



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN
(QUÍMICA ACUÁTICA)

“EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN PARCIAL DE LA HARINA DE PESCADO POR
UNA MEZCLA DE KRILL-SOYA EN LA DIETA DE JUVENILES DE PARGO
Lutjanus guttatus (Steindachner, 1869)”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

IBQ. JESÚS EMMANUEL SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

TUTOR:

DRA. CRISANTEMA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS
UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN, FACULTAD
DE CIENCIAS (SISAL, YUCATAN)

DR. LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DRA. MARÍA CRISTINA CHÁVEZ SÁNCHEZ
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MÉXICO, D. F. OCTUBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** a través del **Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología**, por darme la oportunidad de ser parte de su programa de posgrado y permitirme lograr un nuevo nivel académico. Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por otorgarme el apoyo económico durante 24 meses que me ha permitido el sostenimiento durante mi preparación académica.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C, Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental**, por aceptarme como a uno de sus estudiantes y permitirme desarrollar la fase experimental del proyecto de tesis. Al **Fondo Institucional de Fomento Regional para el Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación (FORDECYT)** proyecto 147325 denominado “Desarrollo de la tecnología de engorda de pargo en jaulas flotantes: Una alternativa productiva para las costas del noroeste mexicano” a cargo de la Dra. Crisantema Hernández González, por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

A la **Dra. Crisantema Hernández González** por dirigir con su gran experiencia todos los aspectos de mi proyecto de tesis y formación académica. Mi total gratitud por confiar en mi desempeño siempre, por sus atinadas observaciones y sugerencias que se reflejan en este trabajo, y sobre todo por siempre darme el espacio para tomar decisiones propias, lo que considero enriquece en gran medida la formación académica y personal de un estudiante.

A los miembros de mi comité tutor: **Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés, Dra. María Cristina Chávez Sánchez, Dr. Carlos Alfonso Álvarez González** y al **Dr. Luis Héctor Hernández Hernández**, por el aporte de sus experiencias a través de sus observaciones y recomendaciones que permitieron el enriquecimiento de este trabajo.

A **Dios** señor de todos, ya que gracias a su sabiduría, ha permitido con este trabajo que la ciencia crezca una gota más en el mar de su conocimiento. A mis padres **Cándido Sánchez** y **Clotilde Rodríguez** que siguen apostando a mi formación profesional. A mis hermanos **Miguel Ángel Sánchez** y **Claudia Karina Sánchez**, por ser ejemplo de perseverancia.

Al **Biol. Alan Jesús Humberto González Santos**, por el apoyo técnico y capacitación en la etapa de bioensayo. A la **Biol. Blanca Teresa de Jesús**

González Rodríguez, por la inducción y apoyo técnico en los análisis químicos proximales. A la **Biol. Virginia Patricia Domínguez Jiménez**, por el apoyo brindado en la determinación de aminoácidos y capacitación en el uso del equipo HPLC, así como en el análisis de química sanguínea.

A la **Biol. Rosa María Medina Guerrero**, por el apoyo en el monitoreo de parásitos en el sistema experimental. Al **M. en C. Miguel Ángel Sánchez Rodríguez**, por el apoyo prestado en el monitoreo de los parámetros de calidad de agua en el sistema experimental.

A la **Dra. María Cristina Chávez Sánchez** y la **M. en C. Selene María Abad Rosales** por el apoyo y capacitación técnica para el análisis histológico.

A la **Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés** y la **M. en C. Nancy Herrera Salvatierra**, por la capacitación y apoyo técnico en las técnicas de actividad enzimática.

Al **Dr. Milton Espanoupolos Hernández** por permitir que realizara el análisis de cuantificación de proteínas en el laboratorio de Nutrición Acuícola del Instituto Tecnológico de Mazatlán.

A la **Téc. Ma. Clara Ramírez Jáuregui**, por el apoyo en la búsqueda de bibliografía que enriqueciera este trabajo y mi formación académica. A la **Dra. Gloria Vilaclara Fatjó, Margarita Cordero, Natalia Medina, Diana Juárez, Guadalupe Godoy, Gabriela Almaraz y Chantal Ruiz**, por el apoyo en todos los trámites pertinentes al posgrado.

A **Gladys Esmeralda Palomares Ibarra y Reyna Guadalupe Sánchez Rodríguez** por el apoyo técnico prestado en el desarrollo del bioensayo, producción de alimento y captura de información biométrica. A **Julissa Soriano, Meredy Flores, Edgar Valle** por el apoyo técnico prestado en el desarrollo del bioensayo.

A mis profesores: **Dr. Federico Páez, Dr. Carlos Green, Dr. Yovani Montaña Ley, M. en C. Mariano Sánchez, M. en C. Ana Puello, Dra. Cristina Chávez** y el equipo encabezado por la **Dra. Gloria Vilaclara Fatjó**, que se dieron el tiempo de compartir conmigo un poco de su gran experiencia y conocimiento.

A mis compañeros del CIAD, **Lorena Osuna, Daniela Contreras, Erika Sánchez, Asahel Benítez, Denisse Márquez, Gabriel Quintero, Laura Olmeda y Emyr Peña**, que siempre estuvieron dispuestos a ayudar en biometrías.

Al **M. en C. Emyr Saúl Peña Marín**, por el apoyo técnico prestado en todas las fases del bioensayo, interpretación de actividad enzimática, muestreo y disección de organismos, pero sobre todo por compartir todas sus experiencias en pro de mi formación académica y personal.

A mis compañeros de posgrado, **Gladys, Juan Francisco, Miriam, Carolina Franco, Carolina Salas, Denisse, Imelda, Elena y Martha**, por compartir momentos agradables mientras forjábamos un nuevo nivel académico, gracias chicos y espero tener el privilegio de seguir siendo su amigo.

A mis amigas de Sisal, **Leticia Fernández y Gabriela Campos**, que hicieron mi estadía por la península de Yucatán, mucho más placentera.

A todos los anónimos que de forma involuntaria o voluntaria fueron alcanzados por este trabajo. A todos;

GRACIAS

Índice

	Página
1. INTRODUCCIÓN	7
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Características de la especie	5
2.2. Requerimientos nutricionales	6
2.3. Uso de la harina de krill como sustituto de harina de pescado	7
2.4. Uso de la harina de soya como fuente proteínica	8
3. JUSTIFICACION ACADEMICA	9
4. HIPOTESIS	10
5. OBJETIVOS	11
5.1. Objetivo General:	11
5.2. Objetivos Específicos:	11
6. MATERIALES Y METODOS	12
6.1. Análisis proximal	12
6.1.1. Análisis de Proteínas	12
6.1.2. Análisis de Lípidos	12
6.1.4. Análisis de ceniza	12
6.1.5. Análisis proximal corporal	13
6.2. Perfil de aminoácidos	13
6.2.1. Hidrolisis	13
6.2.2. Derivatización	14
6.3. Descripción del área de bioensayos	14
6.4. Formulación de dietas experimentales	15
6.5. Elaboración de dietas experimentales	18
6.6. Origen de los organismos	20
6.7. Diseño experimental	20

6.7.1.	Área de bioensayo	20
6.7.2.	Diseño de implementación de dietas	21
6.7.3.	Alimentación.....	22
6.7.4.	Parámetros ambientales	22
6.8.	Evaluación biológica	22
6.9.	Índices biológicos corporales.....	24
6.10.	Indicadores hematológicos	25
6.10.1.	Hematocrito	26
6.10.2.	Proteína plasmática	26
6.10.3.	Triglicéridos	27
6.10.4.	Hemoglobina	27
6.11.	Actividad enzimática	27
6.11.1.	Extractos enzimáticos.....	28
6.11.2.	Determinación de proteína soluble.....	28
6.11.3.	Proteasa alcalina	29
6.11.4.	Tripsina.....	29
6.12.	Análisis histológico	30
6.13.	Análisis estadísticos	31
6.14.	Análisis económico	31
7.	RESULTADOS	33
7.1.	Análisis proximal corporal	33
7.2.	Evaluación biológica	33
7.2.1.	Peso final	34
7.2.2.	Peso ganado	34
7.2.3.	Tasa de crecimiento.....	35
7.2.4.	Tasa específica de crecimiento.....	36
7.2.5.	Nivel óptimo de inclusión.....	36
7.2.6.	Consumo de alimento individual	37
7.2.7.	Tasa de conversión alimenticia.....	38

7.2.8.	Supervivencia.....	38
7.2.9.	Índice de eficiencia proteínica	39
7.2.10.	Utilización aparente de nitrógeno	39
7.3.	Índices biológicos corporales.....	40
7.3.1.	Factor de condición	40
7.3.2.	Índice hepatosomático.....	41
7.3.3.	Índice viscerosomático	41
7.3.4.	Relación de grasa intraperitoneal	41
7.4.	Bioindicadores hematológicos	41
7.4.1.	Hematocrito	42
7.4.2.	Proteína plasmática	42
7.4.3.	Hemoglobina	42
7.4.4.	Triglicéridos	43
7.5.	Actividad enzimática	43
7.5.1.	Actividad específica de tripsina.....	43
7.5.2.	Actividad específica de proteasas alcalinas.....	43
7.6.	Análisis histológico	44
7.7.	Análisis económico	47
8.	DISCUSIÓN	49
9.	CONCLUSIONES	54
10.	BIBLIOGRAFIA.....	56

LISTA DE TABLAS

	Pagina
Tabla 1. Perfil de aminoácidos de las harinas de pescado, soya y krill. (AAg 100g ⁻¹ proteína cruda).	4
Tabla 2. Análisis proximal de materias primas (valores promedios ± SD expresados en base seca).	15
Tabla 3. Composición y análisis proximal de las dietas experimentales para juveniles de pargo flamenco, con inclusiones de 0, 21, 45 y 71% de la mezcla krill-soya.	16
Tabla 4. Composición de aminoácidos de las dietas experimentales.	17
Tabla 5. Composición proximal corporal en base húmeda (valores promedios ± SD expresados en base húmeda).	33
Tabla 6. Parámetros de crecimiento y eficiencia del alimento de pargo flamenco en 12 semanas de experimentación.	34
Tabla 7. Índices biológicos del pargo flamenco alimentado con las dietas experimentales por 12 semanas.	40
Tabla 8. Bioindicadores hematológicos del pargo flamenco al inicio del experimento (Inicio) y después de 12 semanas alimentados con las dietas experimentales.	42
Tabla 9. Actividad específica de tripsina y proteasas alcalinas de intestino y ciegos pilóricos del pargo flamenco, alimentado con las dietas experimentales por 12 semanas.	43
Tabla 10. Costo de los ingredientes variables de las dietas experimentales y CUA	47

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Variación del precio de la harina de pescado y harina de soya en la década del 2002 al 2011. Fuente: Globefish Highlights, (2011).	2
Figura 2	Pargo flamenco, <i>Lutjanus guttatus</i> (Steindachner, 1869)	5
Figura 3	Protocolo de producción de dietas experimentales en la planta de alimentos del CIAD, Unidad Mazatlán. (Hernández <i>et al.</i> , 2010)	18
Figura 4	Dietas experimentales (A) KS00, (B) KS21, (C) KS45 y (D) KS71	20
Figura 5	Área de bioensayos	21
Figura 6	Extracción sanguínea de la vena caudal del pez	25
Figura 7	Incremento en peso del pargo flamenco, alimentados con las dietas experimentales por 12 semanas. Los datos son la media de una $n=120\pm SD$.	35
Figura 8	Tasa de crecimiento del pargo flamenco, alimentados con las dietas experimentales por 12 semanas. Los datos son la media de una $n=3\pm SD$. Superíndice distinto denota diferencia significativa entre dietas ($P\leq 0.05$).	36
Figura 9	Análisis de regresión polinomial de segundo orden, relacionando el nivel de inclusión de la mezcla krill-soya con el peso ganado.	37
Figura 10	Consumo de alimento individual del pargo flamenco, alimentados con las dietas experimentales por 12 semanas. Los datos son la media de una $n=3\pm SD$. Superíndice distinto denota diferencia significativa entre dietas ($P\leq 0.05$).	38

- Figura 11 Utilización aparente de nitrógeno en pargos alimentados con las dietas experimentales por 12 semanas. Los datos son la media de una $n=3\pm SD$. Superíndice distinto denota diferencia significativa entre dietas ($P\leq 0.05$). 39
- Figura 12 Corte transversal del intestino medio, de juveniles de pargo flamenco *L. guttatus* alimentados con las dietas control KS00 (A), KS21 (B), KS45 (C) y KS71 (D). Aparente ampliación de la lámina propia (LP), $A\leq B\leq C\leq D$. H&E. 4x. 44
- Figura 13 Corte sagital de vellosidades de intestino medio (para identificación, ver leyenda de Figura 11). (A) Normal presencia y acomodo de macrófagos (Et), lamina propia (LP) normal con algunos linfocitos. (B) Incremento de tejido conectivo de LP, presencia de macrófagos y arreglo anormal de enterocitos. (C) LP ensanchada, presencia de células granulares eosinofílicas (cge). (D) LP ensanchada, presencia de macrófagos y linfocitos. H&E. 40x 45
- Figura 14 Espesor de lámina propia en intestino medio del pargo flamenco, alimentados 12 semanas con las dietas experimentales. Los datos son la media de una $n=150\pm SD$. Superíndice distinto denota diferencia significativa entre dietas ($P\leq 0.05$). 46
- Figura 15 Costo unitario de alimentación del pargo *L. guttatus* alimentado con las dietas KS00, KS21, KS45 y KS71. Se considera solo el costo de los ingredientes que se variaron en las dietas (HP, HK y HS). Los valores están expresados en pesos mexicanos. 48

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue evaluar una mezcla de harina de krill y soya como remplazo de la harina de pescado, para ello se formularon cuatro dietas iso calóricas que contenían, 9% de lípidos y 45% de proteína para juveniles de pargo flamenco *Lutjanus guttatus*, una control KS00 a base de harina de pescado (HP) y tres con remplazo del 21, 45 y 71% (KS21, KS45 y KS71, respectivamente). El material de remplazo se formuló proporcionalmente, 1:2.5 de harina de krill del Antártico (KH) y harina de soya desgrasada (HS). Las dietas se evaluaron por triplicado en tanques con 2 m³ de volumen útil, aireación constante y un cambio total del volumen de 6.5 tanques día⁻¹. Un total de 40 organismos con 33.75±1.6g de peso inicial fueron usados por tanque y alimentados a saciedad aparente tres veces al día por 12 semanas. Los valores medios de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto fueron registrados en 30.8±0.5°C, 33.75±0.7‰ y 6.46±0.5 mg L⁻¹ respectivamente. Los organismos fueron pesados y medidos cada 14 días. El peso ganado, tasa de crecimiento y tasa específica de crecimiento, fueron significativamente mayores con la dieta KS45 (85.66g, 253.81% y 1.5% día⁻¹, respectivamente), mientras que la tasa de conversión alimenticia, supervivencia, tasa de eficiencia proteica y utilización aparente de nitrógeno, no fueron afectadas por el remplazo de HP con HK y HS. El factor de condición, índice de grasa intraperitoneal, índice viscerosomático e índice hepatosomático, no mostraron diferencias significativas entre dietas. El análisis histológico muestra una tendencia inflamatoria ascendente de la lámina propia de las vellosidades del intestino medio, sin embargo esta tendencia no afectó el crecimiento de los peces al término del este experimento. La actividad específica de tripsina y proteasas alcalinas, en intestino y ciegos pilóricos, y química sanguínea no fueron diferentes entre tratamientos. El remplazo para lograr un mayor crecimiento fue 33.75% y el costo unitario de alimentación de la dieta KS45 fue \$14.38 (moneda nacional mexicana). El presente trabajo demuestra que la mezcla krill:soya en una proporción 1:2.5, es una fuente proteínica alternativa viable para sustituir a la HP.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate a mixture of krill meal and soybean meal as replacement for fish meal. Four iso caloric diets were formulated to contain 9% lipid and 45% protein, for juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*, a control diet KS00 to based fishmeal (HP) and three with replacement of 21, 45 and 71% (KS21, KS45 and KS71, respectively). Replacement material was composed with a proportion of 1:2.5 of Antarctic krill (KH) and defatted soybean meal (HS). Diets were evaluated for triplicated in tanks with a volume of 2 m³ with constant aeration and a total volume change of 6.5 tanks day⁻¹. A total of 40 organisms with 33.75±1.6g of initial weight were used per tank and fed three times a day to apparent satiety by 12 weeks. The mean values of temperature, salinity and dissolved oxygen were recorded at 30.8 ± 0.5 ° C, 33.75 ± 0.7 ‰ and 6.46 ± 0.5 mg L⁻¹ respectively. Organism were weighed and measured every 14 days. Weight gain, growing rate, specific growth rate (85.66g, 253.81% y 1.5% day⁻¹, respectably) were significantly greater with diet KS45, while food conversion efficiency, survival, protein efficiency rate and nitrogen apparent utilization were not affected by replacement FM by KH and HS. Condition factor, intraperitoneal fat index, viscerosomatic index and hepatosomatic index, showed not significant differences between diets. Histological analysis did show an inflammatory ascendant tendency in the lamina propia from mid intestine villi, however this trend did not affect the growth of fish at the end of this experiment. Results in specific trypsin and alkaline proteases activities from pyloric caeca, intestine and blood chemistry did not show significant differences between treatments. The greatest growth was achieved with replacement of 33.75% and unitary cost for KS45 was \$14.38 (Mexican national currency). The present work demonstrate that krill:soybean mix in a proportion of 1:2.5 is an acceptable alternative for FM substitution.

1. INTRODUCCIÓN

La producción acuícola mundial de pescado ha crecido sustancialmente en la última década, alcanzando 52.5 millones de toneladas en 2008. La región de Asia-Pacífico sigue dominando esta actividad económica, lo que representa el 89.1% de la producción mundial (FAO, 2010). La tasa media de crecimiento global de la acuicultura es de 8.8%, y en la actualidad México presenta una tasa media de crecimiento del 4.5 %. Sin embargo, el 75% de las pesquerías han alcanzado su máximo rendimiento sostenible. La producción acuícola del 2010 en México alcanzó las 285,000 toneladas, producidas en cerca de 3,000 granjas acuícolas comerciales y las poco más de 10,000 unidades de producción rural (SAGARPA, 2011).

Los requerimientos nutricionales y las fuentes proteínicas en dietas para peces es uno de los tópicos más investigados dentro de la nutrición de estos organismos, debido a que los ingredientes proteínicos en las dietas es considerado uno de los factores económicos más importantes de su formulación, sobre todo si se busca una buena calidad y constancia en su composición cuantitativa y cualitativa.

La harina de pescado es usada por poseer un alto contenido en proteína, el cual oscila entre 65 a 72%, presenta buen perfil de aminoácidos y energía digestible. Este ingrediente contiene además ácidos grasos indispensables de la serie *n*-3, minerales, vitaminas y es atractivo para peces y camarones (Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000). Sin embargo, debido a un incremento de su costo y un abastecimiento inestable, se ha pronosticado un panorama incierto para el desarrollo de la acuicultura, industria que mayormente consume este recurso, entre el 50 y 60% (Huntington y Hasan, 2009).

En términos prácticos de formulación de dietas con harina de pescado, esta ha sido hasta el momento, la fuente tradicional que suministra una fracción importante de la proteína en alimentos balanceados para peces. No obstante, la producción de esta materia prima se ha visto disminuida, al mismo tiempo que las harinas de buena calidad se han encarecido notablemente, por tal motivo el costo de esta

f fuente proteínica se ha incrementado en más del doble de su costo original al inicio de la última década (Figura 1). La alta calidad de esta fuente proteínica hace difícil encontrar un sustituto adecuado, sí bien, en la actualidad se están empleando sustituciones parciales, mediante mezcla de diversas fuentes de proteína, que pueden llegar a cubrir hasta la mitad de la proteína total en dietas comerciales (Tacon y Jackson, 1985). Por otra parte, los niveles de harina de pescado podrían disminuirse aún más, mediante el uso de otras materias primas ricas en proteínas, siempre que cubran los requerimientos de la especie en aminoácidos indispensables (Ketola, 1982).

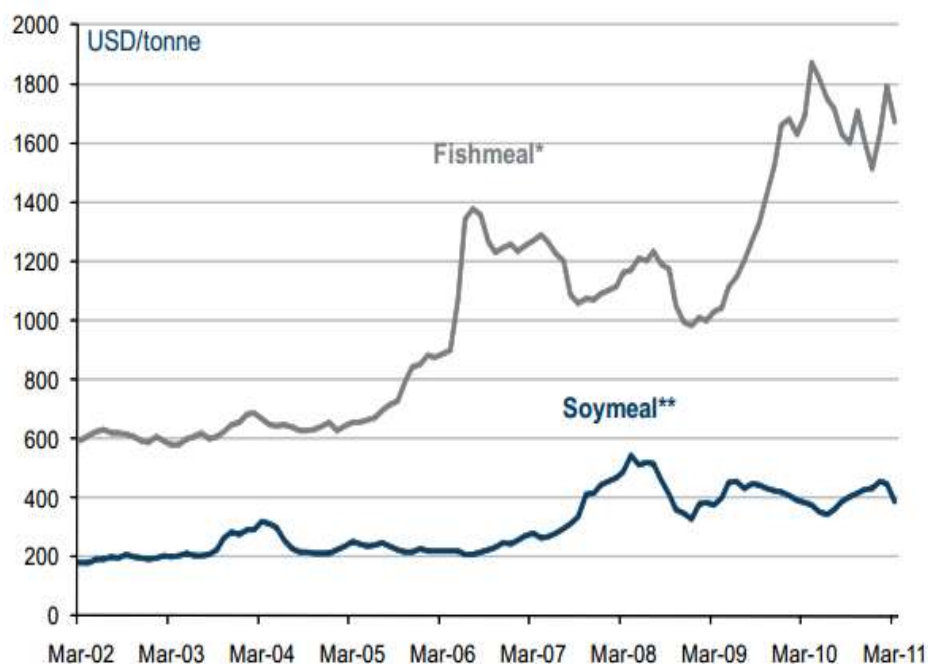


Figura 1 Variación del precio de la harina de pescado y harina de soya en la década del 2002 al 2011. Fuente: FAO Globefish Highlights, (2011).

La pesquería del krill antártico (*Euphausia superba*) ha estado operando por más de 35 años, y se ha destacado en varias ocasiones como una de las pesquerías más sobreexplotadas del mundo. Sin embargo en la última década, la captura anual es 40 veces menor que la captura anual precautoria (CCAMLR, 2010). La enorme producción natural del krill del género *Euphausia* en las aguas antárticas y

del Atlántico norte ha sido considerada como una importante fuente de proteína alternativa, que puede sustituir a la harina de pescado en la alimentación de especies de peces cultivadas. Su contenido proteínico (superior al 50%), composición de aminoácidos (Tabla 1), digestibilidad y características atractantes, son hechos que apoyan tal idea (Kader *et al.*, 2010).

La capacidad real de la sustitución de harina de pescado por harina de krill, se pone claramente de manifiesto al incorporarla a las dietas de trucha, en un intervalo del 26-59% de la dieta (35 hasta 80% de la proteína dietaria), lo que supone la total sustitución de la harina de pescado, obteniendo resultados de crecimiento, índices de conversión del alimento y una retención del nitrógeno semejantes a los de las dietas a base de harina de pescado o incluso llegándose a superar (Pfeffer y Becker, 1977).

Para mantener la sustentabilidad y reducir los costos en la producción de alimentos balanceados para acuicultura, el uso de diferentes proteínas y aceites de origen vegetal para la sustitución parcial o total de harinas y aceites de pescado en alimentos acuícolas ha sido investigado en varias especies (Turchini *et al.*, 2009). La harina de soya es la fuente de proteína vegetal más estudiada y empleada en las dietas para los peces; fundamentalmente en razón a su porcentaje proteínico y que posee una relativamente buena composición en aminoácidos indispensables (Tabla 1).

Por otra parte, su digestibilidad, comparable a la de la harina de pescado, asegura disponibilidad de aminoácidos suficientes para promover tasas de crecimiento aceptables, a pesar de su bajo contenido de metionina y lisina. Sin embargo, esto depende de un adecuado tratamiento tecnológico que elimine los factores anti nutricionales presentes en la soya. La harina de soya destaca entre otras fuentes vegetales ricas en proteínas, como el más prometedor sustituto vegetal de las harinas de pescado (Olsen y Hasan, 2012).

Tabla 1. Perfil de aminoácidos de las harinas de pescado, soya y krill. (AAg 100g⁻¹ proteína cruda)

Aminoácido	Fuente proteínica		
	H. de pescado	H. de Soya	H. de Krill
Arginina	5.92±0.14	8.42±0.08	9.23±0.28
Histidina	2.25±0.62	2.66±0.84	3.10±0.45
Isoleucina	4.12±1.10	5.45±1.12	7.39±0.98
Leucina	6.95±0.32	8.01±0.57	10.12±0.45
Lisina	7.32±0.17	5.60±0.32	8.76±0.25
Metionina	2.71±0.52	1.29±0.85	3.33±0.75
Fenilalanina	3.74±0.89	5.17±0.98	5.63±0.42
Tirosina	3.01±0.28	5.04±0.43	7.31±0.82
Treonina	3.88±0.63	3.81±0.75	4.52±0.84
Valina	4.99±0.42	5.17±0.84	6.42±0.65

Media±SD. Composición de aminoácidos determinada por HPLC; (Vázquez-Ortiz *et al.*, 1995)

En general, se admite que las fuentes proteínicas cuyo balance en aminoácidos indispensables es semejante al que presenta la proteína de los organismos a alimentar, son las de mejor calidad y promueven un crecimiento más rápido. La investigación de las posibilidades de utilización de una fuente proteínica en concreto, debe ir precedida, desde un punto de vista nutritivo, del conocimiento de los datos correspondientes a los requerimientos proteínicos de la especie sobre la que se va a ensayar, así como de los requerimientos cuantitativos para cada uno de los aminoácidos indispensables. Sobre esta base, se puede estudiar la satisfacción de estas necesidades a partir de diferentes proteínas o mediante una combinación adecuada de estas (Espinosa de los Monteros y Labarta, 1987).

2. ANTECEDENTES

2.1. Características de la especie

Los pargos (pertenecientes a la familia *Lutjanidae*), se caracterizan por ser dioicos, (sexos separados), ovíparos de fecundación externa, pueden presentar o no dimorfismo sexual en los patrones de estructura y color. Se reconocen por su distintivo contorno en la zona de la cabeza, sus mandíbulas son fuertes y están compuestas de robustos dientes caninos. Se distinguen de los robalos por poseer una mandíbula superior que se extiende sobre el lagrimal cuando la boca está cerrada, tiene una aleta pectoral puntiaguda, 10 espinas en la primera aleta dorsal y 2 o 3 en la aleta anal. En la mayoría de las especies la cola es bifurcada, la boca es larga y los ojos están localizados en lo alto de la cabeza; la línea lateral es bien marcada y las escamas son grandes.



Foto de Sánchez-Rodríguez, 2012

Figura 2 Pargo flamenco, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869)

El pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) (Figura 2), es una especie demersal, que habita en arrecifes costeros, hasta unos 30m de profundidad, generalmente solitario o en pequeños grupos, pero ocasionalmente forman grandes cardúmenes y se alimenta generalmente de organismos demersales como peces y crustáceos (Allen *et al.*, 1995); los juveniles viven en estuarios y bocas de río (Allen, 1985). Las capturas comerciales más importantes

de las pesquerías ribereñas de peces, en el estado de Guerrero, México, se basan principalmente en las familias Carangidae, Haemulidae, Ariidae y Lutjanidae. De esta última destacan por su volumen de captura y valor comercial las especies *Lutjanus peru* (1000 tm al año aproximadamente) y *L. guttatus* (650 tm al año aproximadamente) (Santamaría-Miranda, 1998).

2.2. Requerimientos nutricionales

El-Sayed y Teshima (1992) evaluaron distintos niveles proteínicos dietarios desde el 29 hasta el 51% y demostraron que con el 45% lograban el mayor crecimiento de juveniles de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). Por otra lado, en la cabrilla arenera (*Zacco barbata*) fue determinado un mayor crecimiento con nivel proteínico dietario del 32% y que el crecimiento se reduce considerablemente cuando la proteína dietaria se reduce a menos del 30% (Shyong *et al.*, 1998).

Watanabe *et al.* (2001), evaluaron en juveniles (12.2 g) de pargo criollo (*Lutjanus analis*), cuatro dietas isoproteínicas (45%) con variaciones en el contenido de lípidos (6, 9, 12 y 15%) bajo dos temperaturas controladas (25 y 30°C), respectivamente. El máximo crecimiento en los peces fue observado en las dietas con 6 y 9% de lípidos a 30°C.

Abdo de la Parra *et al.* (2010), analizaron el efecto de diferentes niveles de proteínas y lípidos totales en el crecimiento y supervivencia del pargo *Lutjanus guttatus*, al administrar dietas con 40, 45 y 50% de proteína y 9, 12 y 15% de lípidos. Los resultados indicaron que las dietas de 45 y 50% de proteína fueron las que obtuvieron mayor incremento de peso y tasa específica de crecimiento y que la variación entre ellas no era significativa; además, que la variación de los niveles de lípidos no tuvieron significancia. Por lo tanto, se recomienda que en las dietas de estas especies se incluya un contenido proteínico de al menos 45% y 9% de lípidos.

García-Ortega *et al.* (2010), evaluaron siete dietas experimentales sustituidas con 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 100% de concentrado proteínico de soya y con diferentes

niveles de metionina en las dietas del pargo flamenco *L. guttatus* y determinaron que el nivel óptimo de metionina para lograr el mayor crecimiento, es de 1.16% en el alimento o 2.6% de metionina con respecto al contenido proteínico y el mayor crecimiento lo determinaron con un 40% de reemplazo usando concentrado proteínico de soya.

2.3. Uso de la harina de krill como sustituto de harina de pescado

Schuchardt *et al.* (2003), evaluaron una inclusión de harina de krill del 25% en la dieta del bocinegro (*Pagrus pagrus*), y encontraron que no se observaron diferencias significativas entre la dieta referencia y la suplementada con harina de krill, tanto en tasa de crecimiento específico, como en peso ganado y peso final. Sin embargo, también advierten que el factor de conversión alimenticia se ve incrementado conforme los peces llegan a su talla máxima, ya que estos utilizan la energía no solo para el crecimiento, sino también para la actividad gonadal.

Karlsen *et al.* (2006), analizaron los efectos del uso del krill antártico en la calidad de crianza de los bacalao del antártico al sustituir en sus dietas la harina de pescado por harina de krill en un porcentaje de 22, 63 y 100%. Los análisis sensoriales y químicos mostraron una variación del pH no significativa, una mayor resistencia a la ruptura y una mejora de la coloración del músculo de los organismos alimentados con la inclusión del 63%.

Yoshitomi *et al.* (2007), sustituyeron parcial y totalmente (7.7%, 15.4%, 30.8%, 46.2% y 100%) la harina de pescado por harina de krill con bajo contenido en flúor, en la dieta de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Después de 95 días de tratamiento, la ganancia en peso de los organismos alimentados con las diferentes dietas no mostraron diferencias significativas y la supervivencia mostró una mejora con la dieta con la inclusión del 30.8%. El análisis de la composición química del músculo dorsal muestra una humedad de 75.5-76.0%, proteína cruda de 20.1-20.9%, grasa cruda de 2.5-2.9% y cenizas de 1.4-2.1%, no mostrando diferencias significativas con respecto a la dieta control.

Hansen *et al.* (2011), elaboraron una mezcla experimental a base de harina de krill y concentrado proteínico de guisantes en una relación de 3.5:1. Estos autores realizaron inclusiones en la dieta del salmon del Atlántico (*Salmo salar*) de 0, 158, 327, 487 y 750 g Kg⁻¹. El tratamiento se implementó por 100 días y se observó un incremento de la digestibilidad (de 93.2% a 97.1%) en comparación con la dieta control de harina de pescado, y la ganancia de peso fue mayor en la dieta con una inclusión de 487 g Kg⁻¹.

2.4. Uso de la harina de soya como fuente proteínica

Silva-Carrillo *et al.* (2012), evaluaron inclusiones de 0, 20, 40 y 60% de harina de soya, en sustitución de la harina de pescado en la dieta del pargo (*L. guttatus*), los autores obtuvieron los mejores resultados para crecimiento con la dieta incluida del 20% de harina de soya, la cual resultó similar que la dieta control. En contraste, las dietas con mayores inclusiones mostraron un menor rendimiento debido a la palatabilidad de las dietas.

Freitas *et al.* (2011), evaluaron el uso de concentrado proteínico de soya en dietas de juveniles de pargo criollo (*Lutjanus analis*). Concluyen que el uso del concentrado proteínico de soya afecta de manera negativa el consumo de alimento y el crecimiento, por lo que la dieta con mejor respuesta fue aquella que no contenía concentrado proteínico de soya, solo harina de pescado.

Zhou *et al.* (2005), sustituyeron parcialmente la harina de pescado por harina de soya en dietas para juveniles de cobia (*Rachycentron canadum*) al 10, 20, 30, 40, 50 y 60%. Los resultados mostraron que la inclusión óptima era de 18.92% de harina de soya y que cuando la dieta aumentaba su inclusión a más de 400g kg⁻¹, la tasa de conversión alimenticia era severamente afectada.

3. JUSTIFICACION ACADEMICA

La rentabilidad de la acuicultura está ligada a la oferta y demanda de alimentos con un alto nivel proteínico, ya que estos provocan el desarrollo intensivo o semi-intensivo del pez. Actualmente el ingrediente más utilizado en la acuicultura es la harina de pescado por tener un alto contenido proteínico, sin embargo, las cantidades que se emplean en las formulas, hacen que el costo de las dietas se incremente. El crecimiento en la demanda de la harina de pescado, ha provocado un incremento en el costo de producción y una disminución de la utilidad neta del acuicultor. Esto ha llevado a la investigación de algunos ingredientes, que pudieran sustituir total o parcialmente a la harina de pescado en las dietas, con la finalidad de mejorar la rentabilidad de la acuicultura. El pargo, *Lutjanus guttatus* es un pez marino de gran importancia económica, tanto en México como en varios países de Latinoamérica, que se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico del continente americano (Rojas-Herrera *et al.* (2004).

La harina de krill del Antártico (*E. superba*), es una fuente proteínica con un perfil de aminoácidos similar al de la harina de pescado, sin embargo contiene componentes que mejoran la palatabilidad del alimento e inducen en consumo. Dicha mejora, es aprovechada para incorporar mayores cantidades de fuentes proteínicas de origen vegetal y reducir costos, sin afectar el consumo del alimento.

4. HIPOTESIS

La mezcla de harinas de krill y soya en una relación 1:2.5, tendrá una calidad proteínica similar a la harina de pescado, por lo que el remplazo con esta mezcla en dietas para juveniles de pargo (*L. guttatus*) no afectara los parámetros productivos, eficiencia del alimento, química sanguínea, actividad enzimática, tejido del intestino medio y costo unitario de alimentación.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General:

Evaluar la eficiencia nutricional y económica de la sustitución parcial de harina de pescado por una mezcla de harina de krill (*Euphausia superba*) y soya (*Glycine max*) en la alimentación del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*).

5.2. Objetivos Específicos:

- Determinar el contenido de proteína, lípidos, humedad, cenizas y contenido de aminoácidos de las dietas con 0, 21, 45 y 71% de remplazo de la harina de pescado con la mezcla krill:soya.
- Evaluar el efecto de la mezcla KS en niveles de inclusión de 0, 21, 45 y 71% respectivamente, sobre la ganancia en peso, factor de conversión alimenticia, supervivencia, tasa de retención proteínica y utilización aparente de nitrógeno del pargo (*L. guttatus*), alimentado durante un periodo de 12 semanas.
- Medir la actividad específica de tripsina y proteasas alcalinas en ciegos pilóricos e intestinos, para determinar si existe inhibición enzimática en los diferentes tratamientos.
- Evaluar el estado de salud del pez mediante un análisis histológico y el análisis de los parámetros hematológicos (% hematocrito, hemoglobina, proteína plasmática y triglicéridos) cuando son alimentados con las dietas a base de HP y remplazos con la mezcla KS.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Análisis proximal

Los análisis de caracterización de las dietas y de cuerpos al inicio y final del experimento, se llevaron a cabo en el laboratorio de bromatología del CIAD- Unidad Mazatlán y de Nutrición acuícola del Instituto Tecnológico de Mazatlán. Siguiendo las técnicas estandarizadas por la (AOAC, 2011).

6.1.1. Análisis de Proteínas

El análisis de proteína se llevó a cabo por el método Micro-Kjeldahl AOAC 12.1.07 (2011) utilizando un equipo de digestión y destilación LABCONCO 65000 (LABCONCO CORPORATION, USA).

6.1.2. Análisis de lípidos

El contenido de lípidos fue determinado por el método de grasa cruda de Randall AOAC 4.5.05 (2011), usando éter de petróleo como solvente en un equipo FOSS Sox-Tec 2050 (Soxhlet Avanti 2050, Suecia).

6.1.3. Análisis de humedad

El contenido de humedad fue determinado por el método gravimétrico denominado por la AOAC (2011) como “Pérdida en el secado de alimentos” AOAC 4.1.06 a 105°C por un periodo de 12 horas en un horno CRAFT ESP (CRAFT, China).

6.1.4. Análisis de ceniza

El contenido de ceniza fue determinado con el método de calcinación a 550°C en una mufla (Fisher Scientific, Reino Unido) durante 12 horas, siguiendo el método AOAC 32.1.05.

6.1.5. Análisis proximal corporal

Para el análisis proximal corporal, se tomó una muestra de 10 peces del lote original de donde se realizó la siembra y 6 organismos por dieta (2 peces por tanque) al final del experimento, fueron sacrificados por inmersión térmica y homogenados en un molino para muestras húmedas FOSS Knifetec 1095 (FOSS Scino Co., China). Las muestras fueron analizadas siguiendo las técnicas oficiales de la AOAC (2011).

6.2. Perfil de aminoácidos

El perfil de aminoácidos se llevó a cabo siguiendo la técnica desarrollada por (Vázquez-Ortiz *et al.*, 1995) mediante la detección y cuantificación de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés). Dicho análisis se llevó a cabo en las cuatro dietas experimentales. Para los análisis de aminoácidos se empleó el sistema de cromatografía líquida Varian (Palo Alto, CA), modelo 9012 de alta resolución, adaptado con un detector Varian 9075 de fluorescencia, un inyector de capacidad de 10µl de volumen y una columna C18 (4.6 x 100 mm) empacada a 3 µm. La identificación y cuantificación de aminoácidos en las muestras se realizaron en dos pasos, hidrólisis y derivatización.

6.2.1. Hidrólisis

Aproximadamente 3 gr de muestra se sometieron a la eliminación de humedad y grasa por los métodos establecidos por la AOAC, 4.1.06 y 4.5.05 respectivamente. Posteriormente se pesaron 1mg de muestra por dieta y se colocaron dentro de tubos para hidrólisis (Pierce 29560) y se les adicionaron 3ml de HCl 6M. Se aplicó vacío durante 3min para posteriormente poner los tubos en un baño seco a 110°C durante 12 horas.

Para la eliminación del HCl 6M y la obtención de la muestra, este fue evaporado en un roto vapor a 65°C Brinkmann Buchi RE 121 (BUCHI Labortechnik AG,

Suiza) agregando 3 volúmenes de agua destilada por volumen de HCl 6M adicionado. Posteriormente la muestra se colectó usando un buffer de citrato de sodio 0.2N, pH 2.2.

6.2.2. Derivatización

Se tomó una alícuota de 100 μl del hidrolizado y se le añadió 40 μl de estándar interno 2.5 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ (ácido α -aminobutírico), este se aforó a 1ml con buffer de citrato de sodio pH 2.2. Se tomaron 250 μl del diluido y 250 μl de solución OPA en una jeringa para cromatografía. La mezcla de estas dos soluciones se dejó reposar por un tiempo justo de 2 min e inmediatamente después se pasó por un filtro (0.2 μm), por último se tomaron 10 μl del derivado y se eluyó a 1 ml min^{-1} en un cromatógrafo líquido con detector de fluorescencia (VARIAN ProStar , Alemania), equipado con una columna tipo C-18 a 40°C, usando una mezcla tampón de acetato de sodio 0.1 M (pH = 7.2):metanol:tetrahidrofurano 900:90:10 (v:v:v) como disolvente A y se utilizó metanol como disolvente B. El gradiente fue: 100% de A (0-0.5 min), 85% de A (0.5-6.5 min), 55% de A (6.5-18 min), 20% de A (18-23 min) y 0% de A (23-30 min). La concentración de aminoácidos fue determinado usando el detector de fluorescencia a longitudes de onda de excitación y emisión de 340 y 455nm, respectivamente y un estándar de aminoácidos de concentración conocida (Agilent Technologies, Alemania).

6.3. Descripción del área de bioensayos

El área donde se llevó a cabo el experimento, cuenta con 12 tanques cilíndricos de fibra de vidrio, color negro con fondo blanco de 3 m^3 de capacidad, cada uno con un dren central de 12 cm (Figura 10). Cada tanque estaba cubierto con malla sombra de 0.05 cm de luz de malla esto para evitar la salida de los peces y entrada de agentes externos. Cada tanque contó con sistema de aireación y flujo de agua continuo (9 L min^{-1} aproximadamente), con regulación para los casos necesarios El agua de mar fue bombeada desde playa Las Brujas y pasada a

través de filtros de arena y de cartuchos de 16 micrómetros de retención relativa (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2007).

6.4. Formulación de dietas experimentales

En la Tabla 2 se muestra la composición proximal de los ingredientes mayoritarios con los que se formularon las dietas. Se diseñó una mezcla compuesta con harina de krill y harina de soya desgrasada en una relación de 1:2.5, la cual se utilizó para hacer las inclusiones en las diferentes dietas experimentales. La relación 1:2.5 fue establecida tomando como referencia el nivel óptimo de inclusión del trabajo de Silva-Carrillo *et al.* (2012).

Tabla 2. Análisis proximal de materias primas (valores promedios \pm SD expresados en base seca).

Ingredientes	Materia seca	Proteínas	Lípidos	Cenizas	ELN
HP ^a	89.35 \pm 0.13	67.83 \pm 0.74	8.80 \pm 0.04	12.45 \pm 0.10	10.92 \pm 0.1
HS ^b	89.30 \pm 0.15	48.20 \pm 0.08	2.50 \pm 0.03	7.04 \pm 0.03	42.26 \pm 0.8
HK ^c	93.52 \pm 0.04	56.67 \pm 0.04	19.99 \pm 0.10	9.62 \pm 0.14	13.72 \pm 0.5
HC ^b	90.02 \pm 0.02	68.50 \pm 0.12	2.61 \pm 0.05	11.60 \pm 0.10	17.29 \pm 0.7
GT ^d	93.57 \pm 0.16	68.42 \pm 0.07	3.30 \pm 0.02	1.18 \pm 0.10	27.1 \pm 0.5

ELN (Extracto libre de nitrógeno) incluyendo fibra.

ELN = 100 – (% humedad + % proteína cruda + % lípidos crudos + % ceniza)

HP (harina de pescado), HS (harina de soya), HK (harina de krill), HC (harina de calamar), GT (gluten de trigo).

a Selecta de Guaymas, S.A. de C.V. Guaymas, Sonora, México.

b Proteínas marinas y Agropecuarias, S.A. of C.V., Guadalajara, Jalisco, México.

c PROAQUA, S.A. de C.V. Mazatlán, Sinaloa, México.

d Sigma-Aldrich Chemical, S.A. de C.V. Toluca, México State, México.

En la Tabla 3 se muestra la formulación de cuatro dietas experimentales iso proteínicas e iso lipídicas a 45% y 9%, respectivamente. Una dieta control (KS00) a base de harina de pescado y tres dietas experimentales con remplazo de la HP con la mezcla krill:soya (HKS) al 21, 45 y 71% (KS21, KS45 y KS71)

Tabla 3. Composición y análisis proximal de las dietas experimentales para juveniles de pargo flamenco, con inclusiones de 0, 21, 45 y 71% de la mezcla krill-soya.

INGREDIENTE (%)	Dietas			
	KS00	KS21	KS45	KS71
Harina de pescado	58.4	48.90	38.70	27.00
Harina de soya	0	9.00	18.75	30.00
Harina de krill	0	3.60	7.50	12.00
Harina de calamar	6.00	6.00	6.00	6.00
Gluten de trigo	2.00	2.00	2.00	2.00
Aceite de hígado de bacalao	3.20	3.27	3.34	3.41
Dextrina	25.25	22.08	18.56	14.44
Pre-mezcla de vitaminas ^a	0.20	0.20	0.20	0.20
Pre-mezcla de minerales ^b	0.08	0.08	0.08	0.08
Vitamina C	0.10	0.10	0.10	0.10
Carotenoides ^c	0.08	0.08	0.08	0.08
Antioxidante	0.05	0.05	0.05	0.05
Alginato	3.00	3.00	3.00	3.00
Lecitina de soya	1.50	1.50	1.50	1.50
Antifungico	0.15	0.15	0.15	0.15
Composición (% en base seca)				
Proteínas	44.90±0.39	45.33±0.51	45.23±0.07	45.12±0.36
Lípidos	8.88±0.08	9.21±0.03	9.19±0.08	9.23±0.04
Ceniza	8.60±0.11	8.91±0.12	9.26±0.05	9.75±0.11
ELN	37.58±0.13	36.52±0.08	36.28±0.06	35.91±0.03
Energía bruta (KJ g ⁻¹)	20.48	20.51	20.46	20.38

ELN (Extracto libre de nitrógeno) incluyendo fibra.

ELN = 100 – (% humedad + % proteína cruda + % lípidos crudos + % ceniza)

a Pre-mezcla de vitaminas: Vitamina A, 2400 IU o mg g⁻¹; Vitamina D3, 2250 IU; Vitamina E, 160 g; Vitamina K3, 8.00 g; Vitamina B1, 20.00 g; Vitamina B2, 40.00 g; Acido Pantoténico, 60.00 g; Acido Nicotínico, 160.00 g; Vitamina B6, 16.00 g; Ácido Fólico, 4.00 g; Vitamina B12, 80 mg; Biotina, 500 mg; Vitamina C, .2 g; Colina (como Cloruro).

b Pre-mezcla mineral: Manganeso, 100 g; Zinc, 160 g; Hierro, 200 g; Cobre, 20 g; Yodo, 5 g; Selenio, 0.40 mg; Cobalto 0.60 mg.

c DSM Nutritional Products Mexico S.A. de C.V., El Salto, Jalisco, Mexico.

La Tabla 4 muestra la composición de las dietas en gramos de aminoácidos por cada 100 g de materia seca, no mostrando diferencias significativas ($P \geq 0.05$) en el contenido de metionina y lisina.

Tabla 4. Composición de aminoácidos de las dietas experimentales.

Composición de aminoácidos	Dietas			
	KS00	KS21	KS45	KS71
Aminoácidos (AA g 100g ⁻¹ dieta seca)				
Arginina	4.79±0.44	5.53±0.06	4.66±0.37	4.86±1.76
Histidina	1.31±0.10	1.59±0.14	1.56±0.15	1.47±0.37
Isoleucina	1.23±0.21	1.85±0.06	1.53±0.06	1.12±0.15
Leucina	3.32±0.06	4.35±0.41	4.21±0.36	3.83±0.42
Lisina	^a 3.68±0.60	^a 3.98±0.27	^a 4.32±0.23	^a 4.58±0.19
Metionina	^a 1.56±0.22	^a 1.57±0.02	^a 1.54±0.06	^a 1.52±0.27
Fenilalanina	2.22±0.08	2.46±0.24	2.22±0.05	2.26±0.37
Taurina	0.17±0.01	0.17±0.01	0.18±0.00	0.17±0.24
Treonina	1.57±0.24	2.44±0.25	2.59±0.15	2.04±0.39
Valina	1.35±0.20	2.46±0.02	2.48±0.09	3.76±0.36

Los valores (la media ± SD, n=3) con superíndice distinto muestran existencia de diferencias significativas entre tratamiento $P < 0.05$ (Prueba de Tukey)

6.5. Elaboración de dietas experimentales

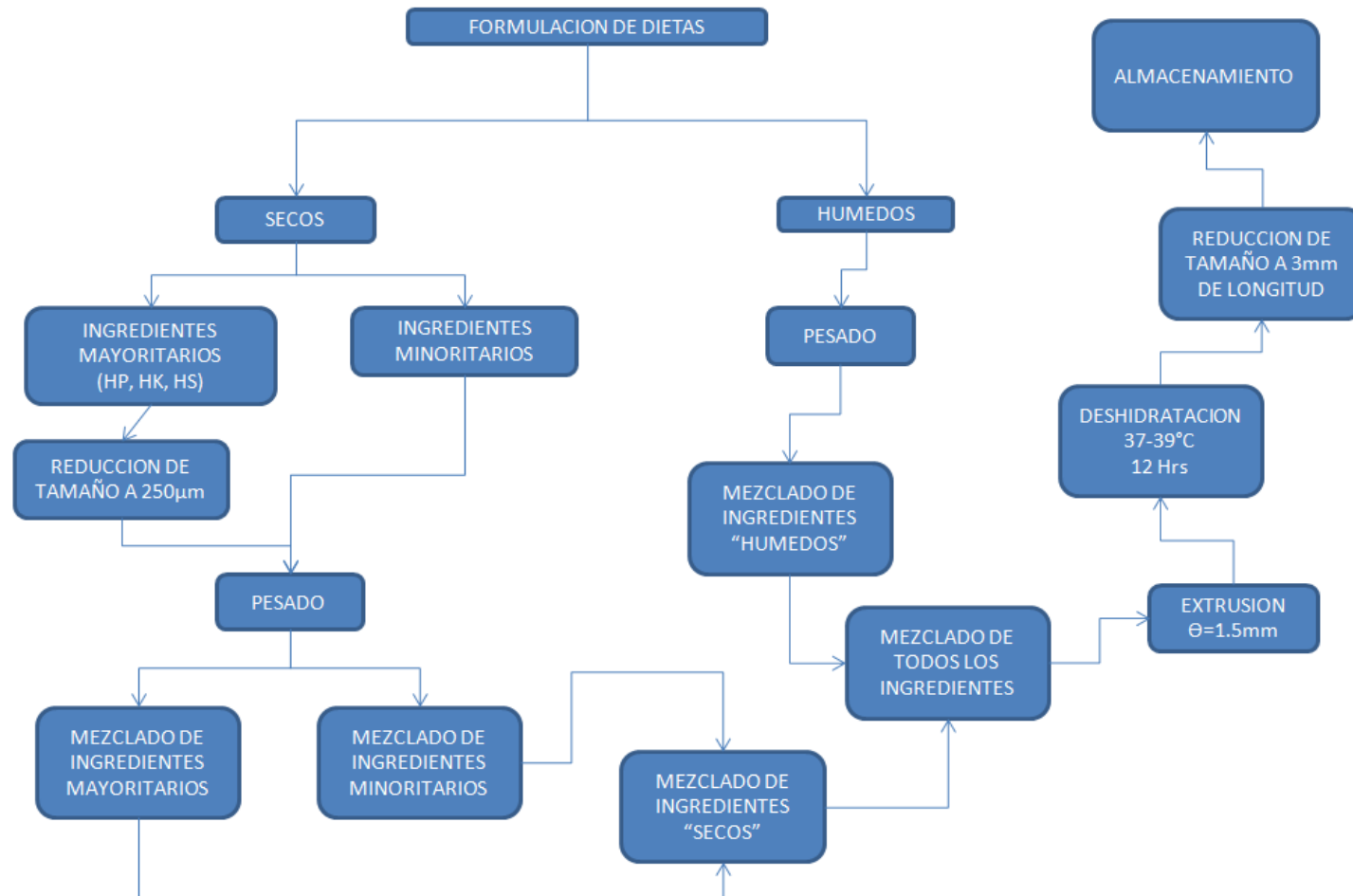


Figura 3 Protocolo de producción de dietas experimentales en la planta de alimentos del CIAD, Unidad Mazatlán. (Hernández *et al.*, 2010)

Las dietas fueron elaboradas en la planta de alimentos del CIAD-Unidad Mazatlán, siguiendo el procedimiento propuesto por Hernández *et al.* (2010). Se molieron los ingredientes mayoritarios (harinas de pescado, soya, krill, calamar y gluten de trigo) en un molino de martillo CHAMPION (CALIFORNIA PELLET MILL CO., EUA) y tamizados a un diámetro de partícula de 250µm. Posteriormente, los ingredientes fueron pesados en una báscula digital Scout Pro SP2001 (OHAUS, Suiza) con una precisión de 0.001g.

Una vez pesados todos los ingredientes, estos fueron homogenizados en una mezcladora marca Hobart AT-200 (HOBART, USA) de 5kg de capacidad, en el siguiente orden: primero se agregaron los ingredientes mayoritarios (excepto dextrina), y se homogenizaron por 5 minutos, después se agregó la dextrina y de nuevo se mezcló por 10 minutos, se incorporó agua para humedecer la mezcla y evitar que la dextrina quedara pegada en las paredes de la mezcladora. Posteriormente se incorporaron los ingredientes minoritarios (excepto aceite y lecitina) y se mezcló de nuevo por 10 minutos. Por último, se incorporaron los ingredientes líquidos, aceite de hígado de bacalao y lecitina de soya. Por último, se incorporó agua a 60°C suficiente para lograr una pasta homogénea y se dejó mezclar por otros 10 min.

Después las dietas fueron extruidas en un molino marca Torrey modelo 22 (TORREY, México) equipado con un dado de 3/32" (3mm). Las dietas extruidas fueron depositadas en un charolas tipo bastidor y deshidratadas por convección forzada a una temperatura de 37-39°C por un periodo de 12-18 horas.

Las dietas deshidratadas fueron sometidas a una reducción de tamaño manual, para lograr pellets con la longitud adecuada para su ingesta a 3mm de largo (Figura 4). Por último las dietas fueron almacenadas en el cuarto frío de la planta de alimentos del CIAD-Unidad Mazatlán a una temperatura de 3°C.

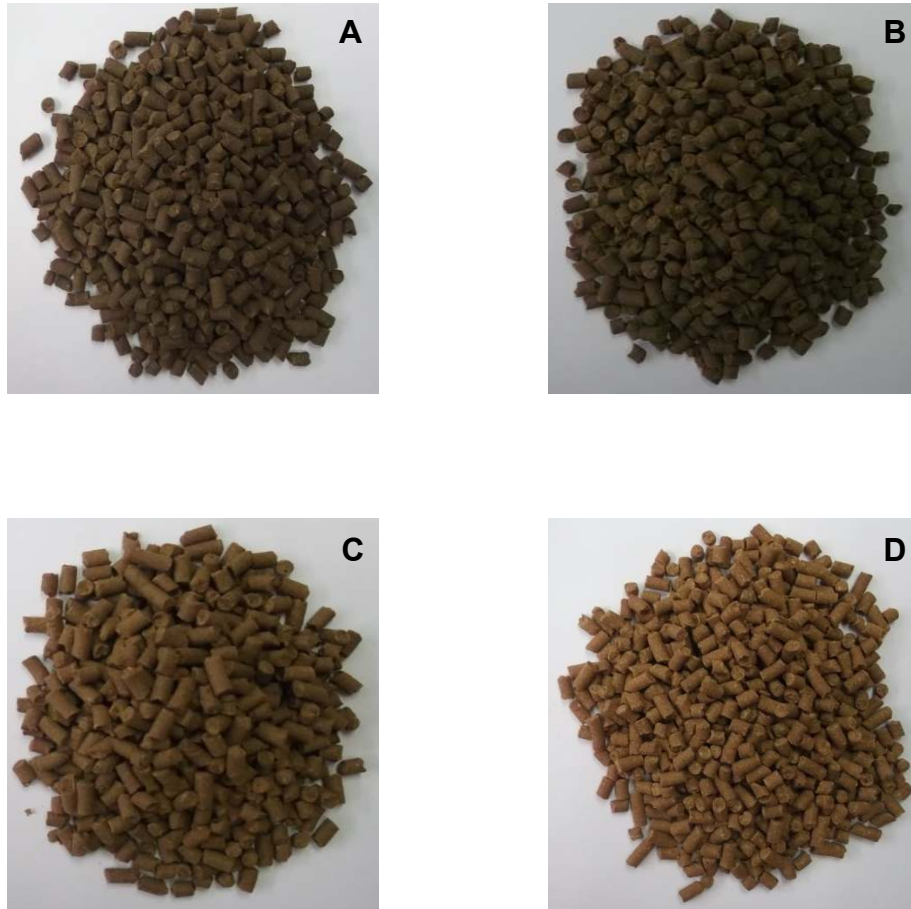


Figura 4 Dietas experimentales (A) KS00, (B) KS21, (C) KS45 y (D) KS71

6.6. Origen de los organismos

Los juveniles de pargo flamenco (*L. guttatus*) para el experimento, fueron producidos en la planta piloto de peces marinos del CIAD, siguiendo los protocolos ya establecidos para el desove y cultivo larvario (Abdo de la Parra *et al.*, 2010).

6.7. Diseño experimental

6.7.1. Área de bioensayo

En la Figura 4 se muestra el área de bioensayo donde se llevó a cabo el experimento, la cual cuenta con 12 tanques cilíndricos de fibra de vidrio, color negro con fondo blanco de 3 m³ de capacidad y 2 m³ de volumen útil, cada uno

con un dren central de 12 cm (Figura 5). Cada tanque estaba cubierto con malla sombra de 0.05 cm de luz de malla esto para evitar la salida de los peces y entrada de agentes externos. Cada tanque contó con sistema de aireación y flujo de agua continuo (9 L min.^{-1} aproximadamente), con regulación para los casos necesarios El agua de mar fue bombeada desde playa Las Brujas y pasada a través de filtros de arena y de cartuchos de 16 micrómetros de retención relativa (Alvarez-Lajonchere *et al.*, 2007).



Figura 5 Área de bioensayos

6.7.2. Diseño de implementación de dietas

En cada tanque se colocaron 40 juveniles de pargo flamenco, con un peso promedio inicial de $33.75 \pm 1.66 \text{ g}$. Fue necesario un periodo de aclimatación debido a que los peces fueron criados en cautiverio con una dieta diferente a las experimentales, aunque no se presentaron condiciones experimentales distintas a las ya prevalecientes durante la fase larval.

Se consideró como día 1 del bioensayo, al tercer día de alimentación con la dieta correspondiente a cada tanque; ya que debe asegurarse que los peces en su totalidad acepten sin problema el alimento. Cada tratamiento se evaluó por

triplicado durante 12 semanas. La distribución de los tratamientos se realizó al azar, mediante sorteo sin reemplazo y los tanques se marcaron para su identificación.

6.7.3. Alimentación

El dosificación del alimento a cada tanque fue de forma manual tres veces al día (8:00, 12:00 y 18:00 horas), hasta saciedad aparente de los organismos. Diariamente se limpió el fondo de los tanques para coleccionar posibles restos de alimento y eliminar desechos orgánicos de los peces. Así mismo, se registró el consumo diario de alimento de cada tanque. Durante los días en que realizaron biometrías solo se ofreció la alimentación de las 18:00 horas, ya que el consumo se ve reducido por el estrés provocado por la manipulación.

6.7.4. Parámetros ambientales

Se realizó un monitoreo diario de los parámetros ambientales (temperatura, salinidad y oxígeno disuelto), durante las 12 semanas del experimento. Y los resultados fueron: temperatura $30.82 \pm 0.51^{\circ}\text{C}$, salinidad $33.75 \pm 0.78\%$ y oxígeno disuelto $6.46 \pm 0.55 \text{ mg L}^{-1}$.

6.8. Evaluación biológica

La evaluación biológica se llevó a cabo cada 14 días, para conocer el crecimiento en peso y calcular la supervivencia. En cada biometría los organismos fueron extraídos de los tanques con red y llevados a un contenedor para ser sedados con esencia de clavo como anestésico diluido al 50% con alcohol etílico de 96° , en una dosis de 0.05 ml L^{-1} de agua de mar. Los peces sedados fueron extraídos con red y secados sobre toallas para eliminar el exceso de humedad, evitando reseca la cabeza y sobre todo los ojos. Se determinó el peso de cada organismo en una balanza analítica con precisión de $\pm 0.1 \text{ g}$ y la longitud total con un ictiómetro

convencional. Los índices biológicos nutricionales calculados al término del estudio fueron (Kader *et al.*, 2010):

Peso ganado:

$$PG = \text{Peso promedio final (g)} - \text{Peso promedio inicial (g)}$$

Tasa de crecimiento:

$$TC = \frac{\text{Peso ganado (g)}}{\text{Peso inicial promedio (g)}} \times 100$$

Tasa específica de crecimiento:

$$TEC = \frac{\ln \text{Peso final (g)} - \ln \text{Peso inicial (g)}}{\text{Número de días (día)}} \times 100$$

Supervivencia:

$$S = \frac{\text{Número de organismos final}}{\text{Número de organismos inicial}} \times 100$$

Tasa de conversión alimenticia:

$$TCA = \frac{\text{Alimento consumido (g)}}{\text{Peso ganado (g)}}$$

Índice de eficiencia proteínica:

$$PER = \frac{\text{Incremento en peso (g)}}{\text{Proteína consumida (g)}}$$

Utilización aparente del nitrógeno:

$$UAN = \frac{\text{Proteína corporal final (g)} - \text{Proteína corporal inicial (g)}}{\text{Proteína consumida (g)}} \times 100$$

6.9. Índices biológicos corporales

Al final del experimento se tomó una muestra de 6 organismos por dieta (2 por tanque). Los cuales fueron sacrificados por inmersión térmica. Se midió la longitud total, fueron pesados y eviscerados para obtener el peso del paquete visceral, hígado y grasa visceral. Los índices biológicos se obtuvieron siguiendo las siguientes ecuaciones:

Factor de condición, el cual es una relación entre el peso y la longitud de los organismos, ofreciendo información indirecta sobre el crecimiento.

$$CF = \frac{\text{Peso total del cuerpo (g)}}{[\text{Longitud total del cuerpo (cm)}]^3} \times 100$$

El índice viscerosomático, relaciona el peso del paquete visceral con el peso del organismo.

$$VSI = \frac{\text{Peso de vísceras (g)}}{\text{Peso total del cuerpo (g)}} \times 100$$

El índice hepatosomático es una relación entre el peso del hígado y el peso del organismo, ofreciendo información sobre el sub o sobre desarrollo del hígado, indicativo de una posible patología.

$$HSI = \frac{\text{Peso de hígado (g)}}{\text{Peso total del cuerpo (g)}}$$

La relación de grasa intraperitoneal, relaciona la cantidad de grasa que el organismo tiene en la cavidad ventral, con el peso total del organismo, estimando el grado de acumulación grasa.

$$IPF = \frac{\text{Peso húmedo de grasa (g)}}{\text{Peso total del cuerpo (g)}} \times 100$$

6.10. Indicadores hematológicos

Se tomó una muestra de 10 organismos del lote de donde se efectuó la siembra y 6 organismos por dieta al final del tratamiento para la extracción sanguínea. Para ello los organismos no fueron alimentados durante 24 horas previas y las extracciones se llevaron a cabo usando jeringas para insulina de 1 ml con una punción directa en la vena caudal (Figura 6), cuando los peces estaban anestesiados con extracto de clavo como anestésico diluido al 50% con alcohol etílico de 96°, en una dosis de 0.05ml L^{-1} de agua de mar.

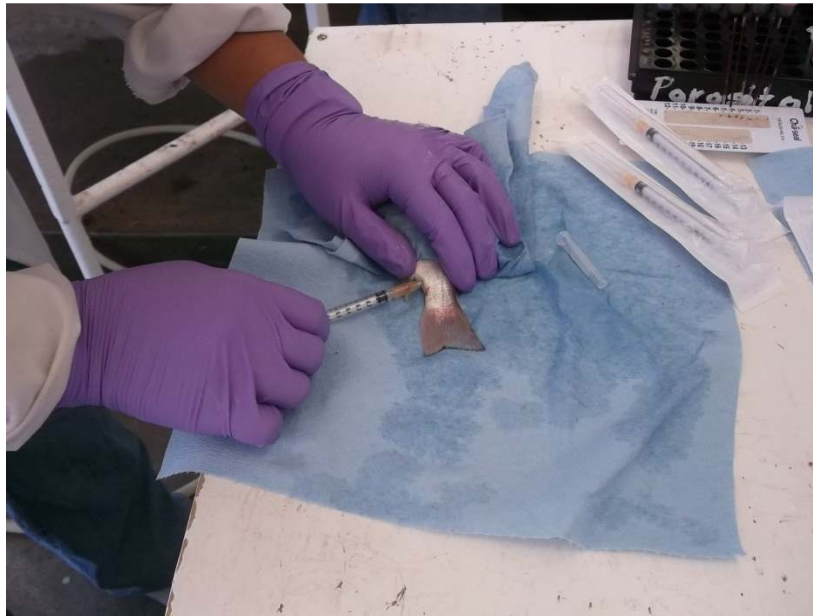


Figura 6 Extracción sanguínea de la vena caudal del pez

Posteriormente la sangre se distribuyó inequitativamente en tubos eppendorf de 1ml (2/3 del volumen extraído) y en tubos microtainer con heparina como anticoagulante (1/3 del volumen extraído).

Los tubos eppendorf fueron centrifugados a 7000 rpm por 10 min y el sobrenadante (suero) fue colocado en un segundo tubo eppendorf y congelado a -20°C para los análisis de triglicéridos y proteína.

6.10.1. Hematocrito

Se cuantificó empleando la técnica descrita por Del Rio-Zaragoza *et al.* (2008). En un tubo capilar heparinizado se tomó una muestra hasta llenar 2/3 de la longitud total del tubo, uno de los extremo fue sellado con una mezcla de pegamento y bicarbonato de sodio, se colocaron en una centrifuga para micro-hematocrito P600 (SOL-BAT, México) con el extremo cerrado hacia la parte externa del circulo de centrifugación. Fueron centrifugados por 10 min y se determinó el porcentaje del paquete celular con respecto al volumen total de sangre usando un lector para micro-hematocrito (Mytutoyo, México).

6.10.2. Proteína plasmática

La proteína plasmática se midió en suero utilizando el kit de Biuret (Biosystems, España). Para ello se colocó 20 µl de suero con 1 ml de reactivo en una celda de plástico, se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente y se midió a una longitud de onda de 545 nm, utilizando agua destilada como blanco y una solución de concentración conocida como patrón de referencia.

Cálculos:

$$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{Patrón}} = C_{\text{Muestra}}$$

Donde;

A_{muestra} = Absorbancia de muestra

C_{Patron} = Concentración del patrón

A_{Patron} = Absorbancia del patrón

C_{Muestra} = Concentración de muestra

6.10.3. Triglicéridos

Los triglicéridos son hidrolizados por una lipasa específica liberando ácidos grasos y glicerol. El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del kit (Grupo Mexlab, México). El cual consistió en hacer reaccionar 1 ml de reactivo con 0.01 ml de suero y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min, posteriormente se leyó por espectrofotometría a una longitud de onda de 545 nm, usando reactivo como blanco. Se preparó un estándar para la cuantificación de triglicéridos con una solución de concentración conocida.

$$\text{Triglicéridos (mg dl}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times 200$$

6.10.4. Hemoglobina

La hemoglobina se determinó mediante un kit colorimétrico (Randox Laboratories LTD, Reino Unido), para ello se tomaron 10 µl de sangre heparinizada de los tubos microtainer almacenados a -20°C y se hicieron reaccionar con 2.5 ml de reactivo, se dejó reposar por un periodo de 3 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Se midió contra agua destilada.

Cálculos;

$$\text{Concentración de hemoglobina} = \text{Abs}_{\text{Muestra}} \times 36.77 \text{ (g/dl)}$$

6.11. Actividad enzimática

El análisis de actividad enzimática, se llevó a cabo en el laboratorio central de la unidad multidisciplinaria de docencia e investigación (UMDI), de la Facultad de Ciencias Campus Sisal, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en Sisal, Yucatán, México.

6.11.1. Extractos enzimáticos

Se tomaron 6 organismos por tratamiento los cuales se dejaron de alimentar 24 horas previas a la extracción. Fueron sacrificados por inmersión en agua-hielo. Los 24 organismos fueron disecados y se obtuvo de ellos los ciegos pilóricos y el intestino completo, los cuales fueron pesados y congelados en hielo seco, para su posterior secado por liofilización (LABCONCO FreeZone1, EUA).

Posteriormente fueron pulverizados con nitrógeno líquido y homogenizados con un Ultra-turrax T18 Basic (IKA Works.EUA), usando un buffer 50 mM de Tris-HCl y 20 mM de CaCl₂ a pH 7.5, en una relación de 1:10 v w⁻¹ con respecto al peso del órgano. El homogénado fue centrifugado a 12000 rpm por 30 min a una temperatura de 4°C en una microcentrífuga IEC Centra-MP4R. El sobrenadante fue colectado en alícuotas de 1 ml y congelado con nitrógeno líquido, posteriormente fue almacenado a -40°C hasta su análisis.

6.11.2. Determinación de proteína soluble

La determinación de la proteína soluble se llevó a cabo siguiendo la técnica de análisis de Bradford (Bradford, 1976). A 5 µl de solución problema se adicionó 1 ml de reactivo de Bradford y se agitó con ayuda de un Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Inc., USA). Se midió la densidad óptica a 595 nm en un espectrofotómetro uv/visible entre los 15 y 60 minutos del comienzo de la reacción colorimétrica. Se elaboró una recta patrón con una solución estándar de albumina bovina (1 mg ml⁻¹). Los extractos tuvieron que ser diluidos a 500x con la finalidad de que las lecturas de absorbancia fueran similares a las de la curva patrón y con ello lograr la determinación de concentración de proteína.

7.12.2 Calculo de actividades específicas

Las actividades específicas de tripsina y proteasas alcalinas, fueron determinadas usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Unidades/ml} = \frac{\Delta \text{abs} \times \text{Vol final}_{\text{Reaccion}}(\text{ml})}{\text{CEM} \times \text{tiempo}(\text{min}) \times \text{Vol extracto}(\text{ml})}$$

$$\text{Unidades/mg proteína soluble} = \frac{\text{Unidades/ml}}{\text{mg proteína soluble/ml}}$$

Donde;

$\Delta \text{abs} = \text{Abs problema} - \text{Abs blanco}$ $\text{CEM} = \text{Coeficiente de extinción molar}$

6.11.3. Proteasa alcalina

Se determinó por el método de (Kunitz, 1946), modificado por (Walter, 1984) usando caseína al 0.5% como sustrato en una solución tampón 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ a un pH 9. Se añadió 20 µl de extracto enzimático a 1 ml de sustrato de caseína al 0.5%, se incubó a 37°C y la reacción se detuvo con ácido tricloroacético (TCA al 20%). Se dejó reposar la reacción por un periodo de 15 min a 4°C y posteriormente se centrifugo a 12000 rpm durante 5 min. En el sobrenadante se midió la cantidad de tirosina liberada por espectrofotometría a una absorbancia de 280 nm en celdas de cuarzo. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µg de tirosina por minuto. El CEM de la tirosina fue de 5000 cm⁻¹ M⁻¹.

6.11.4. Tripsina

Se utilizó el método de (Erlanger *et al.*, 1961). Se preparó una solución 100 mM de BAPNA (N α -Benzoil-DL-Arginina-P-NitroAnilida) en 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) y se llevó a 100 ml usando tampón 50 mM de Tris-HCl y 10 mM CaCl₂ a pH 8.2. Para iniciar la reacción se mezcló 1.25 ml de sustrato (a 37 °C) con 20 µl del extracto enzimático. Después de 30 min de incubación, la reacción se detuvo adicionando 250 µl de ácido acético al 30%. A continuación, se midió la absorbancia a 410 nm utilizando un blanco como control. La unidad de actividad se definió de acuerdo con (Dimes *et al.*, 1994). Una unidad de actividad es 1 µmol

de p-nitroanilida liberada por minuto usando como coeficiente de extinción molar $8800 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

6.12. Análisis histológico

El análisis histológico se llevó a cabo en el laboratorio de histopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán (CIAD, A.C.), en Mazatlán, Sinaloa, México.

Se tomó una muestra de 6 organismos al azar de cada tratamiento al finalizar el experimento. Se realizó una disección completa de cada organismo para extraer y fijar los intestinos de manera individual con formol al 10% (Kamonporn *et al.*, 1999). Después de haber sido fijados, los intestinos fueron colocados en moldes Tissue-Tek unicassette #4170. Posteriormente fueron sumergidos en soluciones alcohólicas a diferentes concentraciones (70, 80 y 96%) con la finalidad de deshidratar los órganos, después fueron aclarados en xilol, el cual funciona como un medio de difusión que permite la entrada de parafina al órgano.

Posteriormente los órganos fueron embebidos en parafina (Histoembebedor Leica-Jung, EUA). Los bloques que pertenecían a los tejidos duros fueron descalcificados. Se realizaron cortes transversales a $5 \mu\text{m}$ de profundidad en un micrótopo rotatorio (Jung Histocut Leica #820), los cortes obtenidos se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina y se montaron con bálsamo de Canadá para su estudio histopatológico (Drury y Wallington, 1980, Luna, 1968). Por último, se midió la anchura de la lámina propia de 25 vellosidades de intestino medio por organismo, para determinar la existencia o ausencia de enteritis en estas. Las imágenes de intestino fueron obtenidas usando un microscopio OLYMPUS (CH-30 RF100, Japón) equipado con una cámara MicroPublisher 3.3 (QImaging, Canadá) y el software QCapture Pro v6.0.0.605 (Media Cybernetics Inc. and QImaging Inc.). Las mediciones se realizaron usando el software Image Tool v3.00 (UTHSCSA, USA).

6.13. Análisis estadísticos

Los valores presentados en porcentajes fueron transformados al arco-seno de la raíz cuadrada de la proporción correspondiente, para cumplir con el supuesto de normalidad, debido a que este tipo de valores tienden a una distribución no normal. Para cada parámetro se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad con la prueba de Levene. Los datos de evaluación biológica (PG, TC, TCE, S, TCA, PER y UAN), indicadores biológicos corporales (CF, HSI, VSI y IPF), bio indicadores hematológicos (hematocrito, proteína, hemoglobina y triglicéridos), análisis enzimático (actividad específica de tripsina y proteasas alcalinas), presentaron una distribución normal y fueron homocedásticos. Se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), con el paquete estadístico Statistica 7 (StatSoft, Inc. USA), usando el número de dietas como variables independientes. La prueba a posteriori de Tukey se realizó para determinar los efectos entre las dietas con intervalo de confianza del 95%. Los datos de espesor de lámina propia del análisis histológico, no fueron homocedásticos y se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con un intervalo de confianza del 95% (Zar, 1996).

Los datos de crecimiento y nivel de reemplazo fueron comparados en una función polinomial de segundo orden o cuadrática para un diseño experimental “dosis:respuesta” (Quinn y Keough, 2002), con la cual se analizó la relación entre la tasa de crecimiento del pargo (*L. guttatus*), como respuesta al nivel de reemplazo de la harina de pescado por la mezcla krill-soya. El coeficiente de correlación se determinó por un sistema matricial de eliminación Gaussiana, hasta lograr una matriz diagonal y el valor de x se determinó calculando el Y_{max} de una parábola negativa.

6.14. Análisis económico

La evaluación económica de los resultados de este estudio será realizada mediante el uso del modelo propuesto por (Clifford, 1992), el cual consiste en calcular el costo unitario de alimentación (CUA) o costo de alimento necesario

para producir una unidad de peso. El costo de las dietas se determinará considerando solo el costo de la inclusión de cada ingrediente experimental y la harina de pescado en cada formulación, ya que el resto de los ingredientes se adicionan en la misma cantidad.

$$\text{CUA} = (\text{Precio del kg de alimento}) \times (\text{FCA})$$

7. RESULTADOS

7.1. Análisis proximal corporal

Los resultados del análisis corporal al inicio del experimento en base húmeda fueron: 66.54% de humedad, 18.16% de proteína, 7.59% de lípidos, 5.33% de ceniza y 2.39% de extracto libre de nitrógeno. Los valores son el promedio de 3 replicas \pm SD. Los resultados porcentuales en base húmeda del proximal corporal al terminar el experimento, también son el promedio de 3 replicas \pm SD y son presentados en la tabla 5.

Tabla 5. Composición proximal corporal en base húmeda (valores promedios \pm SD expresados en base húmeda).

Composición proximal (%)	Dietas			
	KS00	KS21	KS45	KS71
Humedad	64.23 \pm 0.35 ^a	62.74 \pm 0.36 ^b	61.50 \pm 0.20 ^c	64.85 \pm 0.23 ^a
Lípidos	12.83 \pm 0.08 ^b	14.63 \pm 0.09 ^a	14.64 \pm 0.29 ^a	12.64 \pm 0.05 ^b
Cenizas	4.83 \pm 0.08 ^a	4.55 \pm 0.13 ^a	4.74 \pm 0.11 ^a	4.79 \pm 0.17 ^a
Proteína	17.10 \pm 0.09 ^b	16.80 \pm 0.17 ^b	18.11 \pm 0.22 ^a	16.88 \pm 0.21 ^b
ELN	1.00 \pm 0.35 ^a	1.16 \pm 0.11 ^a	1.02 \pm 0.25 ^a	0.65 \pm 0.16 ^a

ELN (Extracto libre de nitrógeno) incluyendo fibra.

ELN = 100 – (% humedad + % proteína cruda + % lípidos crudos + % ceniza)

Superíndice distinto denota diferencia significativa entre dietas $P \leq 0.05$ (Prueba de Tukey).

7.2. Evaluación biológica

En la Tabla 6 se muestran los parámetros de crecimiento, así como la eficiencia alimentaria después de 12 semanas de experimentación.

Tabla 6. Parámetros de crecimiento y eficiencia del alimento de pargo flamenco en 12 semanas de experimentación.

Parámetros	Dietas			
	KS00	KS21	KS45	KS71
PI (g)	33.75 ^a ±0.85	33.75 ^a ±0.12	33.75 ^a ±1.13	33.75 ^a ±0.72
PF (g)	109.83 ^{ab} ±0.65	116.37 ^{ab} ±2.23	119.41 ^a ±0.37	105.92 ^b ±7.02
PG (g)	76.08 ^{ab} ±7.72	82.62 ^{ab} ±2.23	85.66 ^a ±0.37	72.17 ^b ±7.02
CAI (g pez ⁻¹)	110.24 ^{ab} ±7.72	123.41 ^a ±5.74	117.14 ^{ab} ±5.30	99.77 ^b ±3.22
TC (%)	225.41 ^{ab} ±1.93	244.80 ^{ab} ±6.62	253.81 ^a ±1.10	213.84 ^b ±2.81
TCA	1.45 ^a ±0.09	1.40 ^a ±0.02	1.37 ^a ±0.06	1.44 ^a ±0.04
TEC (% día ⁻¹)	1.40 ^{ab} ±0.01	1.47 ^{ab} ±0.02	1.50 ^a ±0.00	1.36 ^b ±0.08
Supervivencia	100 ^a ±0.00	100 ^a ±0.00	100 ^a ±0.00	98.33 ^a ±2.89
PER	1.70 ^a ±0.11	1.72 ^a ±0.02	1.77 ^a ±0.07	1.69 ^a ±0.04
UAN	28.26 ^b ±0.76	27.97 ^b ±0.42	31.18 ^a ±0.64	27.94 ^b ±0.25

Los valores (la media ± SD, n=3) con superíndice distinto muestran existencia de diferencias significativas entre tratamiento P<0.05 (Prueba de Tukey). PI= Peso inicial promedio; PF = Peso final promedio; PG = Peso ganado (incremento en peso); CAI = Consumo de Alimento Individual; TC = Tasa de Crecimiento; TCA = Tasa de Conversión Alimenticia; TEC = Tasa Específica de Crecimiento; S = Supervivencia; PER = Índice de eficiencia proteínica; UAN = Utilización aparente del nitrógeno.

7.2.1. Peso final

El peso promedio individual de los organismos al final del experimento, alimentados con la dieta KS45, fue significativamente mayor que el mostrado por los peces correspondientes a las dietas KS00 y KS71. Sin embargo el peso promedio final de los peces alimentados con esta dieta, no fue diferente de los organismos alimentados con la dieta KS21.

7.2.2. Peso ganado

En la Figura 7 se observa el comportamiento del crecimiento durante las 12 semanas de experimentación. El crecimiento a las 8 semanas (56 días), de los peces alimentados con la dieta KS45 es diferente de los que fueron alimentados

con las dietas KS00 y KS71. Sin embargo no fue diferente del crecimiento de los organismos alimentados con la dieta KS21, esta tendencia de crecimiento se mantuvo hasta el final del experimento.

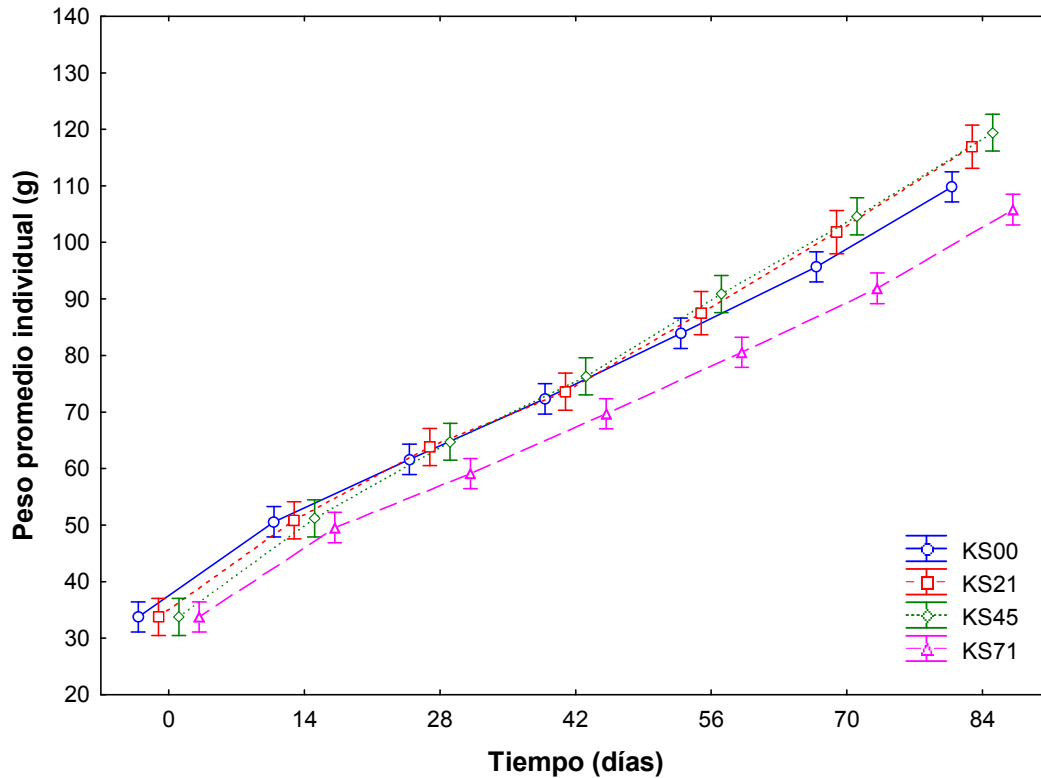


Figura 7 Incremento en peso del pargo flamenco, alimentados con las dietas experimentales por 12 semanas. Los datos son la media de una $n=120 \pm SD$.

La dieta KS45 mostró una mayor ganancia en peso al término del experimento (85.66g), sin embargo esta no fue diferentes con la dieta control KS00 (76.08g) y la dieta KS21 (82.62g). Por otra parte, si resultó significativamente superior a la dieta KS71 (Figura 7).

7.2.3. Tasa de crecimiento

En la Figura 8 se muestra que el valor más alto de crecimiento expresado en porcentaje, se presentó con la dieta KS45, el cual fue diferente de la dieta KS71; las dietas control KS00 y KS21 no resultaron diferentes de las dietas anteriores.

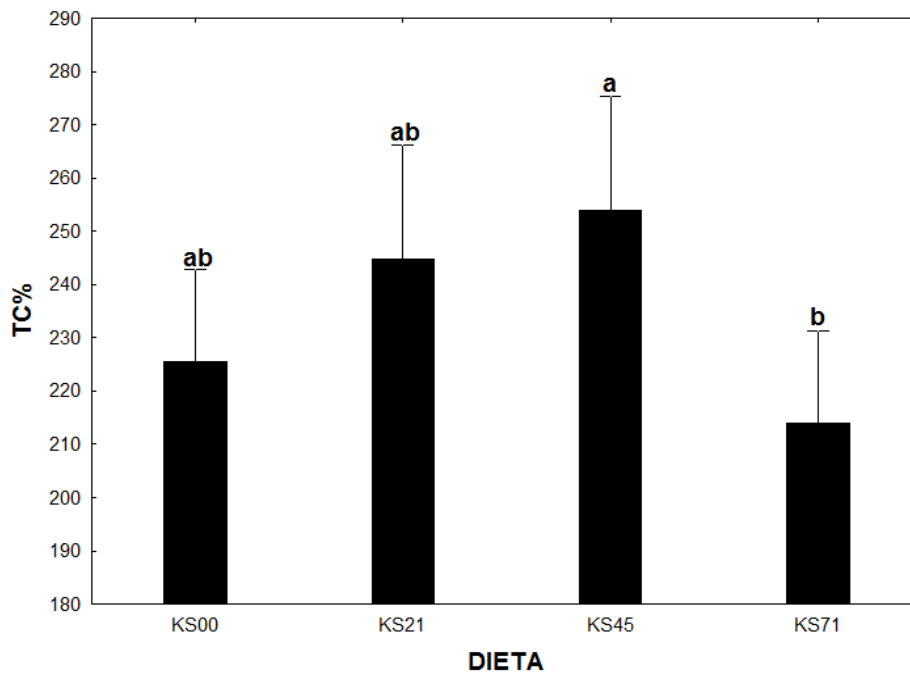


Figura 8 Tasa de crecimiento del pargo flamenco, alimentados con las dietas experimentales por 12 semanas. Los datos son la media de una $n=3 \pm SD$. Superíndice distinto denota diferencia significativa entre dietas ($P \leq 0.05$).

7.2.4. Tasa específica de crecimiento

Al igual que la tasa de crecimiento, la tasa específica de crecimiento se presentó en los organismos alimentados con la dieta KS45, resultado no diferente al presentado por los organismos que fueron alimentados con las dietas control KS00 y KS21. Sin embargo, fue superior al crecimiento diario de los peces alimentados con la dieta KS71.

7.2.5. Nivel óptimo de inclusión

La Figura 9 muestra la función polinomial de segundo orden que relaciona el nivel de remplazo con la tasa de crecimiento. El 96.19% de variabilidad es explicada por el modelo ($Y = -0.0261x^2 + 1.757x + 223.76$). El análisis cuadrático revela que el nivel de remplazo que logra el mayor crecimiento, es de 33.65%.

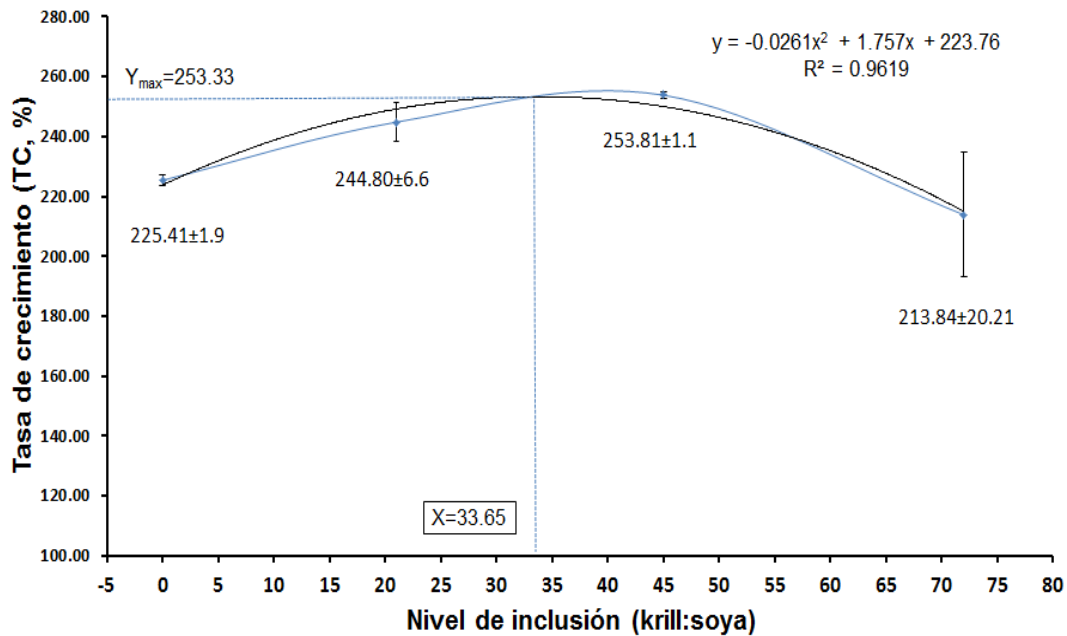


Figura 9 Análisis de regresión polinomial de segundo orden, relacionando el nivel de inclusión de la mezcla krill-soya con el peso ganado.

7.2.6. Consumo de alimento individual

El tratamiento que mostró un mayor consumo de alimento individual, fue el correspondiente a la dieta KS21, el cual no fue significativamente diferente al mostrado por los organismos alimentados con las dietas control KS00 y KS45. Sin embargo, sí fue diferente de la dieta KS71, la cual tiene el nivel más alto de inclusión de la mezcla krill:soya. Por otro lado, la dieta KS71, no mostró diferencias con respecto de las dietas KS00 y KS45 (Figura 10).

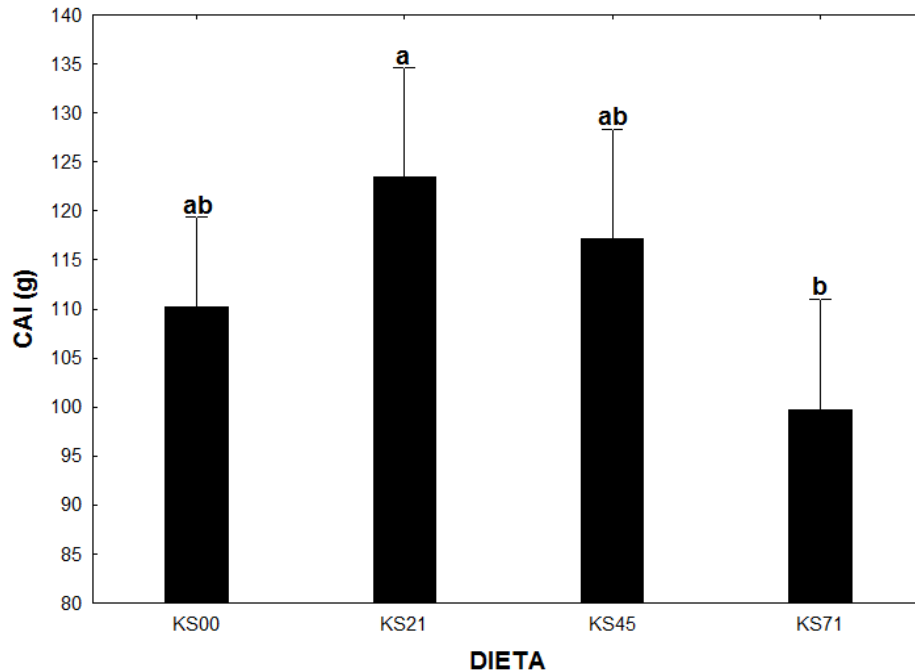


Figura 10 Consumo de alimento individual del pargo flamenco, alimentados con las dietas experimentales por 12 semanas. Los datos son la media de una $n=3\pm SD$. Superíndice distinto denota diferencia significativa entre dietas ($P \leq 0.05$).

7.2.7. Tasa de conversión alimenticia

La tasa de conversión alimenticia resultó ser muy similar en las cuatro dietas y no mostraron diferencias significativas entre ellas. La mayor conversión de alimento se determinó en los organismos alimentados con la dieta KS45, mientras que aquellos que mostraron una menor conversión y más alta TCA, fueron los organismos alimentados con la dieta control KS00.

7.2.8. Supervivencia

La supervivencia no fue afectada por las dietas, ya que mostraron una supervivencia superior al 98.33%. No se determinó efecto un efecto negativo, ya que no se presentaron diferencias.

7.2.9. Índice de eficiencia proteínica

El índice de eficiencia proteínica no resultó estadísticamente diferente en las cuatro dietas. La relación entre la masa corporal de los organismos y la proteína dietaría suministrada fue más baja en la dieta KS71, mientras que la dieta KS45 fue la que mostró una mayor eficiencia proteica.

7.2.10. Utilización aparente de nitrógeno

En la Figura 11 se observa que los organismos que mostraron una mayor utilización aparente de nitrógeno, fueron aquellos alimentados con la dieta KS45 y fue diferente de los organismos alimentados con las dietas control KS00, KS21 y KS71, los cuales no fueron diferentes entre tratamientos.

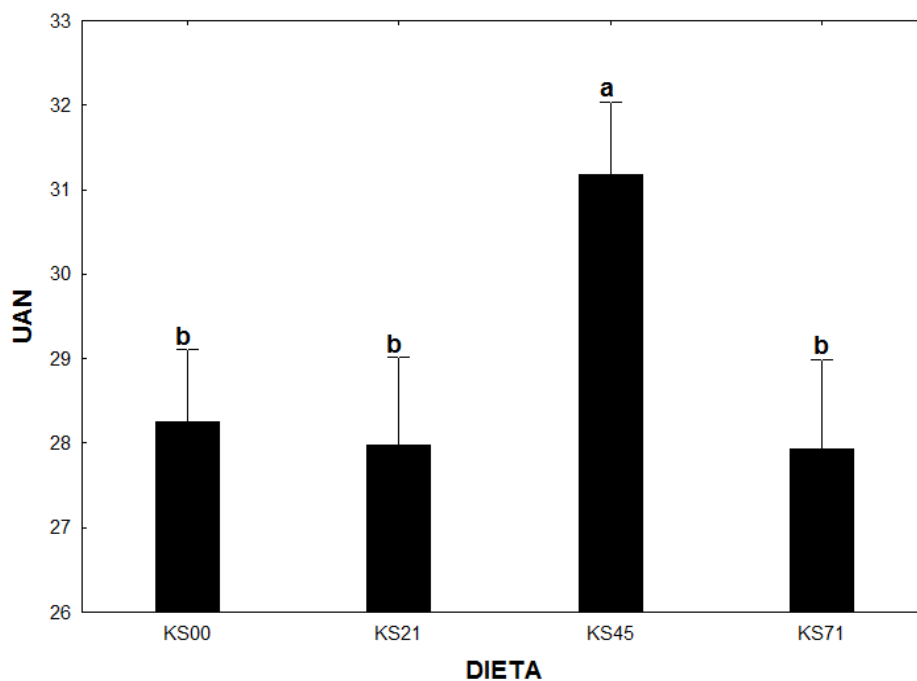


Figura 11 Utilización aparente de nitrógeno en pargos alimentados con las dietas experimentales por 12 semanas. Los datos son la media de una $n=3 \pm SD$. Superíndice distinto denota diferencia significativa entre dietas ($P \leq 0.05$).

7.3. Índices biológicos corporales

En la Tabla 7 se muestran los resultados de los índices biológicos, factor de condición, índice hepatosomático, índice viscerosomático y relación de grasa intraperitoneal, de las dietas experimentales KS21, KS45 y KS71 no mostraron diferencias significativas, al compararlas con la dieta control KS00.

Tabla 7. Índices biológicos del pargo flamenco alimentado con las dietas experimentales por 12 semanas.

Índice biológico	Dietas			
	KS00	KS21	KS45	KS71
CF	1.72±0.13 ^a	1.54±0.08 ^a	1.77±0.23 ^a	1.60±0.13 ^a
HSI	1.55±0.55 ^a	1.51±0.29 ^a	1.95±0.51 ^a	1.55±0.47 ^a
VSI	11.34±2.76 ^a	8.18±1.47 ^a	10.72±1.38 ^a	8.14±0.86 ^a
IPF	6.47±1.36 ^a	5.74±1.45 ^a	6.91±1.34 ^a	4.72±0.99 ^a

CF (factor de condición), HSI (índice hepatosomático), VSI (índice viscerosomático), IPF (relación de grasa intraperitoneal).

Media±SD. N=6. Superíndice igual, no presenta diferencia significativa entre dietas ($P \geq 0.05$).

7.3.1. Factor de condición

El factor de condición que mide la relación de peso contra longitud del organismo, resultado más bajo para la dieta KS21, y el más alto se registró para la dieta KS45. Sin embargo, estos resultados no fueron significativamente diferentes, de la dieta control KS00 y la dieta KS71.

7.3.2. Índice hepatosomático

La relación del peso del hígado contra el peso del cuerpo, no resultó estadísticamente diferente entre las cuatro dietas, sin embargo la dieta en la que el hígado presentó un mayor proporción, es la dieta KS45. Las dietas KS00, KS21 y KS71, presentaron valores muy cercanos entre ellas.

7.3.3. Índice viscerosomático

El paquete visceral con respecto al peso total del cuerpo, fue mayor en la dieta control KS00, mientras que esta relación fue menor en la dieta KS71. Sin embargo, el índice viscerosomático no fue diferente entre los organismos alimentados con las cuatro dietas.

7.3.4. Relación de grasa intraperitoneal

Los organismos que mostraron una menor proporción entre grasa visceral y peso corporal, fueron los organismos alimentados con la dieta KS71, sin embargo esta relación no fue diferente de la que mostraron los organismos alimentados con la dieta control KS00, KS21 y la dieta KS45.

7.4. Bioindicadores hematológicos

La química sanguínea inicial arrojó un porcentaje de hematocrito del $57.33 \pm 4.2\%$, concentraciones de proteína $51.56 \pm 11.2 \text{ g l}^{-1}$, de hemoglobina $16.26 \pm 1.9 \text{ g dl}^{-1}$ y de triglicéridos $311.54 \pm 56.2 \text{ mg dl}^{-1}$. Sin embargo, estos indicadores sanguíneos no fueron diferentes entre los tratamientos al final del experimento (Tabla 8).

Tabla 8. Bioindicadores hematológicos del pargo flamenco al inicio del experimento (Inicio) y después de 12 semanas alimentados con las dietas experimentales.

Parámetro hematológico	Dietas			
	KS00	KS21	KS45	KS71
Hematocrito (%)	53.00±2.58 ^a	59.83±8.45 ^a	60.50±5.97 ^a	52.33±7.31 ^a
Proteína (g l ⁻¹)	60.68±1.69 ^a	58.74±10.06 ^a	56.66±6.95 ^a	62.27±3.25 ^a
Hemoglobina (g dl ⁻¹)	14.22±2.63 ^a	12.40±1.49 ^a	13.21±1.57 ^a	12.39±1.15 ^a
Triglicéridos (mg dl ⁻¹)	407.23±46.94 ^a	359.06±108.0 ^a	354.81±125.4 ^a	383.74±39.65 ^a

Los datos son la media de una n=6±SD. Superíndice igual, no presenta diferencia significativa entre dietas (P > 0.05).

7.4.1. Hematocrito

Los resultados de hematocrito no presentaron diferencias significativas entre las diferentes dietas experimentales, siendo el porcentaje de hematocrito más alto el correspondiente a la dieta KS45, el porcentaje de hematocrito lo presentaron los organismos alimentados con la dieta KS71.

7.4.2. Proteína plasmática

La concentración de proteínas plasmáticas de los organismos alimentados con las dietas experimentales, no fueron significativamente diferentes. La concentración más baja de proteína plasmática fue la los organismos alimentados con la dieta KS45, mientras que las concentraciones más altas se presentaron en las dietas KS00 y KS71.

7.4.3. Hemoglobina

Los niveles de hemoglobina no fueron significativamente diferentes entre las dietas. Siendo el valor más alto el correspondiente a la dieta control KS00 y el más bajo el de la dieta KS71.

7.4.4. Triglicéridos

La concentración de triglicéridos en sangre no fue significativamente diferente entre las dietas. Mostrando una concentración mayor en los peces alimentados con dieta control KS00. Por otro lado, la menor concentración de triglicéridos se presentó en los peces alimentados con la dieta KS45.

7.5. Actividad enzimática

7.5.1. Actividad específica de tripsina

Los valores de actividad específica de tripsina (U mg^{-1} proteína soluble) no mostraron diferencias significativas en intestino y ciegos pilóricos para las diferentes dietas. Los mayores valores de actividad se presentaron en las dietas KS00 y KS45. La menor actividad específica de tripsina se presentó en los organismos alimentados con la dieta KS71 (Tabla 9).

Tabla 9. Actividad específica de tripsina y proteasas alcalinas de intestino y ciegos pilóricos del pargo flamenco, alimentado con las dietas experimentales por 12 semanas.

Dieta	Tripsina ($\text{U mg proteína}^{-1}$)		Proteasas alcalinas (U mg^{-1} proteína)	
	Intestino	ciego pilóricos	Intestino	ciego pilóricos
KS00	53.89±42.05 ^a	53.05±23.20 ^a	34.39±22.14 ^a	52.11±23.41 ^a
KS21	43.77±28.27 ^a	43.44±27.30 ^a	23.73±5.06 ^a	32.89±10.04 ^a
KS45	53.73±36.71 ^a	55.61±27.17 ^a	23.68±5.04 ^a	35.23±9.93 ^a
KS71	38.05±21.31 ^a	37.30±10.35 ^a	27.21±10.20 ^a	40.83±16.92 ^a

Los datos son la media de una $n=6\pm\text{SD}$. Superíndice igual, no presenta diferencia significativa entre dietas ($P \geq 0.05$).

7.5.2. Actividad específica de proteasas alcalinas

La actividad específica de proteasas alcalinas mayor, se presentó en el intestino y ciegos pilóricos de los organismos alimentados con la dieta control KS00. Las

actividades específicas de proteasas alcalinas menores, fueron determinadas en los organismos alimentados con la dieta KS21 (Tabla 9).

7.6. Análisis histológico

En la Figura 12 se muestra el corte de transversal del intestino medio de organismos alimentados con las dietas control KS00, KS21, KS45 y KS71. Se muestra una clara tendencia inflamatoria con un ensanchamiento de la lámina propia

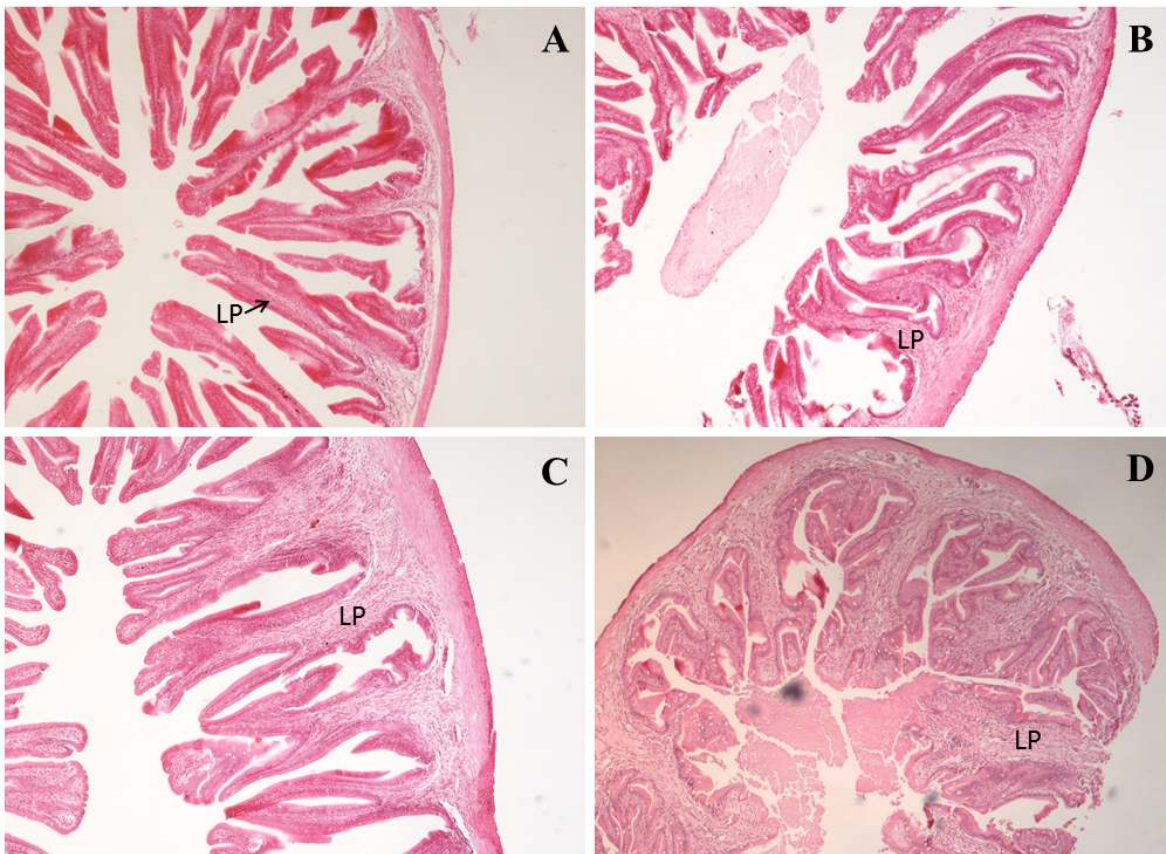


Figura 12 Corte transversal del intestino medio, de juveniles de pargo flamenco *L. guttatus* alimentados con las dietas control KS00 (A), KS21 (B), KS45 (C) y KS71 (D). Aparente ampliación de la lámina propia (LP), A□B□C□D. H&E. 4x.

En la Figura 13, se muestra un corte sagital de las vellosidades del intestino medio de los organismos alimentados con las dietas experimentales. Aquellos alimentados con la dieta control KS00 (A) muestran un arreglo normal de los

enterocitos (células de absorción de nutrientes), así como una lámina propia de tejido conectivo con presencia normal de algunos linfocitos (células del sistema inmunitario). En las vellosidades de los organismos alimentados con la dieta KS21 (B), se puede observar un aumento del tejido conectivo en la lámina propia y la presencia de algunos macrófagos (células del sistema inmunitario), así como un arreglo anormal de los enterocitos. En las vellosidades correspondientes a los organismos alimentados con la dieta KS45 (C) se observó un arreglo irregular de los enterocitos en la parte inferior izquierda comparada con los enterocitos de la parte superior (A). Además, se observó un incremento del tejido conectivo de la lámina propia así como la presencia de algunas células granulares eosinofílicas. Por últimos, en las vellosidades de los organismos alimentados con la dieta KS71 (D) se observó la lámina propia ensanchada, así como un aumento considerable de macrófagos y linfocitos.

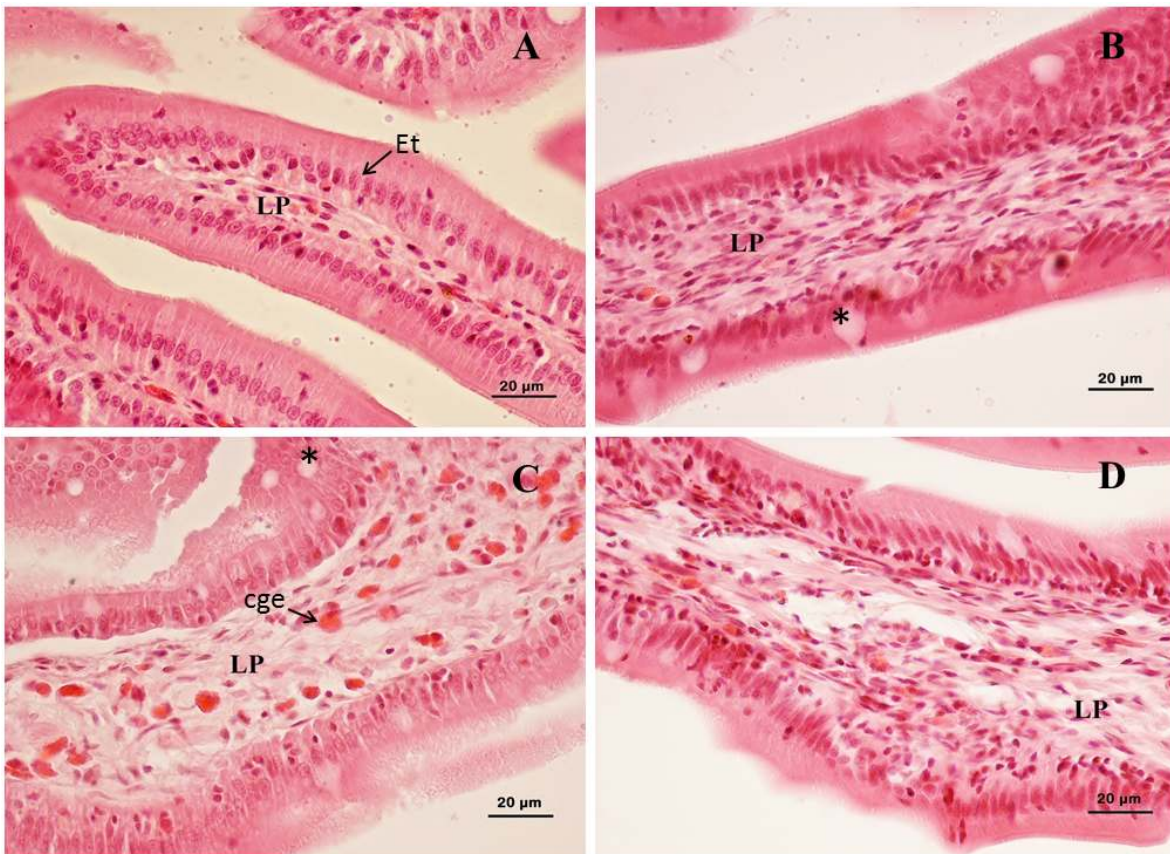


Figura 13 Corte sagital de vellosidades de intestino medio (para identificación, ver leyenda de Figura 11). (A) Normal presencia y acomodo de macrófagos (Et), lamina

propia (LP) normal con algunos linfocitos. (B) Incremento de tejido conectivo de LP, presencia de macrófagos y arreglo anormal de enterocitos. (C) LP ensanchada, presencia de células granulares eosinofílicas (cge). (D) LP ensanchada, presencia de macrófagos y linfocitos. H&E. 40x

La lámina propia de las vellosidades más inflamadas fue las de los organismos alimentados con la dieta KS71, alcanzando un espesor de $51.80 \pm 17.01 \mu\text{m}$, el cual no fue estadísticamente diferente del alcanzado por la dieta KS45 con $48.21 \pm 17.07 \mu\text{m}$. Sin embargo, ambos resultados fueron diferentes de los obtenidos con las dietas KS00 de $41.80 \pm 14.18 \mu\text{m}$ y KS21 de $43.30 \pm 13.77 \mu\text{m}$, las cuales resultaron similares entre ellas (Figura 14).

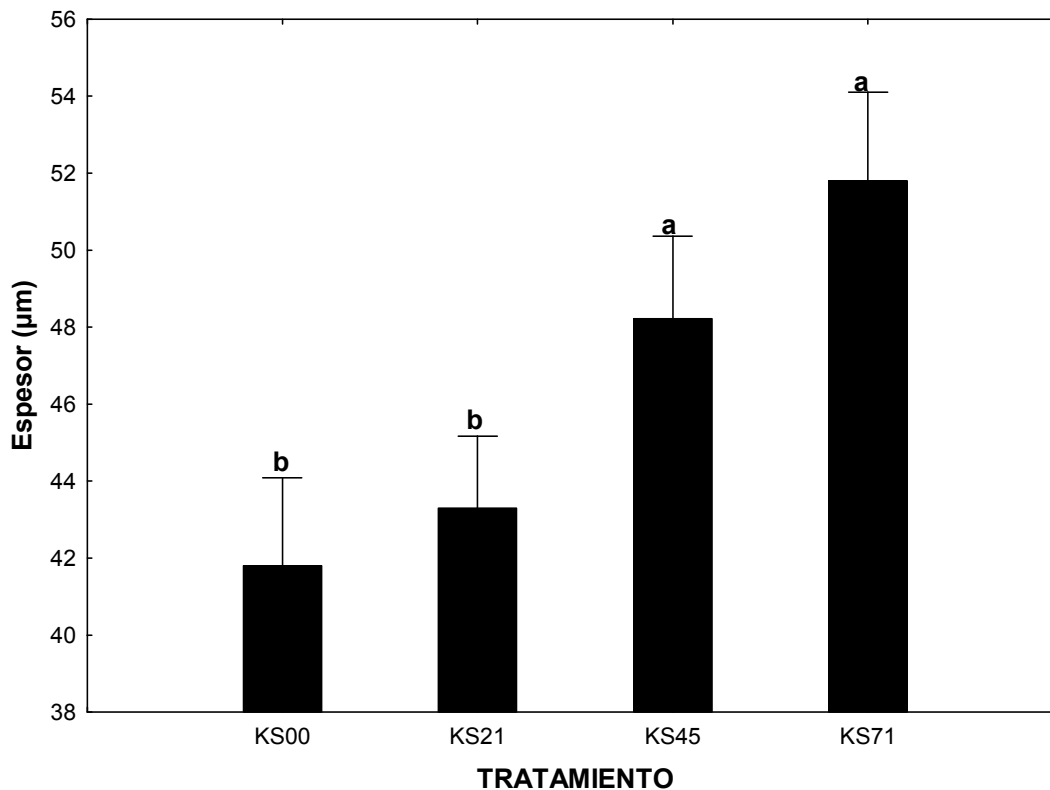


Figura 14 Espesor de lámina propia en intestino medio del pargo flamenco, alimentados 12 semanas con las dietas experimentales. Los datos son la media de una $n=150 \pm \text{SD}$. Superíndice distinto denota diferencia significativa entre dietas ($P \leq 0.05$).

7.7. Análisis económico

El costo de la dieta se incrementó en \$1.05 pesos, esto debido principalmente al valor agregado del krill. La dieta que tiene un menor costo es el control KS00, mientras que la dieta KS71 tiene el costo mayor.

Tabla 10. Costo de los ingredientes variables de las dietas experimentales y CUA

Ingrediente	COSTO (Pesos, MN)			
	KS00	KS21	KS45	KS71
HP	9.87	8.26	6.54	4.56
HK	0.00	1.30	2.70	4.32
HS	0.00	0.61	1.28	2.04
Total	9.87	10.17	10.52	10.92
TCA	1.45	1.40	1.37	1.44
CUA	14.30	14.29	14.38	15.77

HP (harina de pescado), HK (harina de krill), KS (harina de soya), TCA (tasa de conversión alimenticia) y CUA (costo unitario de alimentación)

El costo unitario de alimentación (TCA x Costo por kg de alimento), está influenciado directamente por la tasa de conversión alimenticia, de tal modo que el costo de alimento para producir un kilogramo de biomasa más bajo, fue el de la dieta KS21 y el mayores el de la dieta KS71, sin embargo la diferencia de costos en las dietas KS00, KS21 y KS45 es de \$0.09 pesos (Figura 15)

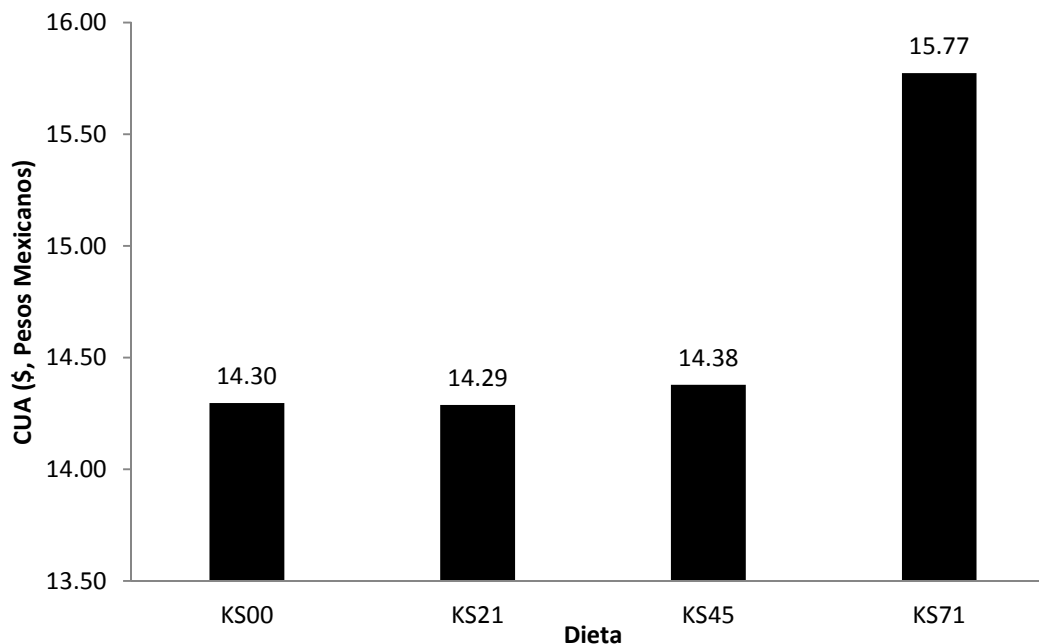


Figura 15 Costo unitario de alimentación del pargo *L. guttatus* alimentado con las dietas KS00, KS21, KS45 y KS71. Se considera solo el costo de los ingredientes que se variaron en las dietas (HP, HK y HS). Los valores están expresados en pesos mexicanos.

8. DISCUSIÓN

El remplazo de harina de pescado con harina de soya en alimento para organismos acuáticos carnívoros, es una práctica que en algunas especies como el pargo australiano, la cobia y el pargo flamenco (Quartararo *et al.*, 1998, Zhou *et al.*, 2005, Silva-Carrillo *et al.*, 2012,) se ha implementado satisfactoriamente, aunque en remplazos mayores al 40% se ha observado una reducción en el crecimiento y en la eficiencia del alimento.

Una forma de incrementar el remplazo con harina de soya sin afectar el crecimiento, es enriqueciendo sus aminoácidos limitantes metionina y lisina, sin embargo, las características de palatabilidad inferiores de este ingrediente hacen necesario el uso de ingredientes que estimulen el consumo de alimento. En este trabajo quedó demostrado que la mezcla krill:soya, puede lograr un mayor crecimiento que la harina de pescado como única fuente proteínica. Hansen *et al.* (2011) obtuvieron un mayor crecimiento con otra especie (salmón del Atlántico) usando una combinación de harina de krill y concentrado proteico de guisantes en una relación 3.5:1.

Entonces, se ha demostrado que el uso de fuentes proteínicas vegetales en dietas para peces carnívoros, se vuelve más eficiente cuando estas son enriquecidas con alguna fuente proteínica animal como la harina de krill (Kader *et al.*, 2010). Así, la mezcla krill:soya logró una mayor inclusión de harina de soya que la establecida en trabajos previos para la cobia (*Rachycentron canadum*) y para esta especie (Zhou *et al.* 2005; Silva-Carrillo *et al.* 2012). Esto, asociado al incremento en consumo de las dietas que contenían krill:soya, sin embargo, a pesar de que el remplazo fue proporcional en las dietas, la reducción del contenido de harina de pescado influyó de manera importante en la palatabilidad y consumo de la dieta con mayor contenido krill:soya. Esta reducción del consumo ya había sido reportada en dietas con harina de soya para el pargo flamenco (Silva-Carrillo *et al.*, 2012) y para el besugo, *Pagrus major* (Kader *et al.*, 2012).

Considerando que la TCA fue similar entre las cuatro dietas, los indicadores de crecimiento (PG, TC y TEC) fueron directamente influenciados por el consumo de alimento, a una razón de mayor consumo mayor crecimiento. Por otra parte, la TCA en las cuatro dietas fue menor que la reportada en otra investigación, donde se utiliza harina de soya como fuente de sustitución proteínica para dietas de la lobina rayada híbrida (Gallagher, 1994).

Los índices corporales factor de condición, índice hepatosomático y viscerosomático y relación de grasa intraperitoneal no fueron afectados en este estudio. Estos índices son muy variados entre especies, ya que depende en gran medida de la fisiología de cada una. Especies como el besugo, la lubina y el sargo picudo (Tibaldi *et al.*, 2006, Hernández *et al.*, 2007, Kader *et al.*, 2012) alimentados con dietas que incluían harina de soya, no demostraron diferencias en dichos índices. Sin embargo, en los trabajos con estas especies, así como en éste, se demostró que del paquete visceral más del 50% del peso fresco fue grasa. Dicho fenómeno se presentó indistintamente entre tratamientos, por lo que no se atribuye esta condición a la alimentación con una fuente proteínica vegetal, sino a las condiciones de cautiverio y la frecuencia alimentaria. Este porcentaje de grasa sugiere que en el presente estudio, las raciones proporcionaban energía por encima del nivel requerido por los organismos para llevar a cabo sus funciones metabólicas, por lo que una administración del alimento en función de la biomasa, reflejaría una mayor eficiencia de la proteína suministrada en la dieta.

El índice de eficiencia proteica y la utilización aparente de nitrógeno, son indicadores biológicos que reflejan el grado de fijación de la proteína dietaria en los organismos, y específicamente, el UAN está orientado a la formación de proteína corporal. Si bien, los requerimientos de aminoácidos indispensables para esta especie no están aún referenciados, una mayor utilización del nitrógeno es demostrada en los organismos alimentados con la dieta KS45, influenciando directamente en la fracción proteínica corporal de estos. Por lo que se asume que la combinación de aminoácidos de dicha dieta, es la que más se acerca al concepto de “proteína ideal” para esta especie (Mitchell, 1962), ya que con

respecto a las demás dietas, la dieta KS45 demostró una mayor retención proteínica y por lo tanto una menor excreción de nitrógeno.

Indicadores de retención proteínica similares, han sido reportados para especies como la lobina rayada híbrida, el sargo picudo y el besugo, alimentadas con harina de soya (Gallagher, 1994, Hernández *et al.*, 2007, Kader *et al.* 2012). Por otro lado, en un trabajo previo con *L. guttatus* realizado por Silva-Carrillo *et al.* (2012), la UAN fue mayor a la mostrada en este estudio, este hecho es atribuido a que tal experimento se llevó a cabo en organismos de menor talla (peso inicial de 17g) y a que en las primeras etapas de gran parte de la energía dietaría se destina más al crecimiento que al almacenaje.

La composición sanguínea es un indicador del estado fisiológico y condiciones generales de los organismos (De Pedro *et al.*, 2005), un decremento en el contenido de proteína ha sido atribuida a enfermedades, daño hepático, absorción de nutrientes deficiente, deficiencias nutricionales, inanición y enfermedades infecciosas (Wedemeyer and McLeay, 1981). Los parámetros hematológicos entre los tratamientos de este estudio, no fueron afectados por el remplazo de harina de pescado con la mezcla krill:soya, además que dichos parámetros entraron en los rangos establecido por Del Rio-Zaragoza *et al.* (2011) para organismos con un cuadro clínico saludable.

Por su parte, los triglicéridos son la forma lipídica en que las grasas son almacenadas en los adipocitos para almacenamiento energético y están presentes en la sangre hasta fijarse como tejido de reserva; es así que para nuestro estudio no se observó una afectación significativa de la concentración de triglicéridos, sin embargo demuestran una relación entre la concentración de triglicéridos en sangre y la fracción lipídica corporal, ya que los tratamientos con mayor depósito de lípidos fueron los mismos que presentaron una menor concentración de triglicéridos en sangre, valores similares han sido reportados previamente para esta especie (Silva-Carrillo *et al.*, 2012) y para la dorada negra (Peng *et al.*, 2008).

Los dos principales grupos inhibidores de proteasas identificados en la harina de soya son los tipo “Kunitz”, que reaccionan solo con tripsina y son termolábiles y los tipo “Bowman-Birk”, que reaccionan con tripsina y quimotripsina, son termo resistentes pero menos abundantes (Norton, 1991). Comúnmente, la concentración de inhibidores de tripsina en los productos de soya oscilan entre 2-6mg g⁻¹ (Snyder y Kwon, 1987) y esta dependerá del tratamiento térmico aplicado.

La respuesta fisiológica ante una mayor concentración de inhibidores de tripsina en la dieta, es un incremento de las secreciones pancreáticas y por lo tanto una mayor actividad de enzimas que contrarreste los efectos de inhibición digestiva. Aunque las actividades específicas de tripsina y proteasas alcalinas no estén determinadas para el *L. guttatus*, la harina de soya utilizada en este experimento contenía bajas concentraciones de inhibidores de proteasas, ya que la actividad específica de estas enzimas no fue diferente entre tratamientos (P > 0.05).

Además de los inhibidores de proteasas, la harina de soya presenta de manera natural otros factores anti nutricionales, entre ellas una variedad de proteínas alergénicas y saponinas (Liener, 1994), y aunque los mecanismos de acción no han sido determinados, se atribuye que las saponinas de la soya son las responsables de inducir enteritis en el intestino medio de especies como el salmón del Atlántico y la carpa común (Knudsen *et al.*, 2007, Uran *et al.*, 2008)

En el presente trabajo, se observó una tendencia en la inflamación de la lámina propia del intestino medio, que puede ser atribuida al incremento del contenido de harina de soya en las dietas, aunque por otro lado, dichos cambios morfológicos aparentemente no afectaron de manera importante la capacidad absorptiva de nutrientes, por lo que el crecimiento y otros factores biológicos no se vieron afectados. Junto con el ensanchamiento de la lámina propia, se observó un aparente incremento de la densidad de las células inflamatorias como linfocitos y macrófagos. Esta condición inducida por la harina de soya ha sido clasificada por otros autores como una enteritis subaguda no infecciosa y como una respuesta del sistema inmunitario ante la presencia de un agente al cual no está adaptado. En experimentos con el salmón del Atlántico, ha quedado demostrado que un

período de alimentación de tres semanas con una dieta libre de harina de soya, promueve la desinflamación del intestino y regresando por completo a un cuadro clínico saludable (Beaverfjord y Krogdahl, 1996).

Finalmente, analizando el costo de las formulas alimentarias, éste está ligado al contenido y calidad de nutrientes. En las dietas de este estudio, la harina de krill fue determinante para la variación del costo del alimento, debido a que es una fuente proteínica de alto costo en el mercado, inducido por el desinterés de la captura de este crustáceo. Por lo anterior, se ha encontrado una tendencia creciente en el costo de la dieta al incrementar el contenido de harina de krill.

Sin embargo el costo unitario de alimentación (CUA), ajusta el costo de la dieta con la eficiencia de la misma, usando como indicador la tasa de conversión alimenticia. Así, el CUA muestra que el valor real de la dieta no es diferente ($P \geq 0.05$) entre las dietas control y las que contenían la mezcla krill:soya, logrando con ello la estabilidad de precio de dieta y sobre todo aminorar la dependencia a la disponibilidad de la harina de pescado.

9. CONCLUSIONES

1. Los organismos que mostraron un mayor crecimiento (PG, TC, y TEC), fueron aquellos alimentados con la dieta que contenía 45% de remplazo de la harina de pescado por la mezcla krill:soya.
2. El consumo de alimento individual se redujo para la dieta con un remplazo de harina de pescado del 71%, KS71.
3. El nivel óptimo de inclusión con la mezcla krill:soya, para lograr un mayor crecimiento de los organismos fue 33.65%.
4. La supervivencia, tasa de conversión alimenticia y el índice de eficiencia proteica no fueron afectados por el remplazo de la harina de pescado con la mezcla krill:soya.
5. La utilización aparente de nitrógeno fue mayor en la dieta con un remplazo de harina de pescado del 45%, KS45.
6. Los indicadores del estado de salud y estado nutricio de los organismos a través de los índices biológicos corporales (CF, HSI, VSI y IPF) y bioindicadores hematológicos (hematocrito, proteína, hemoglobina y triglicéridos), tampoco fueron afectados por el remplazo con la mezcla krill:soya.
7. Los análisis de actividad enzimática (actividad específica de tripsina y proteasas alcalinas), demostraron que la harina de soya utilizada no afectó los valores de actividad específica (a través de inhibición de proteasas).

8. La inflamación y el aumento de la lámina propia de las vellosidades del intestino medio, mostró una tendencia ascendente alcanzando una mayor inflamación en la dieta con mayor contenido de la mezcla krill:soya. Sin embargo en el tiempo experimental estas alteraciones patológicas no afectaron el crecimiento.

9. El CUA no demuestra diferencias entre las dietas control, KS21 y KS45.

10. La mezcla krill:soya es una alternativa de remplazo proteínico, que reduce la dependencia a la disponibilidad de la harina de pescado

10. BIBLIOGRAFIA

- ABDO DE LA PARRA, M. I., RODRÍGUEZ-IBARRA, L. E., HERNÁNDEZ, C., HERNÁNDEZ, K., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, B., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, I. y GARCÍA-ORTEGA, A. 2010. Efecto de diferentes niveles de proteína y lípidos totales en la dieta sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. *Revista de biología marina y oceanografía*, 45, 433-439.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L., REINA CAÑEZ, M. A., CAMACHO HERNÁNDEZ, M. A. y KRAUL, S. 2007. Design of a pilot-scale tropical marine finfish hatchery for a research center at Mazatlán, Mexico. *Aquacultural Engineering*, 36, 81-96.
- ALLEN, G. R. 1985. Snappers of the world. An annotated and illustrated catalogue of lutjanid species known to date. *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS*.
- ALLEN, G. R., FISHER, W., KRUPP, F., SCHNEIDER, W., SOMMER, C., CARPENTER, K. E. y NIEM, V. H. 1995. Lutjanidae. *FAO, Guide to Species Identification for Fishery Purposes, Eastern Central Pacific*, 3, 1231-1244.
- AOAC 2011. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL 18th Edition.
- BEAVERFJORD, G. y KROGDAHL, Å. 1996. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases*, 19, 375-387.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- CCAMLR 2010. Report of the Twenty-Ninth Meeting of the Commission. Summary of notifications for krill fisheries 2010/11 (CCAMLR-XXIIX/19).
- CLIFFORD, H. C. 1992. Marine shrimp pond management: a review. In: Wyban, J. (Ed.), *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society*, 111-137.
- DE PEDRO, N., GUIJARRO, A.I., LOPEZ-PATIÑO, M.A., MARTINEZ-ALVAREZ, R., DELGADO, M.J., 2005. Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical parameters in the tench. *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. *Aquac. Res.* 36, 1185–1196.
- DEL RIO-ZARAGOZA, O. B., FAJER-ÁVILA, E. J., ALMAZÁN-RUEDA, P. y ABDO DE LA PARRA, M. I. 2011. Hematological characteristics of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) healthy and naturally infected by dactylogyrid monogeneans. *Tissue and Cell*, 43, 137-142.
- DIMES, L. E., GARCIA-CARRENO, F. L. y HAARD, N. F. 1994. Estimation of protein digestibility—III. Studies on the digestive enzymes from the pyloric ceca of rainbow trout and salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 109, 349-360.
- DRURY, R. y WALLINGTON, E. 1980. Bone and decalcification. *Carleton's Histological Technique*, 150-151.
- ERLANGER, B. F., KOKOWSKY, N. y COHEN, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95, 271-278.

- ESPINOSA DE LOS MONTEROS, J. y LABARTA, V. 1987. Nutrición en Acuicultura. *C.A.I.Y.T.*
- FAO 2010. Conferencia mundial de acuicultura; Cultivando las aguas para las personas y la alimentación. *FAO Fisheries and aquaculture technical*, 500/1.
- FAO Globefish Highlights. 2011. Market Reports. Fish oil and fish meal. March 2010. Available at <http://www.globefish.org/fishmeal-market-report-march-2010.html>. (accesado 15 de octubre del 2012)
- FREITAS, L. E. L., NUNES, A. J. P. y DO CARMO SÁ, M. V. 2011. Growth and feeding responses of the mutton snapper, *Lutjanus analis* (Cuvier 1828), fed on diets with soy protein concentrate in replacement of Anchovy fish meal. *Aquaculture Research*, 42, 866-877.
- GALLAGHER, M. L. 1994. The use of soybean meal as a replacement for fish meal in diets for hybrid striped bass (*Morone saxatilis*×*M. chrysops*). *Aquaculture*, 126, 119-127.
- GARCIA-ORTEGA, A., MUY-RANGEL, D., PUELLO-CRUZ, A., VILLA-LOPEZ, ESCALANTE-ROJAS, M. y PRECIADO-IÑIGUEZ, K. 2010. Uso de ingredientes de origen vegetal como fuentes de proteínas y lípidos en alimentos balanceados para peces marinos carnívoros. Avances en nutrición acuícola X-Memorias del décimo simposio internacional de nutrición acuícola., 321-340.
- HANSEN, J. Ø., SHEARER, K. D., ØVERLAND, M., PENN, M. H., KROGDAHL, Å., MYDLAND, L. T. y STOREBAKKEN, T. 2011. Replacement of LT fish meal with a mixture of partially deshelled krill meal and pea protein concentrates in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 315, 275-282.
- HERNÁNDEZ-GONZALEZ, C., GONZALEZ-SANTOS, A., HARDY, W. R., VALVERDE-ROMERO, M., OLVERA-NOVOA, M. A., GONZALEZ-RODRIGUEZ, B. y ABDO DE LA PARRA, M. I. 2010. Evaluation of balanced diet supplemented with conventional protein in grow-out for spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*). *Xth Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*.
- HERNÁNDEZ, M. D., MARTÍNEZ, F. J., JOVER, M. y GARCÍA GARCÍA, B. 2007. Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal in sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo*) diet. *Aquaculture*, 263, 159-167.
- HERTRAMPF, J. W. y PIEDAD-PASCUAL, F. 2000. Handbook of ingredient for aquaculture feeds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- HUNTINGTON, T. C. y HASAN, M. R. 2009. Fish as feed inputs for aquaculture – practice, sustainability and implications: a global synthesis. *Fish as feed inputs for aquaculture: practices, sustainability and implications, Fisheries and aquaculture technical paper*, 518, 1-61.
- KADER, M. A., BULBUL, M., KOSHIO, S., ISHIKAWA, M., YOKOYAMA, S., NGUYEN, B. T. y KOMILUS, C. F. 2012. Effect of complete replacement of fishmeal by dehulled soybean meal with crude attractants supplementation in diets for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 350–353, 109-116.
- KADER, M. A., KOSHIO, S., ISHIKAWA, M., YOKOYAMA, S. y BULBUL, M. 2010. Supplemental effects of some crude ingredients in improving nutritive values of low fishmeal diets for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 308, 136-144.
- KETOLA, H. G. 1982. Amino acid nutrition of fishes: requirements and supplementation of diets. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73, 17-24.
- KUNITZ, M. 1946. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *The Journal of General Physiology*, 291-310.
- KNUDSEN, D., URÁN, P., ARNOUS, A., KOPPE, W., y FRØKIÆR, H. (2007). Saponin-containing subfractions of soybean molasses induce enteritis in the distal intestine of Atlantic salmon. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(6), 2261-2267.

- LIENER, I. E. 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science y Nutrition*, 34, 31-67.
- LUNA, L. G. 1968. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, McGraw-Hill New York.
- MITCHELL, H.H., Chapter 3 - The Maintenance Requirement of Protein, Comparative Nutrition of Man and Domestic Animals, Academic Press, 1962, Pages 129-191
- NORTON, G. (1991). Proteinase inhibitors. D'Mello. JPF, Duffus. CM and Duffus. JH (eds) Toxic Substances in Crop Plants. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 68-106.
- OLSEN, R. L. y HASAN, M. R. 2012. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*, 27, 120-128.
- PENG, S., CHEN, L., QIN, J. G., HOU, J., YU, N., LONG, Z., YE, J. y SUN, X. 2008. Effects of replacement of dietary fish oil by soybean oil on growth performance and liver biochemical composition in juvenile black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. *Aquaculture*, 276, 154-161.
- PFEFFER, E. y BECKER, K. 1977. Untersuchungen an Regenbogenforellen ueber den Futterwert verschiedener Handelsfutter und ueber den weitgehenden Ersatz von Fischmehl durch Krillmehl im Futter. *Archiv fuer Fischereiwissenschaft*, 28.
- QUARTARARO, N., ALLAN, G. L. y BELL, J. D. 1998. Replacement of fish meal in diets for Australian snapper, *Pagrus auratus*. *Aquaculture*, 166, 279-295.
- QUINN, G. G. P. y KEOUGH, M. J. 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*, Cambridge University Press.
- ROJAS-HERRERA, A. A., MASCARÓ, M. y CHIAPPA-CARRARA, X. 2004. Hábitos alimentarios de los peces *Lutjanus peru* y *Lutjanus guttatus* (Pisces:Lutjanidae) en Guerrero, México. *Revista de Biología Tropical*, 52, 959-971.
- SAGARPA 2011. Carta nacional acuícola. Diario oficial de la Federación, primera sección. 38-39.
- SANTAMARÍA-MIRANDA, A. 1998. *Hábitos alimenticios y ciclo reproductivo del huachinango Lutjanus peru (Nichols y Murphy, 1922)(Pisces: Lutjanidae) en Guerrero, México*. Tesis de maestría, CICIMAR, La Paz, México. 64 pp.[Links].
- SIDHU, G., MONTGOMERY, W., HOLLOWAY, G. L., JOHNSON, A. y WALKER, D. 1970. Biochemical composition and nutritive value of krill (*Euphausia superba* Dana). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 21, 293-296.
- SILVA-CARRILLO, Y., HERNÁNDEZ, C., HARDY, R. W., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, B. y CASTILLO-VARGASMACHUCA, S. 2012. The effect of substituting fish meal with soybean meal on growth, feed efficiency, body composition and blood chemistry in juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture*, 364–365, 180-185.
- SNYDER, H. E. y KWON, T. W. 1987. Soybean Utilization. *Van Nostrand Reinhold Company*.
- TACON, A. G. y JACKSON, A. J. 1985. Utilization of conventional and unconventional protein sources in practical fish feeds. *Nutrition and feeding in fish*, 145.
- TIBALDI, E., HAKIM, Y., UNI, Z., TULLI, F., DE FRANCESCO, M., LUZZANA, U. y HARPAZ, S. 2006. Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 261, 182-193.
- TURCHINI, G. M., TORSTENSEN, B. E. y NG, W. K. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1, 10-57.

- URAN, P. A., GONCALVES, A. A., TAVERNE-THIELE, J. J., SCHRAMA, J. W., VERRETH, J. A. J., y ROMBOUT, J. H. W. M. (2008). Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & shellfish immunology*, 25(6), 751-760.
- VÁZQUEZ-ORTIZ, F., CAIRE, G., HIGUERA-CIAPARA, I. y HERNÁNDEZ, G. 1995. High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in shrimp. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 18, 2059-2068.
- WALTER, H. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. *Methods of enzymatic analysis*, 5, 270-277.
- WATANABE, W. O., ELLIS, S. C. y CHAVES, J. 2001. Effects of dietary lipid and energy to protein ratio on growth and feed utilization of juvenile mutton snapper *Lutjanus analis* fed isonitrogenous diets at two temperatures. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32, 30-40.
- WEDEMEYER, G.A., MCLEAY, D.J., Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors.
- YUAN, Y.-C., GONG, S.-Y., YANG, H.-J., LIN, Y.-C., YU, D.-H. y LUO, Z. 2011. Effects of supplementation of crystalline or coated lysine and/or methionine on growth performance and feed utilization of the Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. *Aquaculture*, 316, 31-36.
- ZAR, J. H. 1996. Biostatistical analysis 3rd edn. *Practice Hall, New Jersey*.
- ZHOU, Q. C., MAI, K. S., TAN, B. P. y LIU, Y. J. 2005. Partial replacement of fishmeal by soybean meal in diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture Nutrition*, 11, 175-182.