fósforo y nitrógeno en condiciones de laboratorio al alimentar los organismos con las dietas experimentales por 60 días, y finalmente se procedió a realizar una inmunodetección de tres enzimas digestivas (Tripsina, Quimiotripsina y α -amilasa) en el tracto intestinal de juveniles de trucha que fueron alimentados por 60 días con dietas con alto contenido de harina vegetal.

Preparación de la dietas

Para la preparación de las dietas, además de las harinas de pescado y de soya, se utilizaron aceite de hígado de bacalao, lecitina de soya (fuente de lípidos), una mezcla de vitaminas y minerales, dextrina (fuente de carbohidratos), gluten (aglutinante) y α -celulosa (para llevar la dieta a 100%). Todos estos ingredientes se agregaron en las cantidades necesarias para cumplir con los requerimientos nutricionales, siendo preparadas tres dietas de acuerdo a Hernández-Hernández et al. (2004), la primera fue suplementada con fitasa y levadura, la segunda con levadura y la tercera con fitasa, con la finalidad de observar las diferencias entre estas dietas sobre el crecimiento y sobre algunas respuestas inmunológicas no específicas.

Tabla 1. Formulaciones con sustituciones parciales de la harina de pescado con harina de soya y adición de fitasa y/o levadura (como probiótico).

g / kg	Dieta 1 (E1)	Dieta 2 (E2)	Dieta 3 (E3)	Control
Harina de soya	400	400	400	Alimento comercial
Harina de pescado	200	200	200	
Fitasa	0.4	0	0.4	
Levadura viva	15	15	0	
Aceite hígado de bacalao	50	50	50	
Lecitina de soya	50	50	50	
Vitaminas y minerales	40	40	40	
Dextrina	50	50	50	
Gluten	50	50	50	
Alfa-celulosa	144.6	145	159.6	
Proteína total	82.22 %	77.71 %	64.32 %	
Lípido total	6.83 %	10.01 %	11.83 %	7.67 %
Fosforo total (mg/g)	103.8	104.4	108.1	137.9

Experimento 1:

Los juveniles de trucha arcoiris fueron obtenidos de la granja acuícola EL Zarco, ubicada en el municipio de Ocoyoacac, Estado de México.

Trabajo de campo

La prueba de alimentación con las dietas de la Tabla 1 bajo condiciones prácticas de cultivo se realizó en la granja “los Alevines” ubicada en el municipio de Amanalco de Becerra, Estado de México, el cual se ubica entre las coordenadas geográficas: 19° 18´ y 19° 10´ de latitud norte, y 99° 54´ y 100° 05´ de longitud oeste a una altitud de 2,320 m.s.n.m,

Se usaron 12 tinas de fibra de vidrio de 1,000 L (tres tanques por dieta) por un periodo de 75 días (primera etapa), y posteriormente, los peces se transfirieron a 3 estanques circulares de concreto de aproximadamente 5,000 L por un periodo de 90 días (segunda etapa). En los primeros 75 días, las dietas se suministraron a tres grupos de 65 juveniles de trucha arco iris por tina, con peso medio de 2.8 ± 0.1 gramos, los cuales fueron alimentados con una ración diaria al 7 % de la biomasa total dividida en dos porciones, (mañana y tarde). Al finalizar este primer periodo de 75 días, se decidió alimentar a los organismos solamente con las dietas 1 y 2 (Tabla 2) debido a que fueron las que arrojaron mejores resultados en cuanto a crecimiento; 200 peces de cada tratamiento, aunado el control, se desdoblaron a estanques de concreto de 10 metros de diámetro, con un peso promedio de 12.78 ± 1.6 gramos. La ración diaria fue equivalente al 5% de la biomasa total suministrada en dos porciones, en la mañana y tarde.

Cada 15 días se realizaron biometrías, con un muestro aleatorio de 30 organismos por tina con el fin de determinar su longitud total, longitud patrón, ancho y peso (Figura A) y recalcular la ración de alimento de acuerdo al nuevo peso promedio durante los primeros 75 días, posteriormente se realizó el mismo procedimiento

(biometría), usando 75 organismos de cada tratamiento durante los días en que se mantuvieron los organismos en estanques circulares de concreto.

A lo largo de los primeros 75 días, después de 30 minutos del suministro, se colectó el alimento remanente y las heces de cada tina de fibra de vidrio, posteriormente se determinó la cantidad de fósforo y de proteína por medio de los métodos de fósforo total (Method 10127, molybdovanadato con digestión con persulfato ácido. Adaptado de Standard Method for the Examination of Water and Wastewater) y el método de Lowry respectivamente, contenidas en las heces, este procedimiento no pudo realizarse en la segunda etapa, debido a la estructura de los estanques de concreto.

Al término de los primeros 75 días se tomaron tres individuos de cada tratamiento y se sacrificaron para la obtención de muestras para la determinación de la respuesta inmune.

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

Peso final (g)

Ganancia en peso [GP = ((peso final – peso inicial) /peso inicial) x 100]

Tasa de crecimiento específico [TCE = ((ln peso final – ln peso inicial)/tiempo de alimentación) x 100]

Tasa de eficiencia de la dieta [TED = ganancia en peso (g)/total de dieta ingerida en base seca (g)]

Tasa de eficiencia de la proteína [TEP = ganancia en peso (g)/total de proteína ingerida en base seca (g)]

Factor de condición o índice de Fulton [$F = 100 W / L^3$]

F = Factor de condición

W = Peso del pez (g)

L = Longitud del pez (cm). El cubo de la longitud es usado porque el crecimiento en longitud de los salmónidos es proporcional al crecimiento en volumen (Barnham y Baxter, 1998)

Cada quince días se tomaron muestras de agua de los efluentes de los tanques y estanques para determinar la concentración de fósforo (Method 10127, molybdovanadato con digestión con persulfato ácido. Adaptado de Standard Method for the Examination of Water and Wastewater)) y nitrógeno amoniacal (Método 8038. Método Nessler. Adaptación de Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater) respectivamente en las aguas de desecho.

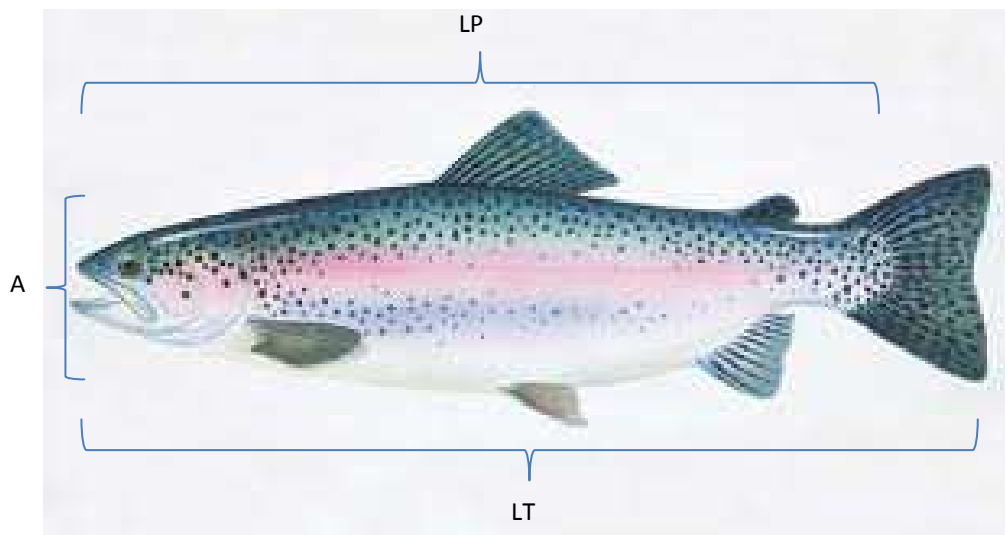


Figura A.- Parámetros considerados durante las biometrías a lo largo del trabajo de campo, longitud total (LT), longitud patrón (LP), ancho(A) y peso.

Respuesta inmunológica.

Las muestras de moco de la piel y de sangre se sometieron a un análisis de contenido de proteína, así como a una prueba de actividad de lisozima. Las muestras de moco se tomaron de acuerdo a Yokoyama et al. (2006) con un hisopo estéril, considerando un área de 1 cm² delimitada con un plástico en la superficie del cuerpo. Justo después de tomarla, la muestra se suspendió en 1 mL de solución buffer salina fosfatada (PSB, pH= 7.2). Las muestras se centrifugaron (7,000 rpm, 10 min, temperatura ambiental) y se colectó el sobrenadante. Las muestras de sangre se colectaron de la vena caudal con una jeringa y se dejaron coagular a 4 °C por tres horas. Transcurrido este periodo, las muestras se centrifugaron a 7000 rpm por 10 min y se colectó el sobrenadante (suero). En ambos casos, el contenido de proteína se determinó por la técnica de Lowry con un kit comercial (Sigma Diagnostics, MO, EUA).

Para la determinación de actividad de la lisozima, se utilizó la técnica descrita por Taoka et al. (2006), las muestras de suero, se mezclaron con una suspensión acuosa de *Micrococcus lysodeikticus* (células liofilizadas, Sigma-Aldrich Chemical, MO, EUA) y se incubaron a 25 °C, la absorbancia se midió a 530 nm después de 0.5, 4.5 y 20 min. La actividad de la lisozima se expresó como unidades de actividad de la lisozima (U), una unidad es definida como la cantidad de enzima que causa un decremento en la absorbancia de 0.001 por mg de proteína por minuto.

Para determinar la actividad respiratoria “explosiva” de los macrófagos del riñón, los riñones disectados se colocaron en medio Leibovitz L-15 suplementado con 0.1% de suero fetal bovino (Burrells et al. 1999). Los macrófagos fueron aislados y cultivados por 3 días y su actividad se determinó con la reducción del colorante azul nitrotetrazolium (NBT) como lo describen Chung y Secombes (1988), en el cual los macrófagos fueron cubiertos con 100µl de 1 mg/ml NBT (Sigma) en medio Leibovitz L-15 por 24 horas a una temperatura de 18-20°C.

Experimento 2: Fluctuaciones en la excreción de fósforo y en suero sanguíneo

Se alimentaron por triplicado durante 60 días grupos de 20 juveniles con un peso inicial de 1.8 ± 0.5 g con las dietas experimentales descritas anteriormente (Tabla 1), que se suministraron a las 8:00 am y 4:00 pm. Este experimento se realizó en tanques de plástico de 100 L de capacidad, utilizando alimento comercial como control. Al día 30 se determinó la concentración de fósforo en el agua (Method 10127, molybdovanadato con digestión con persulfato ácido. Adaptado de Standard Method for the Examination of Water and Wastewater) cada 2 horas durante 18 horas y al día 60 cada 2 horas por 8 horas, así mismo se midió el contenido de fósforo en el suero sanguíneo de los peces en el día 60.

Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos fueron evaluados con una ANOVA de una sola variable. Las diferencias entre los tratamientos se identificaron con una prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1980), con un nivel de $P < 0.05$.

Experimento 3: Inmunodetección de enzimas digestivas en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)

Los juveniles, se dividieron en grupos de 20 organismos y con un peso inicial de 21.63 ± 1.8 g y fueron alimentados dos veces al día con horarios de alimentación de 8:00 y 16:00 horas. El experimento duró 60 días y se realizó en tanques de plástico de 100 L de capacidad, con las formulaciones descritas anteriormente y alimento comercial para el grupo control.

Al día cero y cada 30 días se realizó la disección del tracto digestivo de diez organismos de cada tratamiento. Los ciegos pilóricos y la primera parte del intestino se maceraron y solubilizaron con amortiguador de lisis (HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón), se incubaron por 30 minutos en hielo, se centrifugaron (10 minutos a 10000 rpm) y se recuperó el sobrenadante que se almacenó a -70°C hasta su uso.

Electroforesis

Con las muestras obtenidas se procedió a realizar la electroforesis utilizando un gel de poliacrilamida al 12 %, el cual se colocó en una cámara para electroforesis, conectada a una fuente de poder a 120 Volts por un tiempo aproximado de 120 minutos, utilizándose un marcador de peso molecular marca Fermentas y otro de la marca Bio-Rad, el gel se dejó en tinción con azul de Coomassie por 40 minutos aproximadamente, una vez teñido, se colocó en solución desteñidora por 60 minutos.

Transferencia de geles

Para la transferencia de geles a membrana de PVDF, se utilizó una cámara de transferencia, conectada a una fuente de poder a 100 Volts por una hora, manteniéndose en amortiguador de transferencia a 4°C , una vez terminado el

proceso, el papel fue teñido con rojo Ponceau con la finalidad de observar las bandas transferidas y desteñido posteriormente con agua destilada para la realización de la inmunodetección.

Inmunoblot

Se bloqueó la membrana de PVDF con leche descremada al 6% en PBS-Tween (0.05%) por 60 minutos a temperatura ambiente y se lavó con PBS-Tween (5 veces por 5 minutos cada lavado), posteriormente se adicionaron los anticuerpos anti tripsina de conejo (Abcam, USA) y el anticuerpo anti Alfa-amilasa de conejo (Abcam, USA), ambos en una concentración de 1:500 diluidos en PBS-Tween, por 24 horas a 4° C. después de su lavado se adicionó el anticuerpo secundario anti conejo peroxidado (Santa Cruz Ca, USA) en concentración 1:1000 diluido en PBS-Tween, dejándolo incubar por 60 minutos a temperatura ambiente, posteriormente fue lavado y se reveló con Western blotting luminol Reagent (sc-2048 Santa Cruz Biotech. USA) en película radiográfica.

Este mismo procedimiento se realizó para la detección de la Quimiotripsina, utilizándose anti Quimiotripsina de conejo (Abcam, USA), en una concentración de 1:1000 diluido en PBS-Tween.

Resultados

En la Figura 2 se observa el crecimiento de los organismos en la etapa que abarcó un periodo de 75 días mostrando un ligero incremento en crecimiento los juveniles alimentados con la dieta E2 (levadura), posteriormente en la etapa de alimentación en que los organismos se mantuvieron estanques de concreto, que duró un periodo de 95 días (Figura 3), los organismos de la dieta control fueron los que alcanzaron un mayor crecimiento.

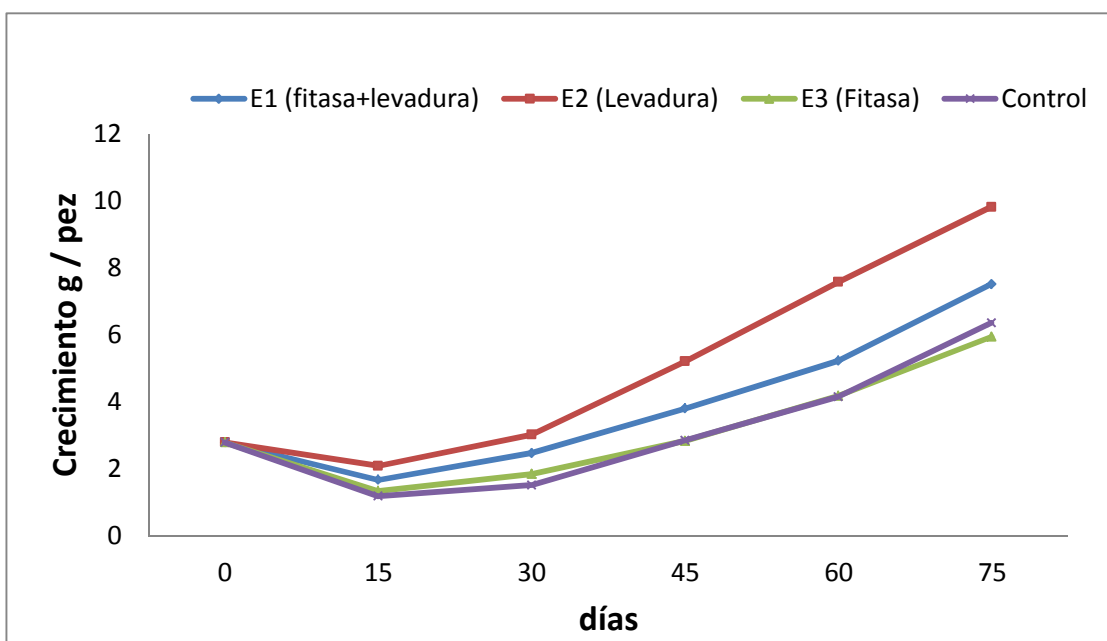


Figura 2.- Crecimiento de los organismos durante 75 días (primera etapa) alimentados en tinas de fibra de vidrio.

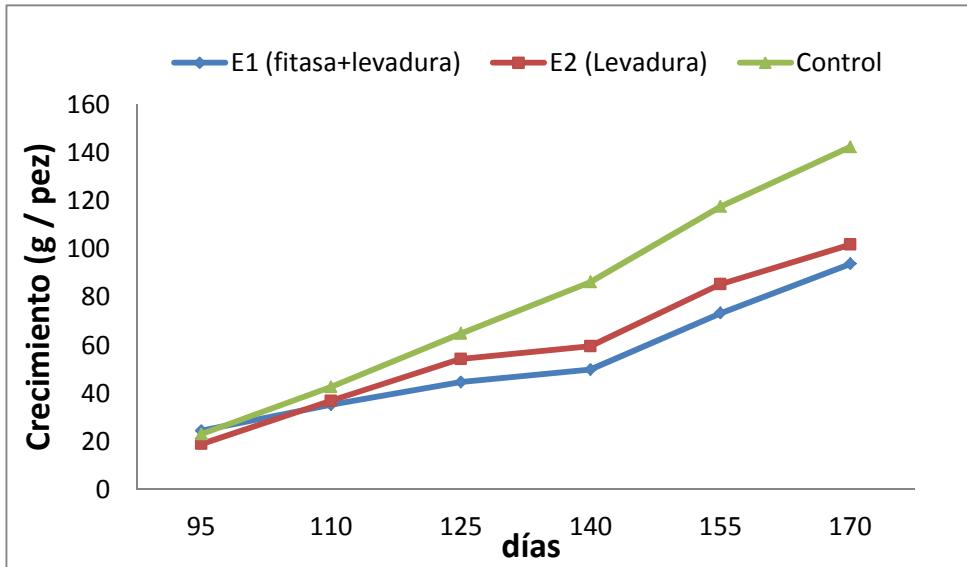


Figura 3.- Crecimiento de los organismos durante 90 días (segunda etapa) alimentados en estanques de concreto.

Durante la etapa de alimentación en las tinas de fibra de vidrio (Tabla 2), los valores de ganancia en peso, tasa específica de crecimiento, tasa de conversión de alimento, tasa de eficiencia de la dieta y de la proteína no presentan diferencias significativas entre tratamientos, mientras que en la etapa de alimentación en los estanques de concreto, la dieta control presentó valores más altos en los parámetros de crecimiento mencionados anteriormente, (Tabla 3) existiendo diferencias significativas con las dietas experimentales.

Tabla 2.- Ganancia en peso (GP), Tasa específica de crecimiento (TEC), Tasa de Conversión de Alimento (TCA), Tasa de Eficiencia de la Dieta (TED) y Tasa de Eficiencia de la Proteína (TEP) en organismos alimentados por 75 días en tinas de fibra de vidrio, mostrándose los datos promedio \pm desviación estándar.

Tratamiento	GP (%)	TEC (% / día)	TCA	TED	TEP
E1(fitasa+levadura)	480.71 \pm 28.96	2.34 \pm 0.06	1.01 \pm 0.09	1.07 \pm 0.36	2.05 \pm 0.12
E2 (Levadura)	513.17 \pm 35.04	2.41 \pm 0.07	1.07 \pm 0.01	1.02 \pm 0.43	1.54 \pm 0.05
E3 (Fitasa)	446.19 \pm 84.43	2.23 \pm 0.20	1.05 \pm 0.33	1.10 \pm 0.42	1.71 \pm 0.15
Control	396.82 \pm 38.01	2.12 \pm 0.10	0.98 \pm 0.18	0.81 \pm 0.71	1.88 \pm 0.49

Tabla 3.- Ganancia en peso (GP), Tasa específica de crecimiento (TEC), Tasa de Conversión de Alimento (TCA), Tasa de Eficiencia de la Dieta (TED) y Tasa de Eficiencia de la Proteína (TEP) en organismos alimentados por 90 días en estanques de concreto, mostrándose los datos promedio \pm desviación estándar.

Tratamiento	GP (%)	TEC (% / día)	TCA	TED	TEP
E1(fitasa+levadura)	627.22 \pm 47.25 ^a	2.199 \pm 0.08 ^a	0.92 \pm 0.14 ^a	0.66 \pm 0.11 ^a	1.27 \pm 0.63 ^a
E2 (Levadura)	701.84 \pm 69.21 ^a	2.303 \pm 0.09 ^a	0.98 \pm 0.17 ^a	0.74 \pm 0.16 ^a	1.09 \pm 0.60 ^a
Control	1039.75 \pm 115.19 ^b	4.898 \pm 0.12 ^b	0.62 \pm 0.75 ^b	1.39 \pm 0.96 ^b	1.79 \pm 0.85 ^b

Existen diferencias significativas entre los organismos alimentados con las dietas experimentales E1 (fitasa+levadura) y E2 (levadura) en el porcentaje de proteína en moco (Figura 8); para el suero sanguíneo, existen diferencias significativas entre la dieta control y los alimentos con sustituciones de 75% de harina de soya en la primera etapa de alimentación (Figura 9) y en los noventa días restantes (segunda etapa, Figura 10).

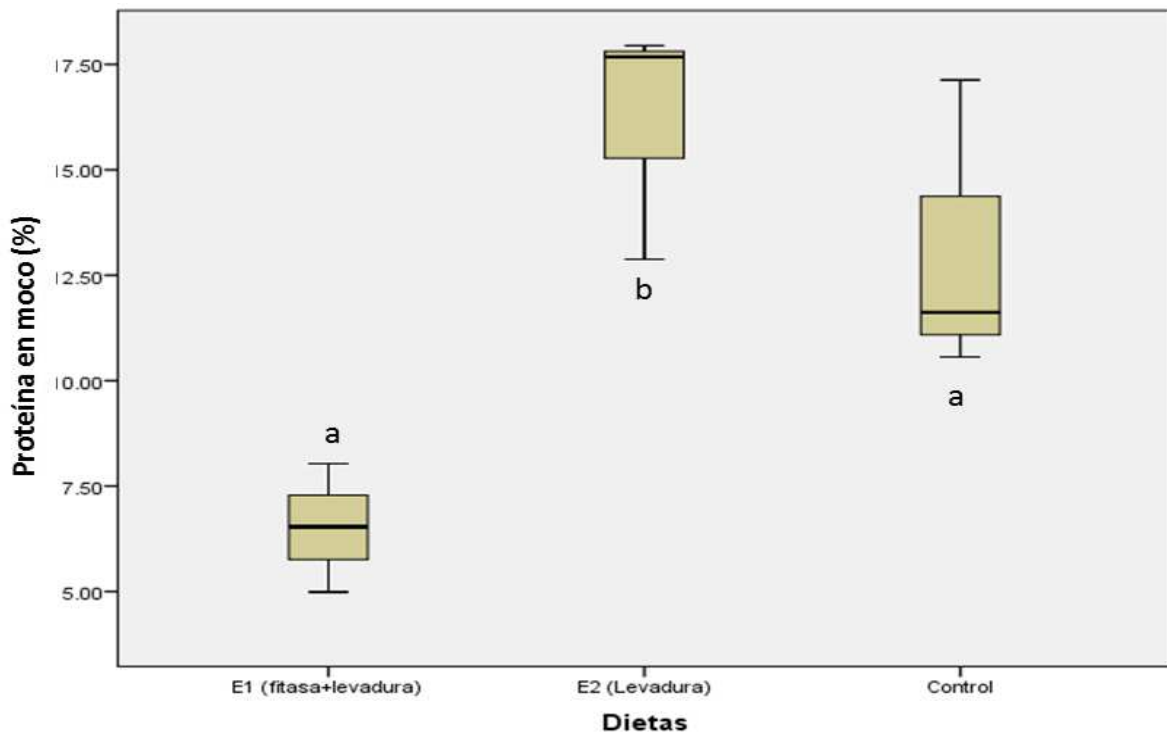


Figura 8.-. Proteína en moco de los organismos alimentados en estanques de concreto durante 90 días (segunda etapa).

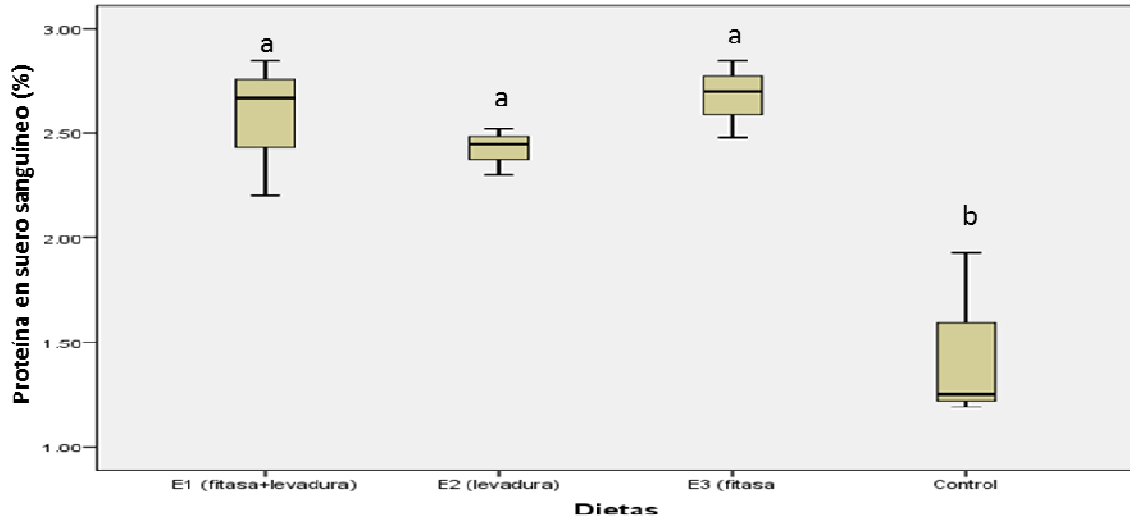


Figura 9.- Proteína en suero sanguíneo de los organismos alimentados en tinas de fibra de vidrio (primera etapa).

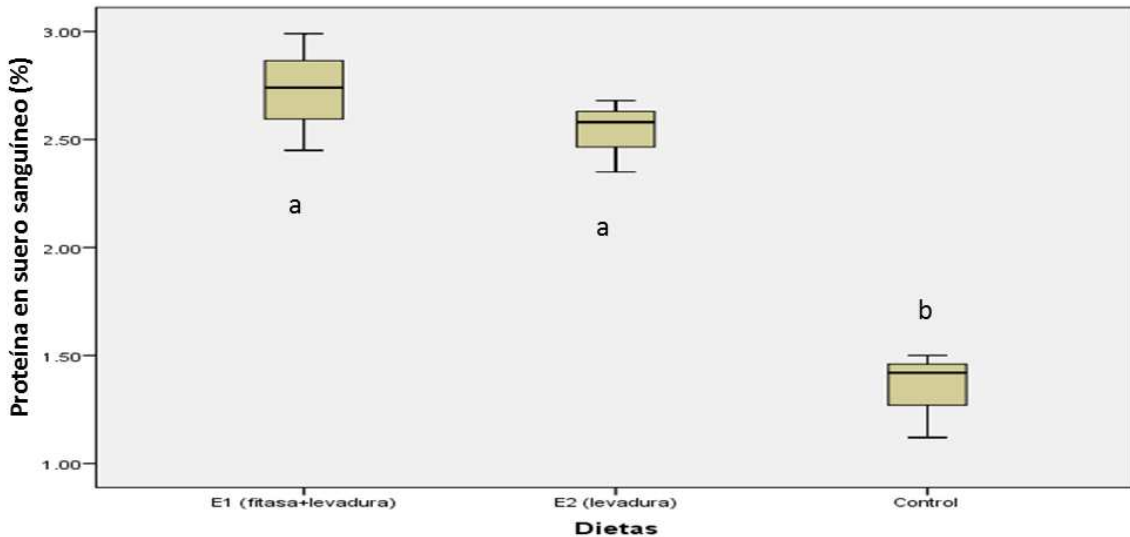


Figura 10.- Proteína en suero sanguíneo de los organismos alimentados en estanques de concreto (segunda etapa).

Para la actividad de los macrófagos no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos durante la primera y segunda etapa (Figura 11 y 12).

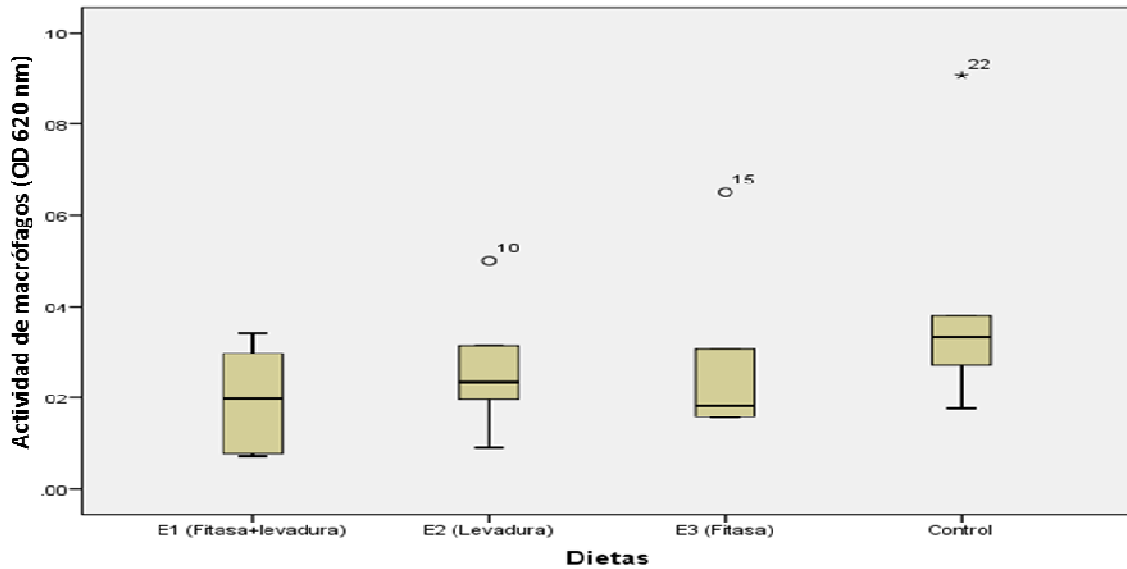


Figura 11.- Actividad de los macrófagos en los organismos alimentados en tinas de fibra de vidrio (primera etapa). Los valores, indicados por puntos, por encima del bigote superior se consideran valores atípicos.

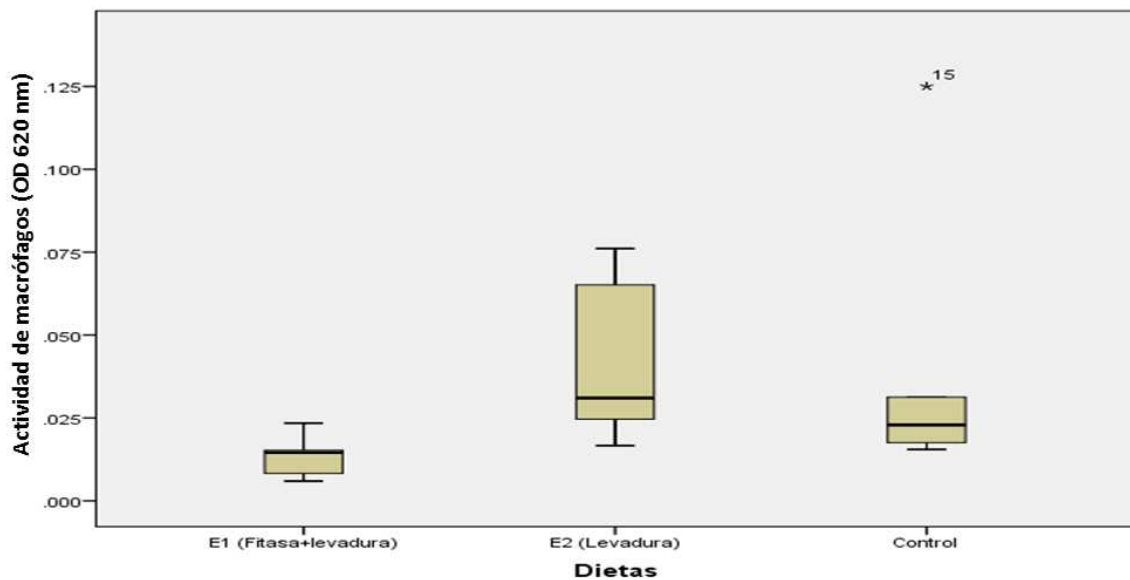


Figura 12.- Actividad de los macrófagos en los organismos alimentados en estanques de concreto (segunda etapa). Los valores, indicados por puntos, por encima del bigote superior se consideran valores atípicos.

No existen diferencias significativas (Figura 13) entre tratamientos en la carga de Fósforo en las heces durante la primera etapa en las tinas de fibra de vidrio.

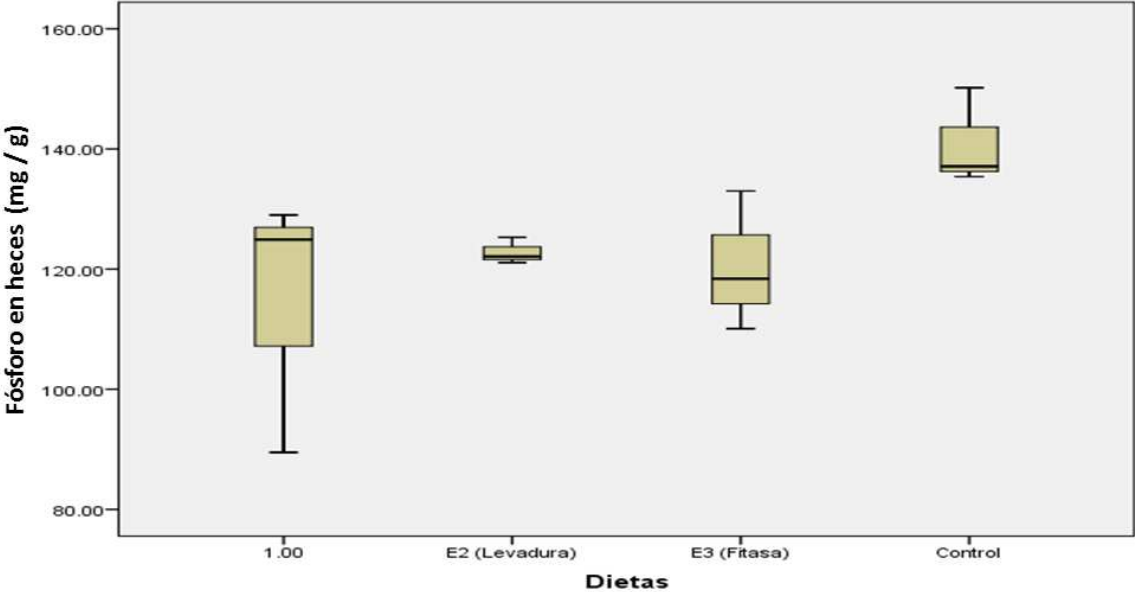


Figura 13.- Fósforo contenido en heces de los organismos alimentados en tinas de fibra de vidrio (primera etapa).

Durante la primera etapa de alimentación (Figura 14) se puede observar en los tratamientos un factor de condición (K) que se mantiene entre 1 y 1.1, mientras que en la segunda etapa (Figura 15) el factor de condición (K) de todos los tratamientos es mayor a 1, alcanzando valores cercanos a 1.4 durante los últimos días de alimentación.

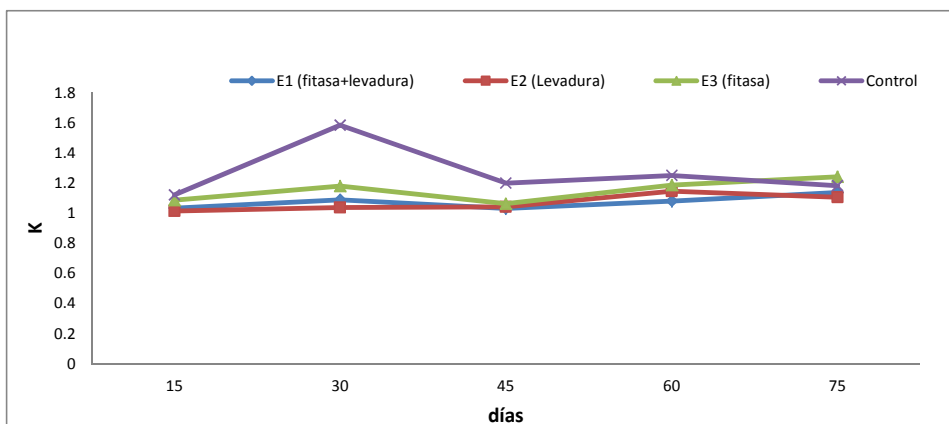


Figura 14.- Factor de condición (K) de los organismos alimentados en tinas de fibra de vidrio (primera etapa).

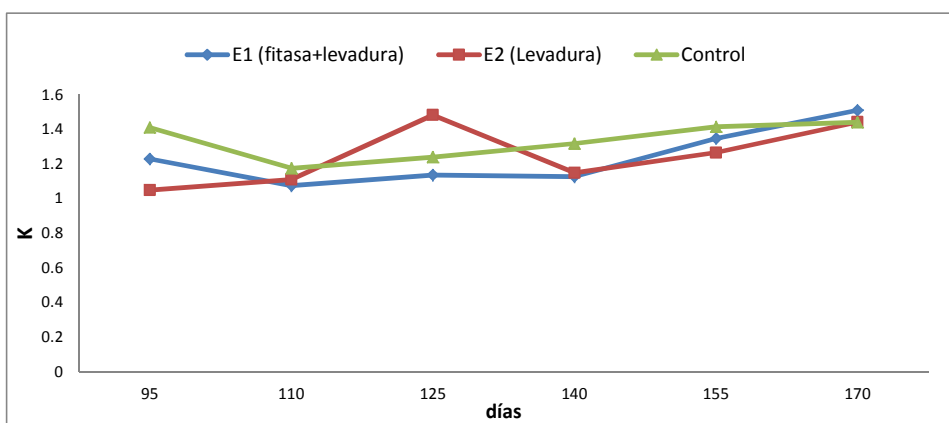


Figura 15.- Factor de condición (K) de los organismos alimentados en estanques de concreto (segunda etapa).

En la Figura 16 se observan bajos valores de nitrógeno contenido en las aguas de desecho hasta el día 45, existiendo un incremento en los valores a partir del día 60, no presentándose diferencias significativas entre tratamientos, al igual que la cantidad de fósforo contenido en agua de desecho en la primera etapa (Figura 17).

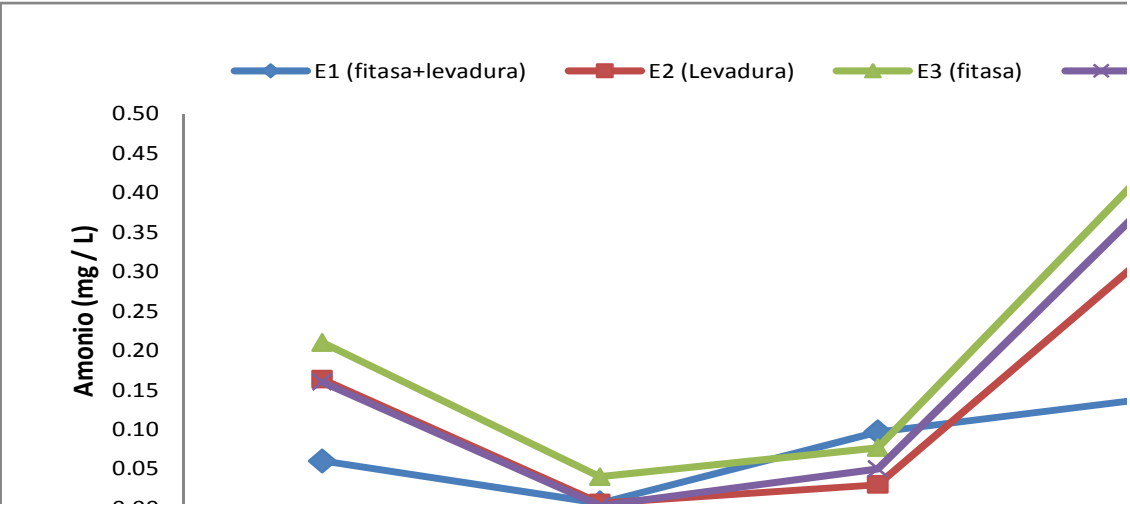


Figura 16.- Amonio (NH4) contenido en agua residual en tinas de fibra de vidrio (primera etapa).

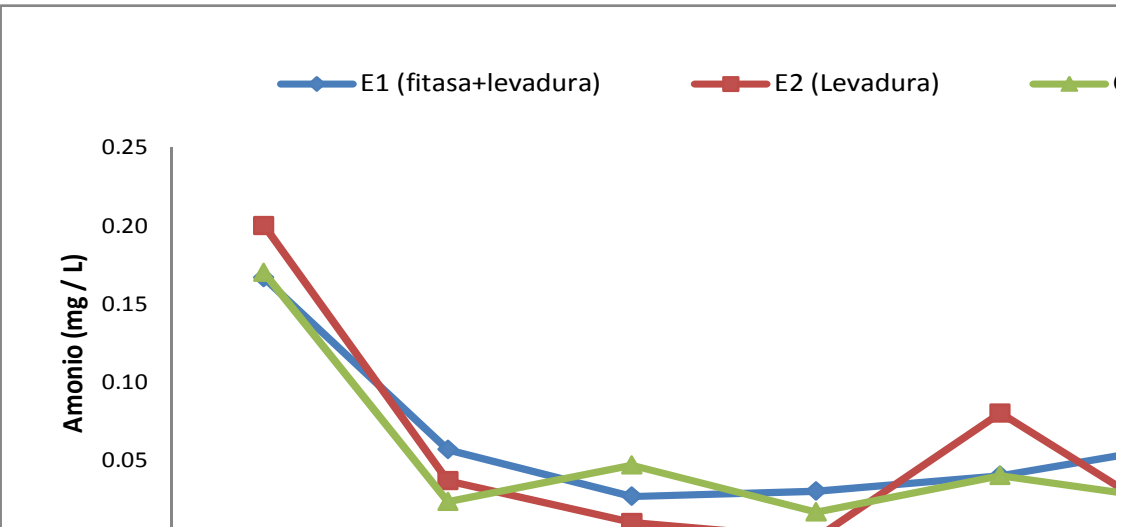


Figura 17.- Amonio (NH4) contenido en agua residual en estanques de concreto (segunda etapa).

En la etapa de alimentación en los estanques de concreto no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos en la cantidad de nitrógeno y fósforo contenido en agua de desecho sin embargo se observa una disminución en los valores de nitrógeno y fósforo contenido en agua de desecho a partir del día 95, cabe mencionar que a partir de esta fecha inició la temporada de lluvias en la zona de trabajo, en la cual los organismos se encontraban a la intemperie en los estanques de concreto, por lo cual es probable que la lluvia haya contribuido a la disminución de estos valores.

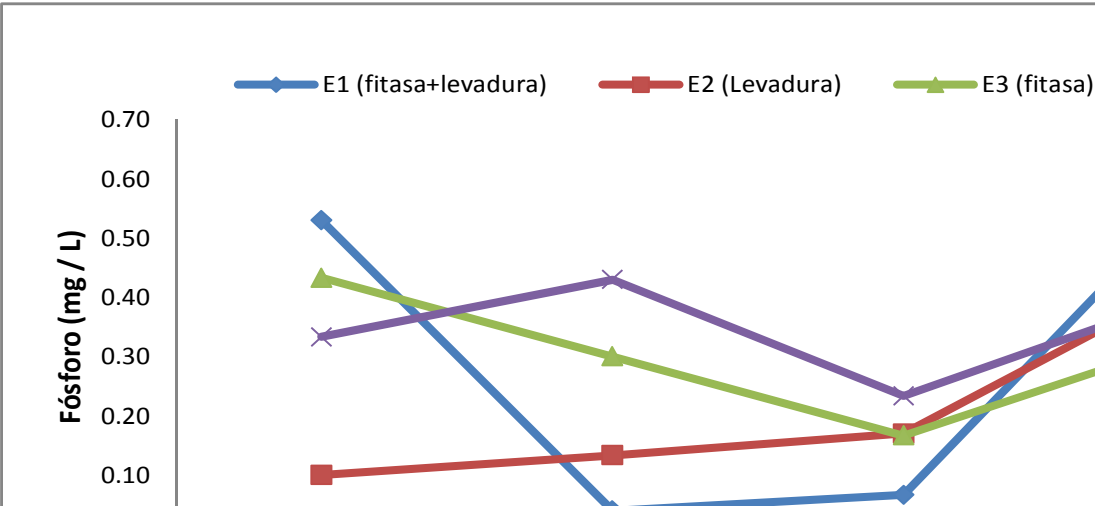


Figura 18.- Fósforo contenido en agua residual en tinas de fibra de vidrio (primera etapa).

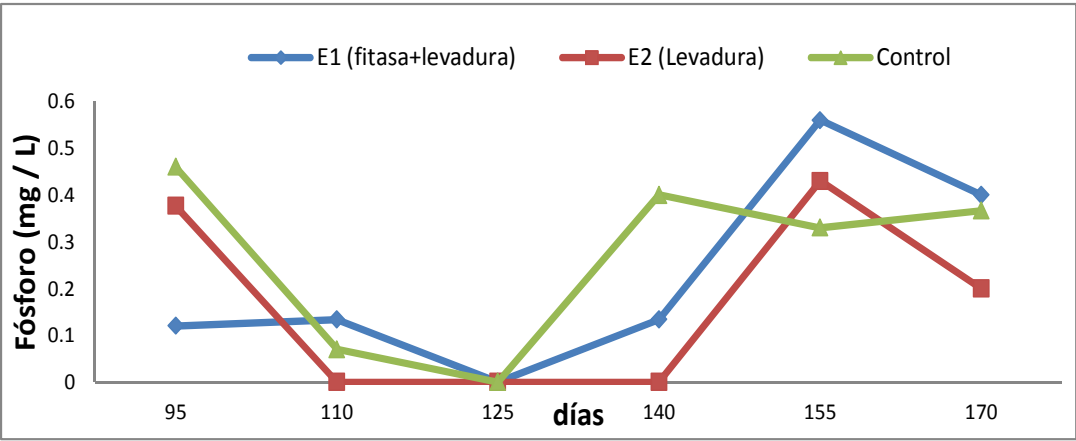


Figura 19.- Fósforo contenido en agua residual en estanques de concreto (segunda etapa)

Los valores de lisozima presentaron diferencias significativas entre el control y las dietas experimentales en la primera y segunda etapa (Figura 20).

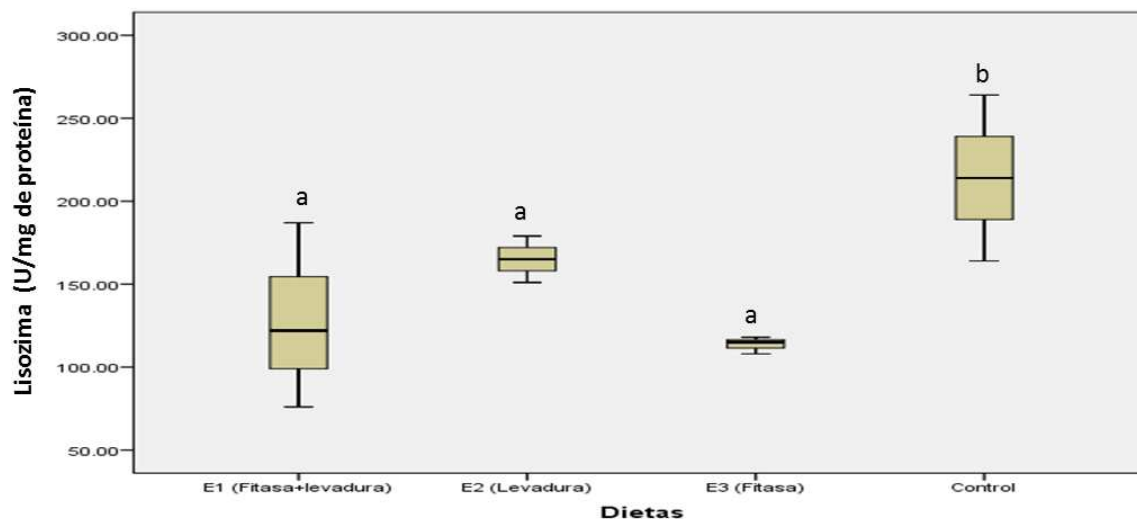


Figura 20.- Lisozima en suero sanguíneo en organismos alimentados en tinas de fibra de vidrio.

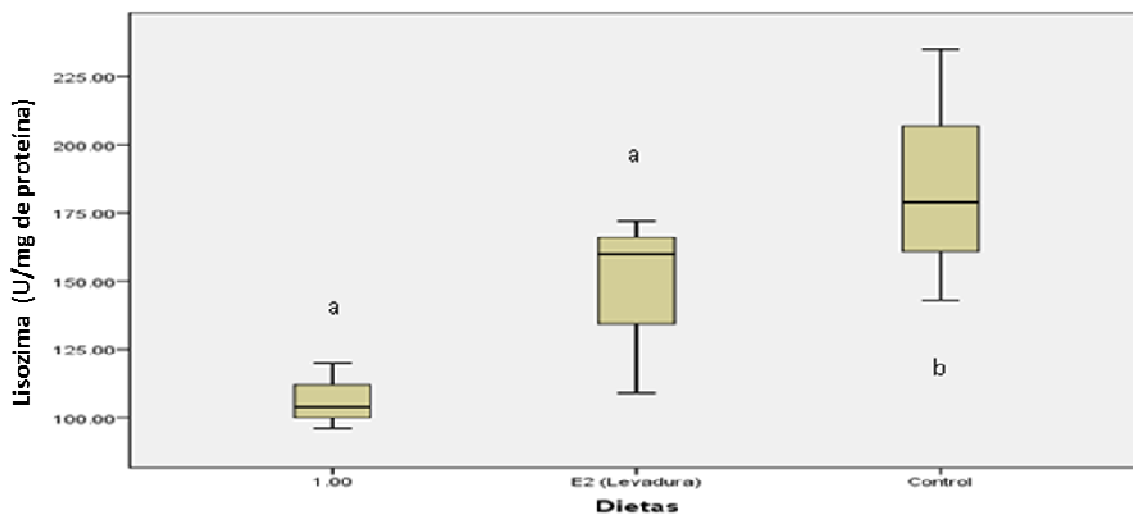


Figura 21.- Lisozima en suero sanguíneo en organismos alimentados en estanques de concreto.

El porcentaje de supervivencia se basó en la mortandad por depredadores existentes a los alrededores de la zona (Tabla 4).

Tabla 4.- Supervivencia de los organismos durante las etapas de alimentación en tinas de fibra de vidrio y estanques de concreto.

Supervivencia (%)				
	E1 (fitasa+levadura)	E2 (Levadura)	E3 (Fitasa)	Control
Etapas de alimentación en tinas de fibra de vidrio.	80±5.56	79±3.05	86±5.58	78±4.05
Etapas de alimentación en estanques de concreto.	80	82	---	50

Resultados experimento 2: Fluctuaciones en la excreción de fósforo y en suero sanguíneo

En la Figura 22 se puede observar un incremento del fósforo excedente en la dieta que es excretado por los organismos en el día 30 a las dos horas posteriores a los periodos de alimentación (8:00 am y 16:00 pm), presentándose diferencias significativas entre tratamientos experimentales y el control.

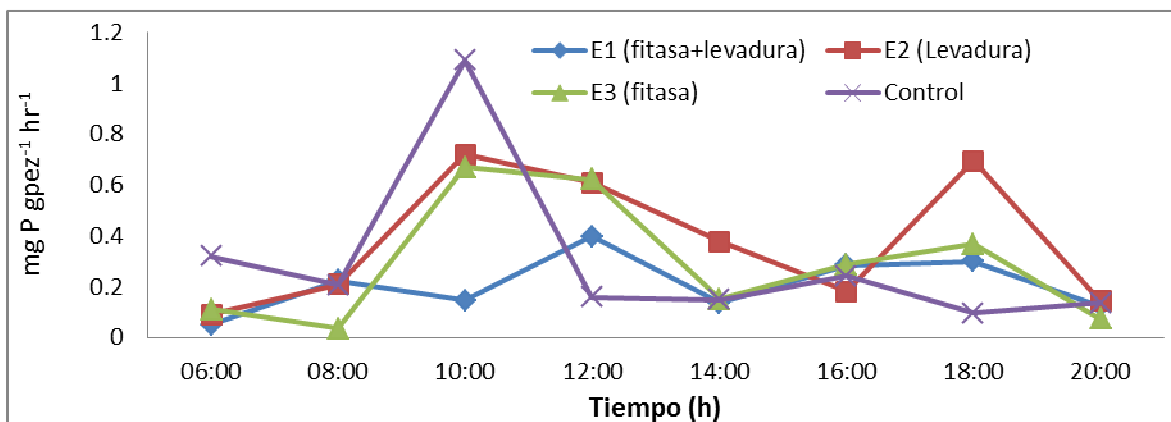


Figura 22.- Fósforo excedente en dieta y excretado al día 30 medido cada 2 horas con un inicio de 6:00 am a 20:00 pm, con horarios de alimentación a las 8:00 am y a 16:00 pm.

Al día 60 se puede observar un incremento del fósforo excedente en dieta y excretado a las dos y cuatro horas posteriores al periodo de alimentación (8:00 am) no presentándose diferencias significativas entre tratamientos (Figura 23).

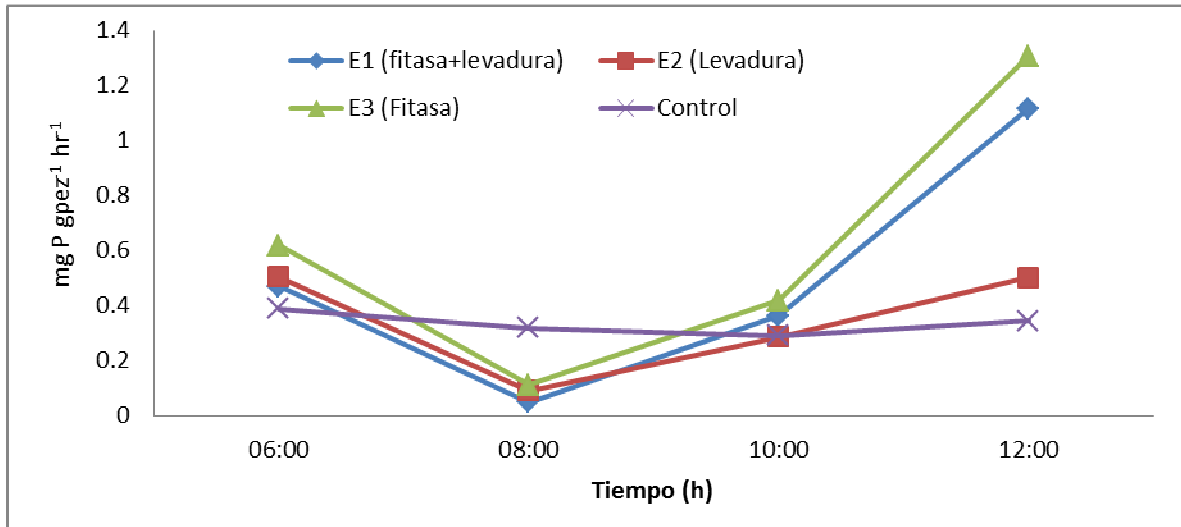


Figura 23.- Fósforo excedente en dieta y excretado al día 60 medido cada 2 horas con un inicio de 6:00 am a 12:00 pm, con horario de alimentación a las 8:00 am.

En la Figura 24 se pueden observar altos valores del fósforo contenido en suero sanguíneo durante el periodo de alimentación (8:00 am), a las dos horas después de ser alimentados, los valores disminuyen considerablemente con una tendencia a aumentar ligeramente transcurridas dos horas más, se presentaron diferencias significativas en el contenido de fósforo en suero de los organismos alimentados con las dietas experimentales con respecto al grupo control.

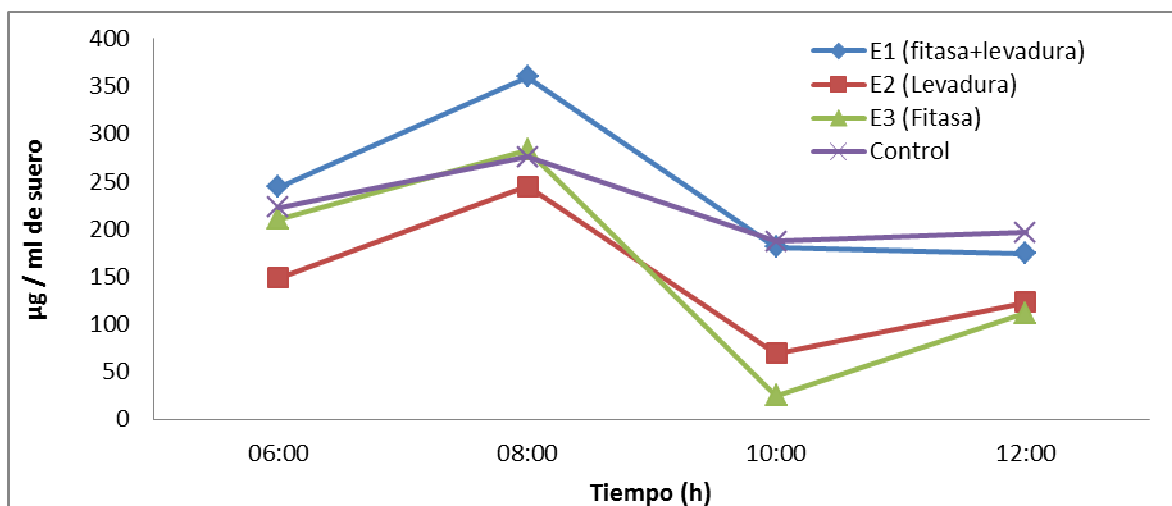


Figura 24 - Fósforo en suero sanguíneo al día 60 medido cada 2 horas con un inicio de 6:00 am a 12:00 pm, con horario de alimentación a las 8:00 am.

Resultados experimento 3: Inmunodetección de enzimas digestivas en trucha arcoiris (iris (*Oncorhynchus mykiss*))

La separación proteica de los lisados intestinales indica la probable presencia de las enzimas digestivas que participan en la digestión y al parecer se presentó una modificación de su presencia con la variación de las dietas. En la Figura 25 se puede observar la presencia de bandas correspondientes a distintas proteínas con diferente peso molecular del tracto digestivo, dentro de las cuales podemos inferir la presencia de la banda correspondiente a la tripsina con un peso molecular de 25 kDa en todos los tratamientos, tanto en el tiempo cero, como a los 30 y 60 días de alimentación, este mismo caso se presenta para la banda de 55 kDa, la cual corresponde a la Alfa-amilasa, siendo más notorias las bandas en los tratamientos a los 60 días de alimentación.

Es importante destacar que la presencia de las bandas con diferente peso molecular en el gel de poliacrilamida al 12% nos indica que el extracto de los tractos digestivos de los organismos de los distintos tratamientos se realizó correctamente.

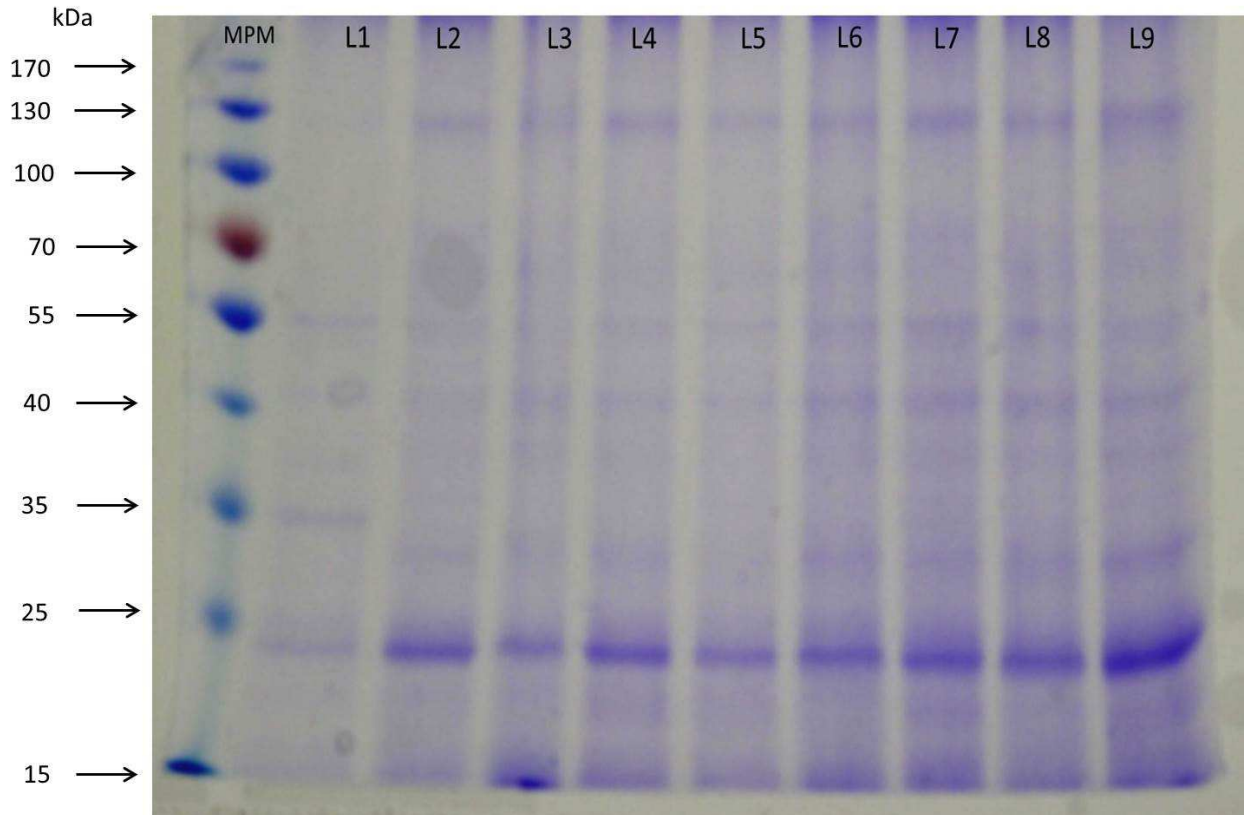


Figura 25.- Electroforesis del tracto digestivo (ciegos pilóricos y primera parte del intestino) de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con diferentes dietas experimentales. MPM.- Marcador de Peso Molecular marca Fermentas, L1.- Alimentación en tiempo cero, L2.- Dieta experimental E1 (fitasa+levadura) a los 30 días de alimentación, L3.- Dieta experimental E2 (levadura) a los 30 días de alimentación, L4.- Dieta experimental E3 (fitasa) a los 30 días de alimentación, L5.- Alimento comercial a los 30 días de alimentación, L6.- Dieta experimental E1 (fitasa+levadura) a los 60 días de alimentación, L7.- Dieta experimental E2 (levadura) a los 60 días de alimentación, L8.- Dieta experimental E3 (fitasa) a los 60 días de alimentación, L9.- Alimento comercial a los 60 días de alimentación.

La inmunodetección de tripsina fue positiva para todos los tratamientos en los distintos tiempos de alimentación, la cual corresponde a la banda con peso molecular de 25 kDa, mientras que para los tratamientos experimentales y el control dieron positivos para Alfa-amilasa a los 60 días de alimentación (Figura 26) correspondiente a la banda de 35 kDa. Se obtuvieron resultados negativos en la inmunodetección de quimiotripsina para todos los tratamientos.

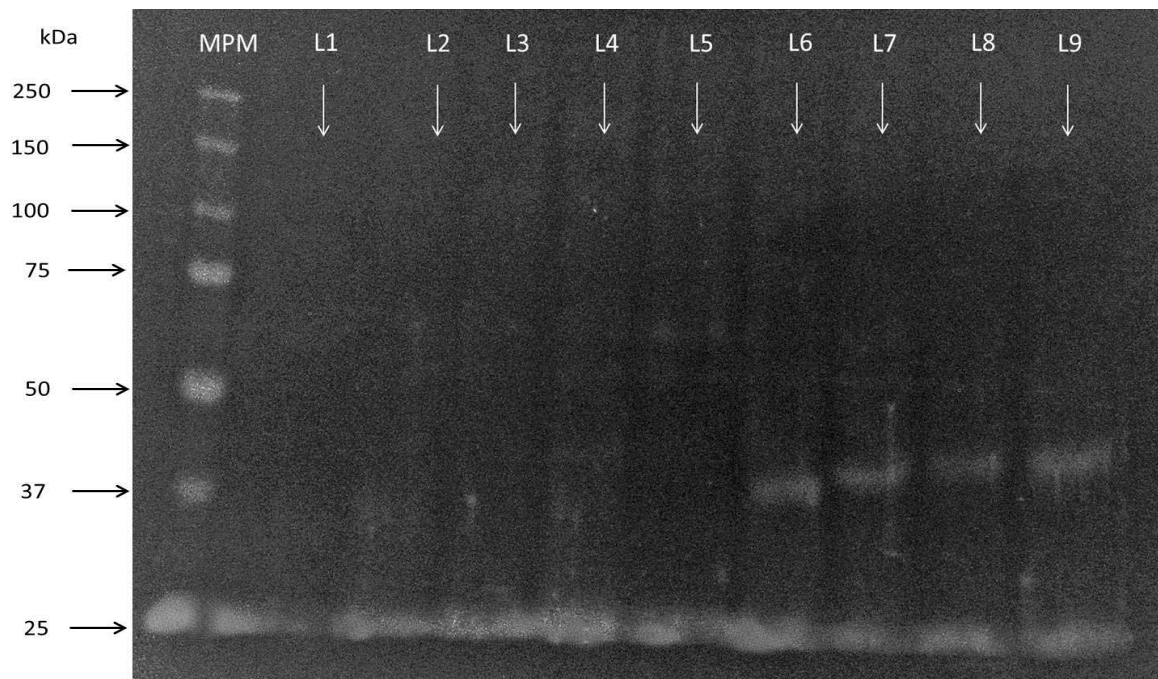


Figura 26.- Inmunodetección de Tripsina (25 kD) y Alfa-Amilasa (~37 kD) del tracto digestivo (ciegos pilóricos y primera parte del intestino) de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con diferentes dietas experimentales. MPM.- Marcador de Peso Molecular marca Bio-Rad, L1.- Alimentación en tiempo cero, L2.- Dieta experimental E1 (fitasa+levadura) a los 30 días de alimentación, L3.- Dieta experimental E2 (levadura) a los 30 días de alimentación, L4.- Dieta experimental E3 (fitasa) a los 30 días de alimentación, L5.- Alimento comercial a los 30 días de alimentación, L6.- Dieta experimental E1 (fitasa+levadura) a los 60 días de alimentación, L7.- Dieta experimental E2 (levadura) a los 60 días de alimentación, L8.- Dieta experimental E3 (fitasa) a los 60 días de alimentación, L9.- Alimento comercial a los 60 días de alimentación.

Discusión

En el presente trabajo se pudo observar durante todo el periodo de alimentación, que los organismos no presentaron síntomas de enfermedad, ni fue afectada la sobrevivencia por efecto de las dietas, (cabe aclarar que la mortalidad que se presentó, se debió a factores externos, como depredadores, tales como, aves, mamíferos y reptiles).

La falta de diferencias significativas en la ganancia de peso y en la tasa de crecimiento específico indica que es factible proporcionar alimento a base de harina de soya durante los primeros tres meses de cultivo, que coincide con lo reportado por Sánchez-Ávila (2012), y confirma que el uso de harina de soya como sustituto de la harina de pescado (materia prima de los alimentos comerciales) tiene un potencial indudable como fuente alternativa de proteínas en alimentos para peces (Burrels, 2001).

Las diferencias encontradas en la segunda fase del primer experimento pueden ser debidas a la palatabilidad, al tamaño de los estanques de concreto aunado a la baja población y al mejor aprovechamiento de la dieta comercial debido a la proteína de origen animal (pescado) encontrada en la materia prima de este tipo de dietas.

En cuanto al factor de condición (K), en la etapa de alimentación en las tinas de fibra de vidrio (Figura 14), se presentan valores entre 1 y 1.1, lo cual es indicador que los peces presentaron un cuerpo delgado y alargado (Barnham y Baxter, 1998), esto es atribuido a la alta población y al tamaño de las tinas de fibra de vidrio, ya que al ser de un metro de diámetro por un metro de profundidad, no presentaban el espacio suficiente para el óptimo desarrollo de los organismos, mientras que en la etapa de alimentación en los estanques de concreto, el factor de condición (K) de todos los tratamientos es mayor a 1, alcanzando valores cercanos a 1.4, lo cual según Barnham y Baxter (1998) son peces que presentan

un ancho y largo proporcional en el cuerpo, esto es atribuido al desdoble de 200 organismos de cada tratamiento a estanques de concreto de 10 metros de diámetro por 1.20 metros de profundidad, los cuales brindaron el espacio óptimo para un desarrollo adecuado de la población presente en cada uno de los estanques.

Los valores de eficiencia de las dietas experimentales son mayores que los reportados por Sánchez-Ávila en el 2012, siendo similares las tasas de eficiencia de la proteína, esto puede ser debido a la infraestructura de los estanques donde se encontraban los peces, así como a las características del agua y del ambiente, ya que este proyecto se realizó bajo condiciones prácticas de cultivo en una granja trutícola en una zona de clima templado subhúmedo, mientras que Sánchez-Ávila en el 2012 realizó su trabajo en condiciones de laboratorio. Por otra parte, la falta de diferencia entre dietas experimentales y control indica la factibilidad de utilizarlas para cultivos comerciales de trucha durante los primeros 75 días.

Las diferencias encontradas en la segunda etapa de alimentación en los valores de la tasa de eficiencia de la dieta y de proteína pueden ser debidas al desdoble de los organismos, aunado a la palatabilidad y al aprovechamiento de la dieta con alto contenido de proteína de origen animal.

Los resultados obtenidos durante la primera etapa de alimentación permiten inferir que habrá una disminución en el gasto que el productor realice por la compra de alimento durante los primeros dos meses y medio de cultivo. Para los siguientes 90 días de cultivo en los estanques de concreto, se presentaron diferencias significativas entre la dieta control y las dietas experimentales, lo cual indica que el periodo de alimentación con alto contenido de proteína vegetal (harina de soya), será mayor para alcanzar la talla de los organismos alimentados con dietas comerciales, por lo cual dependiendo del costo de esta materia prima, podrá ser igual o mayor el gasto por la compra del alimento experimental.

Los valores de nitrógeno y fósforo contenido en el agua residual de los tres tratamientos experimentales y el control no presentaron diferencias significativas en ambos casos, por lo que el uso de estos tratamientos con sustituciones del 75 % de harina de soya tienen un efecto similar a las dietas comerciales en la cantidad de fósforo y nitrógeno desechado al medio.

No se presentaron diferencias significativas en la cantidad de fósforo contenido en heces, así mismo es posible decir que la asimilación del fósforo en los organismos es similar entre los organismos alimentados con la dieta control y aquellos alimentados con las dietas experimentales.

La piel de los peces, así como las membranas mucosas que recubren las branquias y el tracto gastrointestinal, constituyen la primera línea defensiva contra los patógenos, el moco que recubre la piel es un importante mecanismo defensivo, pues presenta una variedad de compuestos antimicrobianos y antiparasíticos, además de proteínas y carbohidratos con función protectora que bloquea la colonización por organismos extraños a través de un mecanismo de pérdida y remplazo (Ourth, 1980). Se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos experimentales E1 (fitasa+levadura) y E2 (levadura) siendo esta última, la dieta con mayor concentración de proteína en moco, esto puede ser debido a la adición de levadura como probiótico, coincidiendo con lo reportado por Sealey et al. (2009) los cuales reportaron que al utilizar altos niveles de inclusión de harina de soya, el uso de probióticos puede ayudar a mejorar algunas respuestas inmunes, siendo la dieta con levadura la mejor opción para ser usada en condiciones prácticas de cultivo, ya que los organismos presentarán la misma capacidad de resistencia a patógenos externos que aquellos alimentados con dietas con alto contenido de proteína de harina de pescado.

Las diferencias significativas en la concentración de proteína en el suero sanguíneo así como de la lisozima de los organismos control y de los tratamientos experimentales en las tinas de fibra de vidrio y en estanques de concreto pueden ser debidas a las macromoléculas de la soya llamadas componentes antigénicos, estas moléculas, luego de ser absorbidas, son reconocidas por el sistema inmunológico como extrañas; éste responde produciendo anticuerpos para eliminarlas, reflejándose en la cantidad de proteína presente en el suero sanguíneo (Elizalde et al. 2009).

Los valores de lisozima en los organismos de este trabajo son menores con respecto al trabajo de Sánchez-Ávila 2012, esto pudo ser debido a la población e infraestructura de los estanques (100 L de capacidad) utilizados por dicho autor, ya que entre mayor población tenga un estanque, y este sea de menor tamaño, tendrá una relación en la concentración de lisozima en el suero sanguíneo generado por el factor estrés, debido a la competencia por alimento y espacio, (Grinde et al., 1988).

Rumsley en 1994 y Burrells et al. en 1999 indican que las sustituciones altas de harina de soya (mayores al 80 %) afectan el sistema inmune no específico (actividad de los macrófagos) de la trucha arcoíris, pero en este trabajo se utilizó una sustitución del 75 % de harina soya en las dos etapas de alimentación y se encontraron diferencias significativas, coincidiendo por lo reportado por Burrells et al. en 1999, el cual indica que el uso moderado en la sustitución de harina de soya, no tiene efectos negativos en la actividad de los macrófagos, lo cual nos indica que es factible la sustitución con el 75 % de harina de soya sin afectar el sistema inmune no específico (actividad de los macrófagos) de la trucha arcoíris.

Experimento 2: Fluctuaciones en la excreción de fósforo y en suero sanguíneo

Se observaron diferencias significativas en el fósforo excretado en organismos alimentados con las dietas experimentales y el control al día 30, esto es debido a la alta concentración de proteína de soya y probablemente a la baja asimilación de esta proteína vegetal en el organismo de los juveniles de trucha en el primer mes de alimentación, ya que al día 60 se puede observar que no existen diferencias significativas entre tratamientos, por lo que el uso de la harina de soya sustituida en un 75 % suplementada con fitasa y/o levadura como alimento en trucha arcoíris no incrementa la excreción de fósforo en el ambiente a partir del segundo mes de alimentación.

Respecto al contenido de fósforo en suero de los organismos alimentados con harina de soya, se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos experimentales y el grupo control, por lo que se infiere que la asimilación de fósforo en suero es menor en las dietas E2 y E3 suplementadas con levadura y fitasa respectivamente, por el contrario, la asimilación de fósforo es mayor en organismos alimentados con la dieta E1 suplementada con levadura y fitasa, esto indica que esta suplementación en dietas con alto contenido de harina de soya contribuye a una mejor asimilación del fósforo contenido en forma de fitato, lo cual es confirmado con el reporte de Vielma et al. (1998), los cuales encontraron que la fitasa mejora la disponibilidad de fósforo contenido en dietas con sustituciones de harina de soya, confirmándolo con la alta cantidad de fósforo contenido en plasma sanguíneo en organismos alimentados con dietas suplementados con fitasa y levadura.

Experimento 3: Inmunodetección de enzimas digestivas en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)

El mismo patrón en los tratamientos experimentales y el control a los 30 y 60 días de alimentación, indica que la soya contenida en las experimentales no provoca cambios notorios en la producción de enzimas y permite inferir que la fitasa y/o levadura no permiten que los inhibidores de proteasas de la harina de soya inactive la enzima tripsina, y ayudan a la reducción de los efectos negativos de los los inhibidores de proteasas, especialmente lectinas inhibidoras de tripsina, quimiotripsina y alfa amilasa. Además se ha reportado que la fitasa y/o levadura contienen en su estructura elementos que estimulan el sistema inmune de los peces y son usados como control biológico en la prevención de ataques bacterianos representando una opción para mejorar la salud y el crecimiento de los organismos contra patógenos potenciales en el cultivo de peces (Gatesoupe, 1999; Irinato y Austin, 2002).

Diferentes estudios postulan que la secreción y actividad de la alfa amilasa depende de la dieta natural de cada especie, siendo los peces herbívoros y omnívoros aquellos con mayor actividad de esta enzima (Papoutsoglou y Lyndon, 2003; Fernández et al., 2001; Hidalgo et al., 1999), esto puede ser debido a los hidratos de carbono contenido en el alimento natural de los peces, aunque se ha reportado que existe una adaptación de la secreción de amilasa al nivel de hidratos de carbono contenidos en la dieta en peces con estrategias de alimentación completamente diferentes (Papoutsoglou y Lyndon, 2003). Los carbohidratos son generalmente mal digeridos en carnívoros como la trucha, (Brauge et al., 1994; Storebakken et al., 1998), al aumentar en nivel de hidratos de carbono en la dieta existe una reducción de la actividad de amilasa, esto parece ser debido a la inhabilitación de la enzima por la presencia de las moléculas de almidón, ya que se ha reportado que el almidón incluido en la dieta reduce la actividad de la amilasa en los jugos digestivos (Hofer y Sturmbauer, 1985), así como a los inhibidores de proteasas en la soya y en otros granos, esto puede ser

la explicación a que en los primeros 30 días de alimentación exista poca o nula presencia de alfa amilasa al realizarse la inmunodetección, por el contrario, a los 60 días de alimentación el resultado es positivo tanto en los tratamientos experimentales como en el control, lo cual puede deberse al crecimiento y maduración de los organismos, ya que estos probablemente toleren mejor el alimento con sustituciones parciales de harina de soya aunado a la suplementación de fitasa y/o levadura y por tanto exista una mayor producción de Alfa-amilasa. Esta enzima se ha reportado en mamíferos y en peces con un peso molecular de 50 kDa, esto difiere con los resultados obtenidos en este trabajo, donde se puede observar que la alfa amilasa corresponde a la banda con un peso molecular de 35 kDa, esto puede deberse al uso del anticuerpo comercial que fue hecho y probado en mamíferos, muy probablemente el sitio de reconocimiento de la enzima Alfa-amilasa de pez coincida con el de mamífero, pero la molécula de Alfa-amilasa en peces sea más corta y por lo tanto de menor peso molecular, por lo que la banda de detección se encuentre en un peso molecular más bajo que lo reportado.

No se obtuvieron resultados positivos a la presencia de quimiotripsina, por lo cual se puede inferir que durante los primeros 60 días de alimentación con las dietas experimentales y el alimento comercial, no hay una producción notable de esta enzima en los juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

A pesar de esto, es necesario un análisis histológico con inmunodetección de las enzimas que se usaron en este trabajo, del sistema digestivo de los organismos para observar si se presenta algún cambio como lo mencionan varios autores (Hendriks et al., 1990; Baeverfjord and Krogdahl, 1996; y Krogdahl et al., 1999), los cuales han reportado que en salmónidos estos factores pueden conducir a cambios histológicos en el intestino, ya que el sistema digestivo de los peces carnívoros no ha evolucionado para hacer frente a la gran variedad de factores antinutricionales presentes en las plantas (Francis et al., 2001; Gatlin et al., 2007; Hardy, 2010; Krogdahl et al., 2010).

Conclusiones

El uso de la harina de soya en sustituciones del 75 % suplementada con levadura y/o fitasa no afecta el crecimiento en trucha arcoirirs en los primeros 75 días de alimentación.

Las dietas experimentales presentan una asimilación de fósforo similar a aquellos organismos alimentados con la dieta comercial.

No existe una disminución en la excreción de fósforo al medio por los organismos, al utilizar harina de soya en las dietas con sustituciones del 75 % suplementadas con levadura y/o fitasa.

Algunas respuestas inmunes no se observaron afectadas por el uso de los tratamientos experimentales al ser comparadas con aquellos alimentados con la dieta comercial, por lo cual los organismos presentarán la misma capacidad de resistencia a patógenos externos, haciendo factible el uso de estas dietas en condiciones prácticas de cultivo.

Las dietas con sustituciones del 75 % de harina de soya suplementadas con levadura y/o fitasa no afecta la presencia de tripsina en el tracto digestivo de los organismos durante los dos primeros meses de alimentación.

La alfa-amilasa es probable que se presente a partir de los 60 días de alimentación tanto en organismos alimentados con dietas comerciales como en aquellos alimentados con dietas a base harina de soya en sustituciones del 75 % suplementada con levadura y/o fitasa.

No se detectó presencia de Quimiotripsina en el tracto digestivo en los juveniles de trucha arcoirirs (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con alimento comercial y en aquellos alimentados con las dietas experimentales durante 60 días.

Es necesario un análisis histológico junto con la inmunodetección de las enzimas usadas en este trabajo para observar si se presenta algún cambio aparente en la morfología del sistema digestivo de los organismos.

El uso de dietas con sustituciones del 75 % de harina de soya suplementada con levadura y/o fitasa tiene un efecto similar en el crecimiento de los organismos al ser comparado con aquellos alimentados con una dieta comercial en los primeros 75 días de cultivo, por lo que esto presenta una reducción de costos por alimentación durante los primeros dos meses de cultivo, al ser la harina de soya comparativamente más barata que la harina de pescado

Referencias

Adelizi, P. D., Rosati, R., Warner, K., Wu, Y. V., Muench, T. R., White, M. R., y Brown, P. B., 1998. Evaluation of fish-meal free diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Nutr.* 4: 255-262.

Alsop D., Wood C. 1997;The interactive effects of feeding and exercise on oxygen consumption, swimming performance and protein usage in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol.* 200:2337-46.

Barrows, F.T., Gaylord, T.G., Stone, A.D.J., Smith, C.E. 2007. Effect of proteína source and nutrient density on growth efficiency, histology and plasma amino acid concentration of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Res.* 38: 1747-1758.

Barnham, C. 1989. Fisheries Information report No. 2: Summary of immediately available records of non-indigenous and indigenous fish stockings in Victorian public waters 1871-1988. Freshwater Fish Management Branch, Fisheries Division, Victoria.

Barnham, C., Baxter, A. 1998. Condition Factor, K, for Salmonid Fish. Fisheries Notes. State of Victoria, Department of Primary Industries.

Bergheim, A., Sveier, H. 1995. Replacement of fishmeal in salmonid diets by soy meal reduces phosphorus excretion. *Aquacult. Int.* 3: 265-268.

Brauge, C., Medale, F., Corraze, G.1994. Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. *Aquaculture* 123, 109– 120.

Burrells, C., Williams, P.D., Southgate, P.J., Crampton, V.O. 1999. Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins. Vet. Immunol. Immunopathol. 72: 277-288.

Burrells, C., Williams, P., Southgate, P. y Wadsworth. 2001. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds: 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rates and physiology of atlantic salmon (*Salmon salar*, L.). Aquaculture 199, pp. 171-184.

Buttle, L.G., Burrells, A.C., Good, J.E., Williams, P.D., Southgate, P.J., Burrells, C., 2001. The binding of soybean agglutinin (SBA) to the intestinal epithelium of Atlantic salmon, *Salmo salar* and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed high levels of soybean meal. Vet. Immunol. Immunopathol. 80, 237-244.

Cain, K.D., Garling, D.L.1995. Pretreatment of soybean meal with phytase for salmonid diets to reduce phosphorus concentrations in hatchery effluents. Prog. Fish-Cult. 57, 114–119.

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

Caruso, G., Denaro, M.G., Genovese, L. 2009. Digestive enzymes in some teleost species of interest for mediterranean aquaculture. Open. Fish Sci., J. 2: 74-86.

Cheng, Z.J., Hardy, R.W., Verhac, V., Gabaudan, J. 2004. Microbial phytase supplementation and dosage on apparent digestibility coefficients of nutrients an dry matter in soybean product.based dietas for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J. World Aquacult. Soc. 35: 1-15.

Chung, S., Secombes, C.J. 1988. Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comp. Biochem. Physiol.* 89: 539-544.

Coloso, R.M., King, K., Fletcher, J.W., Hendrix, M.A., Subramanyan, M., Weis, P., Ferraris, R.P. 2003. Phosphorus utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed practical diets and its consequences on effluent phosphorus levels. *Aquaculture*. 220: 801-820.

CONAPESCA-SAGARPA. 2011. Anuario estadístico de pesca 2011. CONAPESCA. Mazatlán. 265 pp.

Cruz, C.A.C., Barajas, C.A., Hernández, H.L.H., Ángeles, L.O., Fernández, A.M.A., Ramírez, P. T. 2008. Effects of soybean and flaxseed meals on the growth and phosphorus and nitrogen excretion of rainbow trout juveniles (*Oncorhynchus mykiss*). Memories of the 1st International Workshop CGNA, August 4-6, 2008. Temuco, Chile.

Dalsgaard, J., Ekmann, K.S., Pedersen, P.B., Verlhac, V. 2009. Effect of supplemented fungal phytase on performance and phosphorus availability by phosphorus depleted juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and on the magnitude and composition of phosphorus waste output. *Aquaculture*. 286: 105-112.

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

Dimes, L.E., Garcia-Carreño, F.L., Haard, N.F. 1994. Estimation of protein digestibility-III. Studies on the digestive enzymes from the pyloric ceca of rainbow trout and salmon. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*. 1. 349-360.

Ellis, A.E. 1980. Antigen trapping in the spleen and kidney of the plaice, *Pleuronectes platessa*. J. Fish Dis. 3:413-26.

Elizalde, A., Potilla, Y., Chaparro, D., C. 2009. Factores Antinutricionales en Semillas. Rev.Bio.Agro v.7 n.1 Popayán jan./jun. pdf.

Escaffre, A., Kaushik, S., Mambrini, M. 2007. Morphometric evaluation of changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) due to fish meal replacement with soy protein concentrate. Aquaculture 273, 127–138.

FAO. 2012. The state of world fisheries and aquaculture 2012. FAO. Rome, Italy. 230 pp.

FAO. 2007. Food Outlook, global market analysis. FAO. Rome Italy. 91 pp.

<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ah876e/ah876e00.pdf>.

FAO. 2012. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma

Fernández, I., Moyano, F.J., Díaz, M. y Martínez, T. 2001. Characterization of alpha-amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (*Sparidae*, *Teleostei*). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 262, 1–12.

Fevolden, S. E., Roed, K. H., y B. Gjerde. 1994. Genetic components of post-stress cortisol and lysozyme activity in Atlantic salmon; correlations to disease resistance. Fish & shellfish immunology 4, no. 7: 507-519.

Flores, G.M., Hernández, H.L.H., Fernández, A.M.A., Ángeles, L.O., Ramírez, P.T. 2009. Effects of *Spirulina* powder as substitute of fish meal in diets of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Book of Abstracts, World Aquaculture 2009.

Furné, M., Hidalgo, M.C., López, A., García-Gallego, M., Morales, A.E., Domezain, A., Domezainé, Sanz, J.A. 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 250, 391– 398.

Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krodahi, Å., 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. *Aquacult. Res.* 38: 551-579.

Gaylord, T.G., Teague, A.M., Barrows, F.T. 2006. Taurine supplementation of all plant protein diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. World Aquacult. Soc.* 37: 509-517.

Glencross, B.D., Carter, C.G., Duijster, N., Evans, D.R., Dods, K., McCafferty, P., Hawkins, W.E., Maas, R., Sipsas, S. 2004. A comparison of the digestibility of a range of lupin and soybean protein products when fed either Atlantic salmon (*Salmo salar*) or rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 237: 333-346.

Gomes, E., Rema, P y 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.

Grinde, B., O. Lie, T. Poppe y R. Salte. 1988. Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. *Aquaculture*. 18:299-304.

Hardy, R.W. 2006. Alternate protein sources for salmon and trout diets. *Ani. Feed Sci. Tech.* 59: 71-80.

Hemre, G.-I., Sanden, M., Bekke-MkKellep, A.M., Sagstad, A. y Krogdahl, A. 2005. Growth, feed utilization and health of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) fed genetically modified compared to non-modified commercial hybrid soybeans. *Aquaculture Nutrition.* 11: 157-167.

Hernández-Hernández, L.H., Teshima, S.I., Ishikawa, M., Koshio, S., Tanaka, Y. 2004. Effects of dietary vitamin A on juvenile red sea bream *Chrysophrys major*. *J. World Aquacult. Soc.* 35: 436-444.

Hernández, F.G. Fernández, A.M.A., Hernández, H.L.H., Ángeles, L.O., Ramírez, P. T. 2009. Total replacement of fish meal with mixtures of soybean meal and *Spirulina* powder in diets of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Book of Abstracts, World Aquaculture 2009.*

Hidalgo, M.C., Urea, E., Sanz, A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170. 267–283.

Hofer, R. y Sturmbauer, C. 1985. Inhibition of trout and carp alpha-amylase with wheat. *Aquaculture*, 48 (1986) 277-283.

Lovshin, L. y Phelps, R. 1993. Evaluation of a mechanical grader to separate fingerling channel catfish (*Ictalurus punctatus*) into length groups. *Journal of Applied Aquaculture* 3:285-296.

Lida, T., Takahashi, K. y 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.

Lie, O., Evensen, O., Sorensen, A. y Frogsadal, E. 1989. Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*. 6:1-5.

Lovshin, L. y R. Phelps. 1993. Evaluation of a mechanical grader to separate fingerling channel catfish (*Ictalurus punctatus*) into length groups. *J. Appl. Aquacult.* 3:285-296.

Kim, H.D., Austin, B. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish and Shellfish Immunology*. 21: 513-524.

Kunitz M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J Gen Physiol*. 320: 291-310.

McCallum, I., Newell, W., Cruz-Suarez, L.E., RiqueMarie, D., Tapia-Salazar, M., Davis, a., Thiessen, D., Campbell, L., Willerer, A.O.M., Phillips, C y Hickling, D. 2000. Uso de arvejón (chicharo) *Pisum sativum* en alimentos para camarones (*Litopenaeus stylirostris* y *L. vannamei*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). En: Cruz-Suarez, L.E., RiqueMarie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.

MacArthur, J.I. y Fletcher, T.C. (1985) Phagocytosis in Fish. En: Manning, M.J., y Tatner, M.F. *Fish Immunol*. Academic Press. Londres. pp: 29-46.

Meza, L.T. 2010. Uso de proteína aislada de soya y concentrado de proteína de soya como sustitutos de harina de pescado en dietas balanceadas de juveniles de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*. Tesis de maestría. FES Iztacala. UNAM.

Papoutsoglou, E.S y Lyndon, A.R. 2003. Distribution of Alpha -amylase along the alimentary tract of two Mediterranean fish species, the parrotfish *Sparisoma cretense* L. and the stargazer, *Uranoscopus scaber* L. Mediterranean Marine Science. Vol. 4/2, 2003, 115-124.

Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds.). Aditivos alimentarios como estimuladores del crecimiento de camarón. Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Interancional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida Yucatán.

Oliva-Teles, A., Gouveia, A.J., Gomes, E. y Rema, P. 1994. The effect of different processing treatments on soybean meal utilization by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquacultue 124: 343-349.

Olvera-Novoa, M.A., Domínguez-Cen, L.J., Olivera-Castillo, L., Martínez-Palacios, C.A. 1998. Effect of the use of the microalgae *Spirulina maxina* as fish meal replacements in diets for tilapia *Oreochormis mossambicus* (Peters), fry. Aquacult. Res. 29: 709-715.

Olvera, M., y Olivera, L. (2000). Potencialidad del Uso de las Leguminosas como Fuente Proteica en alimentos para peces. Avances en Nutrición Acuícola IV. Mérida, Yucatán, México.

Ourth, D. D. (1980). Secretory IgM, lysozyme and lymphocytes in the skin mucus of the channel catfish, *Ictalurus wunctatus*. Dev. comD. Immunol. 4: 65-74

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

Pereira, J.O.B., Reis-Henriques, M.A., Sánchez, J.L., Costa, J.M. 1998. Effect of the protein source on the reproductive performance of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Res.* 29: 751-760.

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

Rodehutsord, M., Pfeffer, E., 1995. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Water Sci. Technol.* 31, 143–147.

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

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

Sajjadi, M., Carter, C.G. 2004. Effect of phytic acid and phytase on feed intake, growth, digestibility and trypsin activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquacult. Nutr.* 10: 135-142.

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

Secombes, C.J., 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Robertson, B.S., van Muiswinkel, W.B., (Eds.), *Techniques in Fish Immunology*, SOS Publications, NJ 07704-3303, USA, pp. 139-154.

Secombes, C.J., Hardie, L.J. y Daniels, G. 1996. Cytokines in fish: an update. *Fish and Shellfish Immunology* 6:291-304.

Storebakken, T., Shearer, K.D., Refstie, S., Logocki, S., McCool, J. 1998. Interactions between salinity, dietary carbohydrate source and carbohydrate concentration on the digestibility of macronutrients and energy in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 47, 11– 26.

Storebakken, T., Shearer, K.D. y Roem, A.J: 2000. Growth, uptake and retention of nitrogen and phosphorus and adsorption of other minerals in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). Fed diets with fish meal and soy-protein concentrate as the main sources of protein. *Aquaculture Nutrition*. 6: 103 -108.

Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.Y., Jeon, M.J., Bai, S.C., Lee, W.J., Yuge, K., Koshio, S. 2006. Growth, stress tolerance and non specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish. Sci.* 72: 310-321.

Vielma, J., Lall, S.P., 1998. The control of phosphorus homeostasis in Atlantic salmon *Salmo salar*. in fresh water. *Fish Physiol. Biochem*, in press.

Walton, M.J., Cowey, C.B., 1977. Aspects of ammoniogenesis in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 57B, 143– 149.

Walton, M.J., Cowey, C.B., Adron, J.W., 1984. The effect of dietary lysine levels on growth and metabolism of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Br. J. Nutr. 52, 115–122.

Wang, F., Yang, Y.H., Han, Z.Z., Dong, H.W., Yang, C.H., Zou, Z.Y. 2009. Effects of phytase pretreatment of soybean meal and phytase sprayed in diets on growth, apparent digestibility coefficient and nutrient excretion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquacult. Int. 17: 143-157.

Yokoyama, 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.