



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**“EFECTOS DE LA INCLUSIÓN DE  
FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS Y MANANO-  
OLIGOSACÁRIDOS EN JUVENILES DE TRUCHA  
ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

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

**JESUS MANUEL SEGURA CAMPOS**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**



Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla, Estado de México, 2020.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**Este estudio fue realizado con fondos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN214718 de la DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM en especial a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por brindarme mi formación académica.

Al Dr. Luis Héctor Hernández Hernández por toda su paciencia y apoyo en la realización de este proyecto.

A los profesores M en C. Mario Alfredo Fernández Araiza, Biol. Omar Ángeles López, Biol. Daniel Sánchez Ávila y Biol. Adriana Araceli Trujano Rodríguez por su disposición en la mejoría de la tesis y su apoyo en la realización de la parte técnica de este trabajo.

## **DEDICATORIAS**

A todos los profesores y académicos que tuve durante la carrera porque me han guiado en el proceso de aprendizaje.

A mis papás por todo el apoyo y consejos que me han brindado durante toda mi vida, por ser un gran ejemplo a seguir.

A mis hermanas por su apoyo, compañerismo, comprensión, consejos y enseñanzas.

A toda mi familia, incluyendo tíos, primos y abuelos que siempre han estado en los momentos en que más los necesito.

*“El mayor valor que tiene el haberse dedicado a una ciencia rigurosa no radica en sus resultados: pues estos, en comparación con el océano de cosas que valdría la pena saber, no son más que una gota infinitamente pequeña. Pero con dicha dedicación se consigue un aumento de energía, de capacidad de razonar y de tenacidad en el mantenimiento del esfuerzo: se ha aprendido a alcanzar un objetivo con los medios que se ajustan al mismo. En este sentido resulta muy valioso, con vistas a todo lo que se hará después, haber sido hombre de ciencia alguna vez en la vida.”*

**Friedrich Nietzsche.**

# CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>ANTECEDENTES</b> .....	5
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	7
<b>OBJETIVOS</b> .....	8
Objetivo general.....	8
Objetivos particulares.....	8
<b>MATERIALES Y MÉTODO</b> .....	9
Obtención de organismos.....	9
Formulación y preparación de las dietas.....	9
Prueba de alimentación.....	10
Parámetros de crecimiento.....	11
Composición proximal.....	12
Química sanguínea.....	12
Técnica histológica.....	12
Análisis estadístico.....	13
<b>RESULTADOS</b> .....	14
Parámetros de crecimiento.....	14
Composición proximal.....	16
Química sanguínea.....	19
Análisis histológico.....	22
<b>DISCUSIÓN</b> .....	27
<b>CONCLUSIONES</b> .....	34
<b>REFERENCIAS</b> .....	35
<b>ANEXOS</b> .....	46
Anexo 1.....	46
Anexo 2.....	47
Anexo 3.....	48
Anexo 4.....	49
Anexo 5.....	51
Anexo 6.....	53
Anexo 7.....	55
Anexo 8.....	57
Anexo 9.....	59

# “EFECTOS DE LA INCLUSIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS y MANANO-OLIGOSACÁRIDOS EN JUVENILES DE TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)”

## RESUMEN

El crecimiento del cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) durante los últimos años ha causado un incremento en la demanda de alimentos balanceados. Una alternativa a la harina de pescado son las harinas de origen vegetal. Sin embargo, hay límites para usarlas, principalmente porque contienen una alta cantidad de antinutrientes. El uso de prebióticos como ingredientes funcionales en alimentos acuícolas es un enfoque emergente con resultados positivos; sin embargo, hasta el momento hay muy poca información sobre su inclusión en dietas con altos contenidos de proteína vegetal. Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de dietas con concentrados de proteína vegetal y la adición de fructooligosacáridos (FOS) o manano-oligosacáridos (MOS) en juveniles de trucha arcoíris. Fueron formuladas dos dietas experimentales con inclusiones del 3% de FOS o MOS, como control se usó una dieta basal y una comercial (Grow Fish®). Los organismos fueron alimentados durante 60 días y se evaluó su efecto en el crecimiento, composición proximal, química sanguínea e integridad del epitelio intestinal. No hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la ganancia en peso (GP), tasa de crecimiento específico (TCE), tasa de conversión alimenticia (TCA) y tasa de ingesta (TI). Tampoco fueron observadas diferencias en la deposición de lípidos en músculo e hígado ni en la deposición de proteína en músculo, los organismos alimentados con la dieta comercial tuvieron una deposición de proteína en hígado significativamente mayor ( $p > 0.05$ ) con respecto a los alimentados con la dieta basal. No hubo diferencias en la cantidad de glucosa y proteína en suero sanguíneo, pero se observó un valor significativamente mayor de triglicéridos séricos en los organismos alimentados con la dieta comercial. A nivel histológico no se observaron signos de inflamación en el tracto digestivo de ningún tratamiento. Se concluye que los concentrados de proteína vegetal y la adición del 3% de FOS o MOS en dietas para juveniles de trucha arcoíris no tienen efectos negativos en su crecimiento.

## INTRODUCCIÓN

La acuicultura es el proceso de cultivo de organismos acuáticos en condiciones controladas o semi-controladas, especialmente para consumo humano, aunque también puede ser para la pesca deportiva y comercial, o para salvar una especie en peligro de extinción, además es el principal medio para obtener más alimentos de nuestros entornos acuáticos en el futuro (Troell *et al.*, 2013).

Dado que la sobrepesca de nuestros océanos y otros recursos naturales aumenta continuamente año tras año, los seres humanos necesitamos fuentes alternativas de organismos acuáticos para alimentar a la creciente población del planeta. Con una expectativa de 10 mil millones de personas que habitarán el planeta para 2050, la demanda de proteína animal aumentará en un 52 por ciento (GAA, 2019). Los enfoques sostenibles y saludables para alimentar al mundo son más importantes que nunca y el papel de la acuicultura es crucial puesto que el valor nutricional de los productos acuáticos es comparable favorablemente con la carne de animales terrestres ya que son ricos en micronutrientes y contienen altos niveles de ácidos grasos, además los peces son convertidores más eficientes de energía y proteínas que los animales de granja (Gjedrem *et al.*, 2012).

La actividad acuícola requiere la captura de grandes cantidades de pescado para producir harina y aceite de pescado que son una fuente importante de ingredientes para proteínas y ácidos grasos en los alimentos para muchas especies de peces y camarones cultivados, esto puede contribuir a la alta presión pesquera sobre algunas poblaciones con posibles consecuencias negativas para las redes tróficas marinas (Troell *et al.*, 2013). Dentro de las especies más cultivadas en la acuicultura está la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), cuya producción ha crecido exponencialmente desde los 1950s. Esto se debe principalmente a la necesidad de abastecer los mercados nacionales y para el mercado de exportación. Algunos países productores incluyen Noruega, Francia, Italia, España, Dinamarca, EE. UU., Alemania, Irán, el Reino Unido, Chile y México (FAO, 2019).

En México el cultivo de trucha arcoíris es un ejemplo del crecimiento y desarrollo de la acuicultura; con una producción en el 2017 de 6,471 t la trucha se encuentre en el puesto

número 18 de la producción total pesquera nacional, con una tasa media de crecimiento anual de 8.39% (CONAPESCA, 2017). Los estados con mayor participación en la producción nacional son Puebla, Michoacán, Veracruz, Tamaulipas, Estado de México, Hidalgo y Durango (González *et al.*, 2016).

El crecimiento e intensificación del cultivo de trucha arcoíris durante los últimos años ha causado un incremento en la demanda de alimentos balanceados (Hardy, 2010), lo que implica también un aumento en el uso de los ingredientes para producir dichas dietas (Chang *et al.*, 2016; Hasan y Halwart, 2009). Es importante señalar que la sostenibilidad de la acuicultura depende, entre otros factores, de los piensos rentables ya que estos constituyen alrededor del 60% del costo operativo total en la acuicultura; por lo tanto, el crecimiento de la acuicultura se verá beneficiado por el desarrollo de piensos acuáticos más baratos. La oferta de harina de pescado se ha vuelto significativamente baja y su demanda ha aumentado, lo que conlleva precios más altos en el mercado (Gatlin *et al.*, 2007; De-Silva y Hasan, 2007) por tanto es importante recurrir a alternativas como las harinas vegetales con altos contenidos proteicos (Daniel, 2018). Dentro de estas harinas se han utilizado particularmente derivados de oleaginosas, leguminosas y cereales (Welker *et al.*, 2017).

Sin embargo, todavía hay límites para usar estas harinas en las dietas, pues contienen compuestos que afectan la digestibilidad, el crecimiento normal (Krogdahl *et al.*, 2010), la respuesta inmunológica e inflamatoria en el intestino de los organismos (Burrells *et al.*, 1999; Mosberian-Tanha *et al.*, 2017): conocidos como antinutrientes, son parte integral de las semillas como moléculas estructurales (como las fibras), de almacenamiento (como el ácido fítico) y de defensa (como las lectinas) (Krogdahl *et al.*, 2010).

Por tanto, productos refinados provenientes de las harinas pueden utilizarse y los más prometedores son los concentrados de proteína vegetal (Hardy, 2010). Los concentrados de proteína de cereales y semillas oleaginosas usualmente contienen altos niveles de proteína, además de concentraciones bajas de anti-nutrientes y aunque se ha reportado que los concentrados de proteína no causan enteritis intestinal en salmónidos (Refstie *et al.*, 2001; Hardy, 2010), existe poca información sobre cómo estos compuestos afectan al sistema inmune y la respuesta inflamatoria en el sistema digestivo de peces (Zhou *et al.*, 2017).

Por otro lado, el uso de proteína de origen vegetal podría requerir el uso de prebióticos que permitan una mejor digestibilidad y uso apropiado de los nutrientes, lo cual se verá reflejado no solo en un mejor crecimiento, sino también en una respuesta inmune adecuada (Sánchez *et al.*, 2015).

Los prebióticos son compuestos no digeribles (en su mayoría oligosacáridos) que se utilizan como ingredientes en el alimento, estos estimulan el crecimiento de bacterias y otros microorganismos en el hospedero (Merrifield *et al.*, 2010). Tienen diferentes formas de acción: exclusión competitiva de bacterias patógenas, proporcionan nutrientes al hospedero y contribuyen con enzimas para la digestión, así como la modificación del microambiente en el sistema digestivo (Carbone y Faggio, 2016).

Algunos de los prebióticos que se utilizan actualmente en organismos acuáticos son los fructooligosacáridos (FOS) y manano-oligosacáridos (MOS). Los FOS son cadenas cortas y medianas de b-D-fructanos, y puede ser fermentado por ciertas bacterias como los lactobacilos y las bifidobacterias. Las inclusiones dietéticas de FOS apoyan selectivamente el crecimiento y la supervivencia de tales bacterias en el tracto gastrointestinal de los animales y se ha demostrado que la suplementación dietética de FOS mejora la tasa de crecimiento de algunos animales acuáticos (Amenyogbe *et al.*, 2020).

En tanto que los MOS son complejos de glucomannoproteínas derivados de la pared celular de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Se han demostrado efectos positivos en trucha arcoíris cuando se alimenta con dietas que contienen MOS, los cuales son el aumentar el rendimiento de crecimiento, alargar los pliegues vellosos intestinales y así aumentar la superficie de absorción, la actividad hemolítica y la actividad fagocítica (Ringø *et al.*, 2010).

## ANTECEDENTES

Escaffre *et al.* (2007), investigaron los efectos de la sustitución completa de la harina de pescado por concentrado de proteína de soya en dietas para trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) sobre la histología intestinal y hepática. Observaron que la altura del pliegue, la longitud del epitelio, la proporción de estroma de los intestinos proximal y distal no se vieron afectados por la dieta, por lo que no hubo efecto sobre la morfología intestinal y sobre el índice hepatosomático de los peces. En conclusión, el concentrado de proteína de soya no provocó una reacción inflamatoria ni afectó la superficie del epitelio. Concluyen que esto puede estar relacionado con variaciones en el estado metabólico.

Yilmaz *et al.* (2007), evaluaron los efectos de dietas con MOS en el crecimiento, composición corporal, y la histología intestinal y hepática de trucha arcoíris. Las dietas experimentales se complementaron con 0 (control), 1.5, 3.0 o 4.5 g/kg de MOS. Observaron un rendimiento de crecimiento mejorado en los peces alimentados con la dieta suplementada con 1.5% y en cuanto a la histología vieron que las vellosidades de los peces alimentados con dietas suplementadas con 1.5 y 3.0%, fueron más largas que los de los peces con 4.5% ( $p < 0.05$ ). Además los contenidos de proteínas aumentaron a medida que aumentaba la cantidad de MOS ( $p < 0.05$ ). Concluyeron que no hubo diferencias significativas en el índice de conversión alimenticia, índice de eficiencia proteica o índice hepatosomático ( $p > 0.05$ ) y que la suplementación con MOS no tiene efectos perjudiciales en el intestino.

Ortiz, *et al.* (2012), estudiaron los efectos de la inulina y los fructooligosacáridos (FOS) sobre el rendimiento del crecimiento, la composición química del cuerpo y la microbiota intestinal de trucha arcoíris criadas en condiciones de piscicultura. Las truchas fueron alimentadas con dietas que contenían inulina o FOS (5 y 10 g/kg). Obtuvieron mejoras significativas en el aumento de peso corporal en los tratamientos en comparación con los controles (sin FOS). Además detectaron una disminución en el contenido de proteína cruda y una tendencia a aumentar el contenido total de lípidos para los tratamientos con prebióticos y también mejoraron la absorción intestinal de Ca. Concluyeron que la inulina dietética o la suplementación con FOS tuvieron un efecto promotor del crecimiento en las truchas arcoíris criadas en condiciones de cultivo.

Řehulka, *et al.* (2014), examinaron el efecto de fructooligosacáridos (Profeed®) en la dieta de truchas arcoíris sobre su crecimiento y estado fisiológico a través de parámetros bioquímicos en el plasma sanguíneo. El prebiótico se administró de forma continua a razón de 1 g/kg de gránulos durante 105 días. El mejor rendimiento de crecimiento para el grupo experimental se encontró a los 42 y en 63 días. El índice de crecimiento específico del tratamiento fue del 0.69% y del grupo control de 0.70%. Obtuvieron diferencias significativas en algunos parámetros bioquímicos, sugieren que valdría la pena probar concentraciones más altas de este prebiótico.

Denji *et al.* (2015), investigaron los efectos de los MOS (activeMOS®) sobre el rendimiento del crecimiento de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Grupos por triplicado fueron alimentados con una dieta control o dietas que contenían 1, 2.5 y 4.0 g/kg de MOS. Al final del ensayo de 60 días, los resultados mostraron que en el grupo alimentado con 1 g/kg de MOS adquirido peso final, aumento de peso corporal, tasa de crecimiento específico e índice de conversión alimenticia significativamente más altos que los otros grupos experimentales ( $p < 0.05$ ). Los rendimientos de crecimiento más altos y más bajos se observaron en 1 g de MOS kgG1 y control, respectivamente. Además no hubo diferencias significativas en la cantidad de glucosa, colesterol, triglicéridos y proteína total entre los tratamientos. Concluyen que la administración dietética de MOS a un nivel de 1 g/kg puede influir positivamente en el rendimiento del crecimiento, la microflora intestinal, la composición corporal y algunos parámetros sanguíneos de juveniles de trucha arcoíris.

Akrami *et al.* (2015), realizaron un experimento de alimentación de 48 días para evaluar los efectos del prebiótico comercial A-Max, una mezcla de MOS, FOS y  $\beta$  glucano, en juveniles de trucha arcoíris. Hicieron suplementaciones de 0.5, 1.0 y 1.5 g/kg del prebiótico. Los juveniles alimentados con 1.5 g/kg mostraron un peso final, ganancia de peso, índice de eficiencia proteica, ganancia de biomasa significativamente más altos y un índice de conversión alimenticia significativamente más bajo en comparación con el grupo control ( $P < 0.05$ ); la proteína corporal, proteína sérica, albúmina y glucosa en suero no se vieron afectadas por la dieta, por lo que concluyeron que el prebiótico mejoró el crecimiento y la eficiencia de la alimentación en los juveniles de trucha arcoíris sin causar impactos perjudiciales en la química sanguínea, por lo que podría ser un complemento apropiado en las dietas para esta especie.

## JUSTIFICACIÓN

El uso de proteínas vegetales en las dietas para trucha arcoíris ha sido ampliamente estudiado y se han obtenido resultados tanto positivos como negativos (Hardy, 1996; Zhang *et al.*, 2012), así mismo, el uso de prebióticos como ingredientes funcionales en alimentos acuícolas es un enfoque emergente con resultados positivos, entre los que se encuentra mejorar la absorción de nutrientes y la salud general de los organismos (Farzad *et al.*, 2020), por lo que la adición de ingredientes vegetales a dietas con prebióticos podría mostrar un mejoramiento en el crecimiento y salud de los peces; sin embargo, hasta el momento hay muy poca información sobre su inclusión en dietas con altos contenidos de proteína vegetal y sus efectos en el crecimiento, así como en las respuestas inmunes e inflamatorias de juveniles de trucha arcoíris.

# OBJETIVOS

## Objetivo general

- Determinar el efecto de dietas con concentrados de proteína vegetal y la adición de fructooligosacáridos o manano-oligosacáridos, en juveniles de trucha arcoíris.

## Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de dietas con concentrados de proteína vegetal y la adición de fructooligosacáridos o manano-oligosacáridos sobre los parámetros de crecimiento de juveniles de trucha arcoíris.
- Determinar la química sanguínea de juveniles de trucha arcoíris alimentadas con dietas con concentrados de proteína vegetal y la adición de fructooligosacáridos o manano-oligosacáridos.
- Determinar el efecto de dietas con concentrados de proteína vegetal y la adición de fructooligosacáridos o manano-oligosacáridos sobre la integridad del epitelio del intestino de juveniles de trucha arcoíris.

## MATERIALES Y MÉTODO

### Obtención de organismos.

Las truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se obtuvieron del centro acuícola El Zarco ubicado en el kilómetro 32 de la carretera México-Toluca. Los organismos fueron acondicionados en el Laboratorio de Producción Acuícola, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Se aclimataron en un tanque de 400 L durante 30 días para que se acostumbraran a las condiciones del agua y de temperatura ambiente. Durante este tiempo fueron alimentadas dos veces por día con una dieta comercial de la marca Grow Fish®.

### Formulación y preparación de las dietas.

Se elaboraron 3 dietas con una mezcla de proteína vegetal, de las cuales dos dietas son los tratamientos a los que se agregó 3% de fructooligosacáridos (FOS) (30 g/kg) y 3% de manano-oligosacáridos (MOS) (30 g/kg) respectivamente y a expensas de la alfa - celulosa (tabla 1 y 2).

**Tabla 1.** Formulación de las dietas experimentales usadas en la prueba de alimentación de juveniles de trucha arcoíris.

Ingrediente g/kg	Control	FOS	MOS
Concentrado de proteína de soya	234	234	234
Concentrado de proteína de arroz	241	241	241
Gluten de maíz	170	170	170
Aceite de pescado	70	70	70
Lecitina de soya	50	50	50
Dextrina	100	100	100
Mezcla de vitamina y minerales	40	40	40
Gluten de trigo	50	50	50
alfa-celulosa	45	15	15
FOS	0	30	0
MOS	0	0	30

**Tabla 2.** Composición proximal de las dietas.

	<b>control</b>	<b>MOS</b>	<b>FOS</b>	<b>comercial</b>
<b>Proteína</b>	46.86%	47.04%	44.53%	45%
<b>Lípidos</b>	12.29%	13.03%	13.67%	16%
<b>Ceniza</b>	5.63%	5.80%	5.65%	12%
<b>Humedad</b>	8.09%	6.74%	10.10%	11%

Las dietas fueron preparadas de acuerdo con Cruz *et al.* (2011). Los ingredientes sólidos fueron revueltos con el aceite de pescado y agua destilada (40%). La masa húmeda se pasó a través de un picador de carne para producir gránulos que fueron secados a 60 ° C en un horno a temperatura constante durante 24 horas y se almacenaron a -20 ° C hasta su uso. Como control se utilizó únicamente la dieta basal sin ningún agregado, y una dieta comercial de la marca Grow Fish®.

#### **Prueba de alimentación.**

Cuatro grupos con tres repeticiones cada uno y veinte peces por repetición, fueron colocados en tanques con capacidad de 100 L, dando un total de 240 organismos. Se le suministro a cada grupo una ración diaria equivalente al 7% de la biomasa total dentro de cada tanque. La ración se dividió en dos porciones, de las cuales una se colocó en los tanques a las 9:00 y la otra a las 17:00 horas. Veinte minutos después de cada ración los tanques se sifoneaban para retirar los residuos de alimento y heces. Los tanques se mantuvieron bajo fotoperíodo natural.

Fue registrado el peso de los organismos ( $\pm 0.01$  mg) al inicio y cada 10 días del experimento hasta los 60 días. La ración de alimento se ajustó de acuerdo con el peso. La alimentación se suspendió 24 horas antes de cada biometría para asegurar que hubiera evacuación gástrica. Fueron sacrificados veinte organismos antes del comienzo de la prueba, cinco de los cuales fueron para la técnica histológica H&E, cinco para la prueba de RNA y diez fueron congelados para la obtención de los químicos proximales.

Al finalizar la prueba de alimentación seis organismos por tratamiento fueron sacrificados, de los cuales tres fueron para la disección del intestino con el fin de

determinar su integridad bajo la técnica histológica H&E (Verdín *et al.*, 2013), la parte media del intestino se destinó a las pruebas de expresión genética, de igual forma se les extrajo el hígado y una muestra de piel para el análisis de contenido proteico y lipídico. Los otros tres organismos fueron sacrificados para el análisis de química sanguínea.

La temperatura promedio del agua durante el experimento fue de  $20.15 \pm 0.15$  °C a las 9:00 y de  $21.24 \pm 0.17$  °C a las 17:00, en tanto que el oxígeno disuelto promedio fue de  $5.14 \pm 0.06$  mg/L.

### **Parámetros de crecimiento.**

Se midió la ganancia en peso (GP), tasa de crecimiento específico (TCE) y la tasa de conversión alimenticia (TCA), con las siguientes fórmulas:

- Ganancia en Peso (GP) %

$$GP = \frac{PF - PI}{PI} \times 100$$

Donde:

PF= Peso final, PI= Peso inicial

- Tasa de crecimiento específico (TCE) (%)

$$TCE = \frac{\ln(PF) - \ln(PI)}{t} \times 100$$

Donde:

ln= logaritmo natural, PF= peso final, PI= peso inicial, t= tiempo de alimentación

- Tasa de conversión alimenticia (TCA)

$$TCA = \frac{GP}{a}$$

Donde: GP= ganancia en peso (g), a= total de alimento consumido en base seca (g)

- Tasa de ingesta

$$TI = (g)/pez/día$$

### **Composición proximal.**

Se determinó la composición proximal de cenizas y humedad en las dietas con las técnicas reportadas por Olvera *et al.*, (1993). Para el contenido de lípidos totales en músculo, hígado y dietas se utilizó la técnica de cloroformo y etanol descrita por Bligh y Dyer (1959). La determinación de proteínas totales en músculo, hígado y dietas se realizó con la técnica de Kjeldahl.

### **Química sanguínea.**

Se extrajo la sangre de 3 organismos al azar y por cada tratamiento. Las muestras se colectaron del pedúnculo caudal y fueron puestas en tubos eppendorf de 1.5 mL. Se dejó coagular la muestra a 4 °C durante un período de dos horas. Transcurrido este período, las muestras fueron colocadas en la micro centrifuga a 10,000 rpm durante 15 minutos. Se extrajo el suero sanguíneo (sobrenadante), se colocó en otros tubos eppendorf de 1.5 mL y se llevó a refrigeración a -20 °C.

Se determinó el contenido de proteína (Thermo Scientific™ Micro BCA™ Protein Assay Kit), triglicéridos (EnzyChrom™, Triglyceride Assay Kit) y glucosa en suero sanguíneo (abcam®, Glucose Assay Kit).

### **Técnica histológica.**

Al finalizar la prueba de alimentación fueron seleccionados al azar 3 organismos de cada tratamiento, después de la disección se extrajo el intestino y se dividió en dos diferentes regiones, proximal y distal. Las muestras fueron fijadas en formol al 4%. Los componentes del formol fueron: formol 100 mL, agua destilada 900 mL, sodio monobásico 4 gr y fosfato de sodio dibásico anhidrido 6 gr. Después de 72 horas Las muestras se lavaron con agua destilada y se deshidrataron en una serie ascendente de alcoholes (70%, 80%, 90%, 96% y 100%), antes de sumergirlos en xilol y luego ser

puestos en cera de parafina (Paraplast) y embebidos en bloques de acuerdo con una orientación adecuada. Cada bloque fue cortado piramidalmente para dejar en la punta solo la sección que tenía tejido, luego se cortaron secciones de 5  $\mu\text{m}$  con un micrótomo para parafina. Los cortes fueron colocados en portaobjetos en series de ocho a nueve, se adhirieron con ruyter y sobre una plancha térmica a 55 °C durante 45 minutos. Finalmente se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) (Verdín *et al.*, 2013) y se hicieron observaciones a 100x, 200x y 400x.

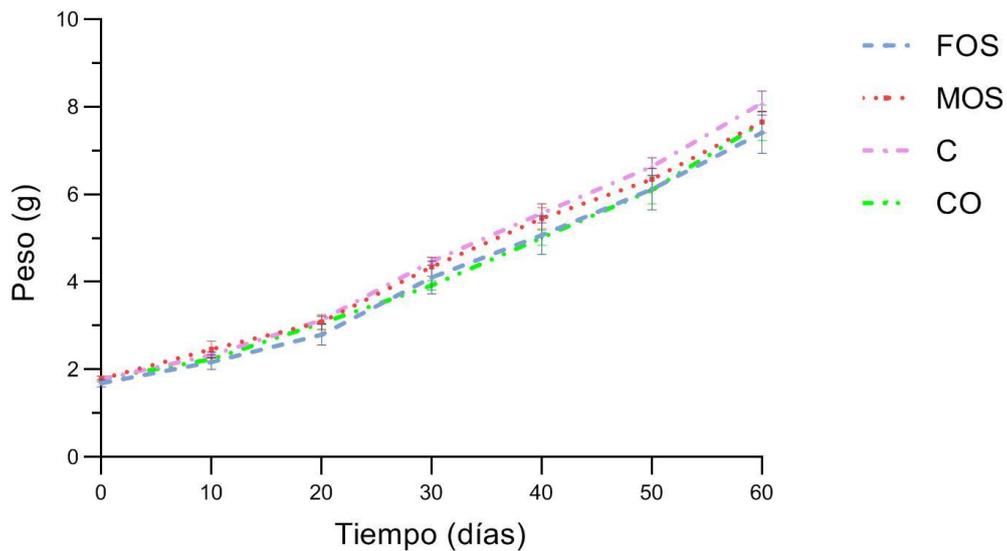
### **Análisis estadístico.**

Los datos se analizaron para determinar la normalidad y la homocedasticidad con la prueba de Shapiro-Wilk. Posteriormente se compararon mediante ANOVA de un factor y las diferencias significativas entre los tratamientos se evaluaron mediante la prueba de comparación múltiple Tukey con el programa Prism 8, GraphPad Software. Se utilizó un error del 5% ( $p < 0.05$ ) para considerar a las diferencias significativas (Zar, 1999).

## RESULTADOS

### Parámetros de crecimiento.

En la figura 1 se observa el peso en gramos de los organismos durante los 60 días de la prueba. A partir del día treinta el grupo alimentado con la dieta control muestra un ligero incremento con respecto a los demás grupos, mientras que los organismos alimentados con la dieta FOS fueron los de menor peso al final de la prueba. No hay diferencias significativas entre los tratamientos.



**Figura 1.** Peso promedio en gramos de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) determinado cada 10 días a lo largo de 60 días. Cada punto representa la media de tres  $\pm$  el error estándar. No hay diferencias significativas a este nivel.

Los valores biométricos (ganancia en peso, tasa de crecimiento específico y tasa de conversión alimenticia) se muestran en la tabla 3. Se observan valores de ganancia en peso (GP) y tasa de crecimiento específico (TCE) más altos en el grupo alimentado con la dieta control. Respecto a la tasa de conversión alimenticia (TCA) fue más alta en el grupo MOS el cual también tuvo la menor GP. La tasa de ingesta (TI) fue mayor en los grupos control y MOS en tanto que el grupo comercial tuvo el menor valor. No obstante estas variaciones, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 3.** Valores de ganancia en peso (GP), tasa de crecimiento específico (TCE), tasa de conversión alimenticia (TCA) y tasa de ingesta (TI) en juveniles de trucha arcoíris alimentados con las dietas FOS, MOS, Control y Comercial durante 60 días. Los datos son la media de tres repeticiones  $\pm$  el error estándar. No se observaron diferencias significativas a este nivel ( $P < 0.05$ ).

Tratamiento	GP (%) <sup>1</sup>	TCE (%/día) <sup>2</sup>	TCA <sup>3</sup>	TI (g/pez/día) <sup>4</sup>
<b>Control</b>	354.61 $\pm$ 20.28	2.52 $\pm$ 0.07	1.28 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.01
<b>FOS</b>	341.27 $\pm$ 33.86	2.46 $\pm$ 0.13	1.33 $\pm$ 0.12	0.22 $\pm$ 0.02
<b>MOS</b>	327.97 $\pm$ 13.22	2.42 $\pm$ 0.05	1.39 $\pm$ 0.15	0.25 $\pm$ 0.02
<b>Comercial</b>	329.53 $\pm$ 33.09	2.41 $\pm$ 0.13	1.15 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.00

<sup>1</sup>GP: ganancia en peso = ((peso final – peso inicial)/peso inicial) x 100

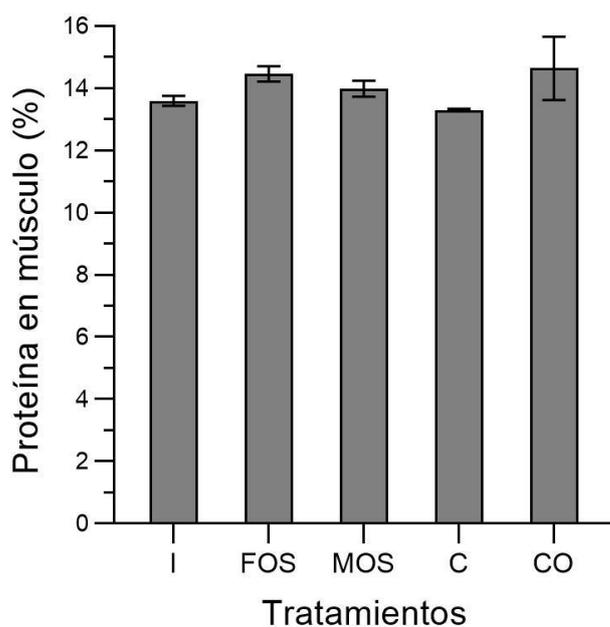
<sup>2</sup>TCE: tasa de crecimiento específico = ((ln de peso final – ln de peso inicial) / 60) x 100

<sup>3</sup>TCA: tasa de conversión alimenticia = ganancia en peso (g) / total de alimento consumido (g)

<sup>4</sup>TI: tasa de ingesta

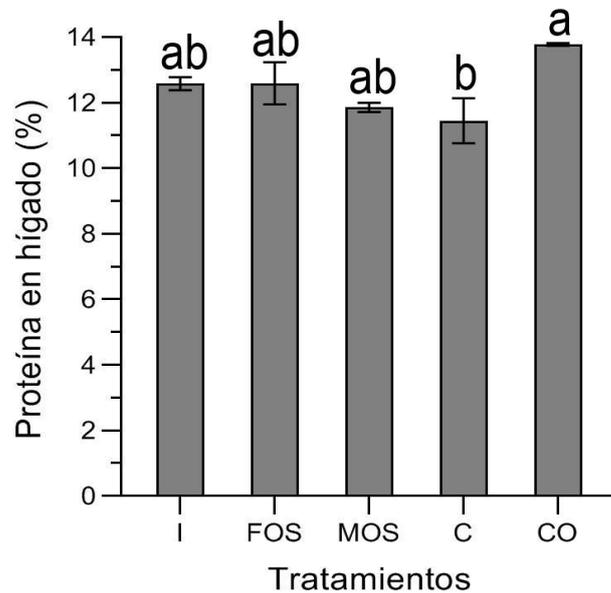
### Composición proximal.

El contenido de proteína en músculo se presenta en la figura 2. Aunque no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los distintos tratamientos con respecto al grupo control y el inicial, se observa que la media más alta fue la del grupo alimentado con la dieta comercial con un valor de 14.64% y el valor más bajo lo presenta la media del grupo control con 13.30%.



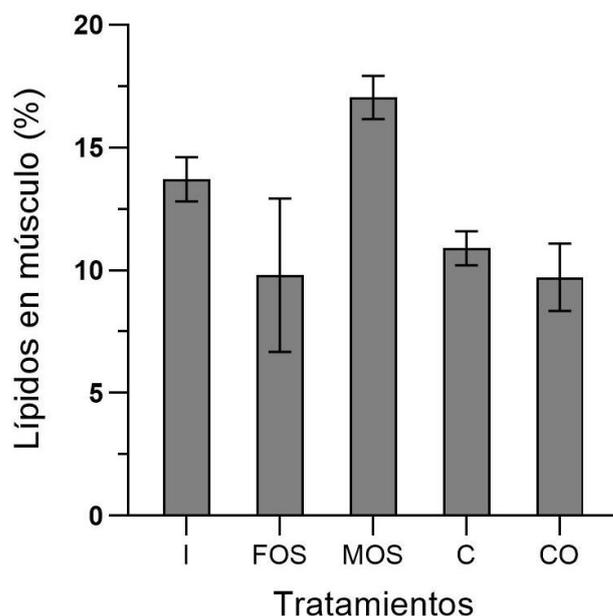
**Figura 2.** Contenido de proteína en músculo de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Las barras son la media de tres repeticiones  $\pm$  el error estándar. No se encontraron diferencias significativas a este nivel ( $p < 0.05$ ).

Con respecto al contenido de proteína en hígado (figura 3) se puede observar que los organismos alimentados con la dieta comercial tuvieron el valor más alto, y hubo una diferencia significativa entre los tratamientos comercial (CO) y control (C), teniendo este último el menor porcentaje de proteína.



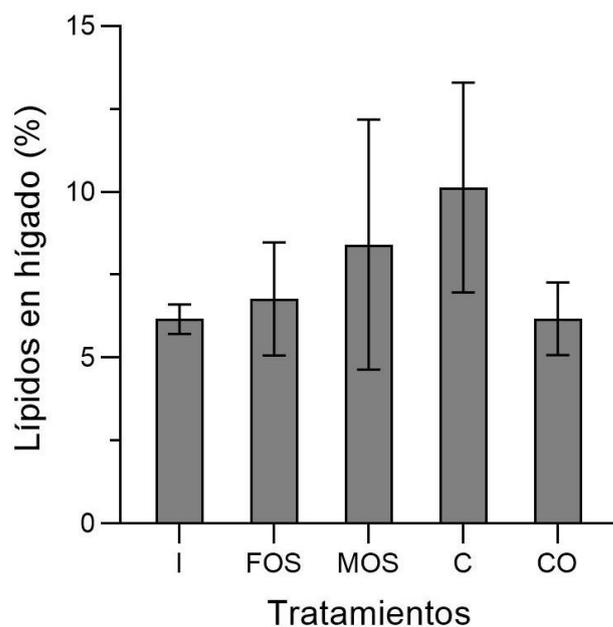
**Figura 3.** Contenido de proteína en hígado de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Media de tres repeticiones  $\pm$  el error estándar. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos control (C) y comercial (CO).

Los valores del porcentaje de lípidos en el músculo están presentados en la figura 4. No hay diferencias significativas entre los tratamientos; Se observa que los organismos alimentados con la dieta MOS fueron los que tuvieron el valor más alto, y el valor más bajo lo tuvo el tratamiento comercial (CO).



**Figura 4.** Contenido de lípidos en músculo dado en porcentaje de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*. promedio de tres repeticiones  $\pm$  el error estándar. No se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre ningún tratamiento a este nivel.

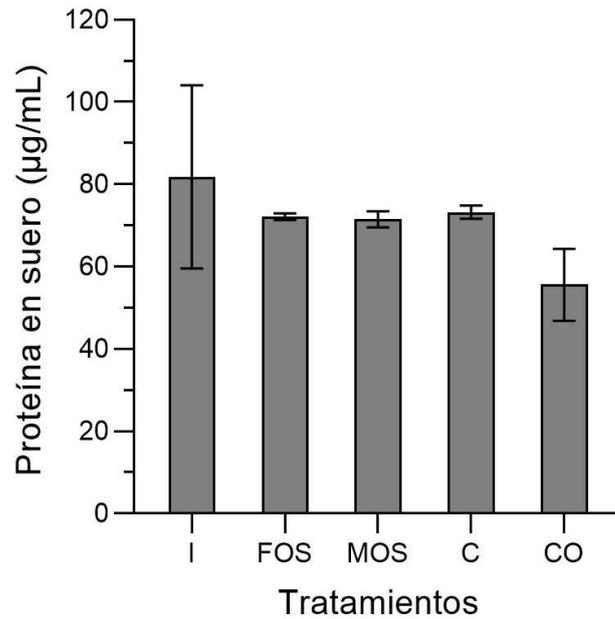
Por otro lado, el mayor porcentaje de lípidos en hígado se encontró en los organismos alimentados con la dieta control (C), y el menor porcentaje en los organismos iniciales (I); ningún tratamiento mostró diferencias significativas (figura 5).



**Figura 5.** Porcentaje de lípidos en hígado de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con dietas a base de proteína vegetal. Medias de tres repeticiones  $\pm$  el error estándar. No se encontraron diferencias significativas a este nivel ( $p < 0.05$ ).

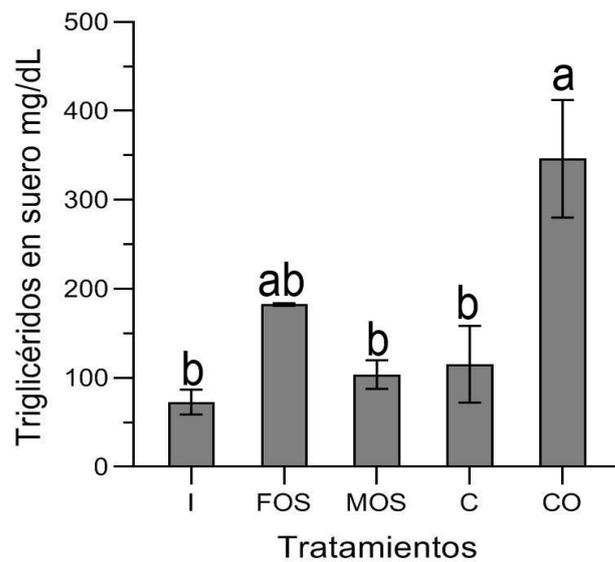
### Química sanguínea.

Los resultados obtenidos para la proteína en suero sanguíneo se muestran en la figura 6. Se observa un mayor contenido de proteína en los organismos iniciales (I) que en todos los demás tratamientos; por otro lado el grupo con el valor más bajo es el de la dieta comercial (CO); no se encontraron diferencias significativas entre ningún tratamiento.



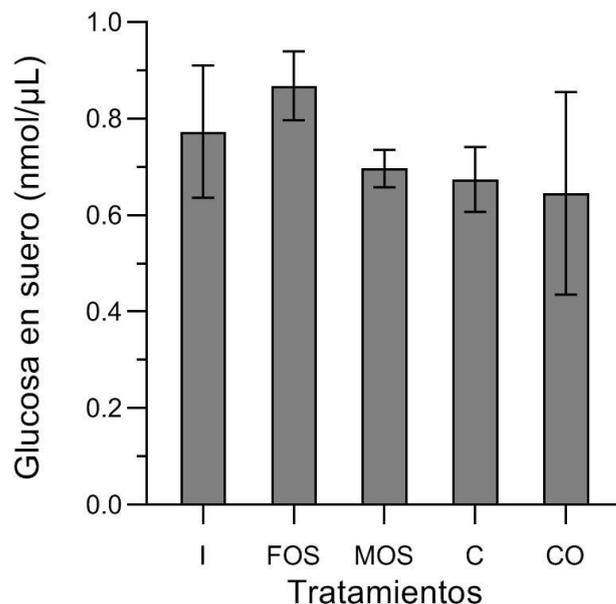
**Figura 6.** Cantidad de proteína en suero sanguíneo en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con dietas a base de proteína vegetal. Medias de tres repeticiones  $\pm$  el error estándar. No se encontraron diferencias significativas a este nivel ( $p < 0.05$ ).

En la figura 7 se pueden observar los valores de triglicéridos en suero sanguíneo para los distintos tratamientos y las muestras iniciales. Se observa que los organismos alimentados con la dieta comercial (CO) tuvieron un valor significativamente mayor al grupo control (C), al tratamiento MOS (MOS) y a los organismos iniciales (IN) ( $p < 0.01$ ).



**Figura 7.** Cantidad de triglicéridos en suero sanguíneo en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con dietas a base de proteína vegetal. Medias de tres repeticiones  $\pm$  el error estándar. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos CO-C, CO-MOS y CO-I.

En lo que respecta al contenido de glucosa en suero sanguíneo, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y con respecto al grupo inicial. Se observa que los organismos alimentados con la dieta FOS tuvieron un mayor contenido de glucosa en suero sanguíneo; en tanto que el grupo alimentado con la dieta comercial (CO) tuvo el valor más bajo (figura 8).

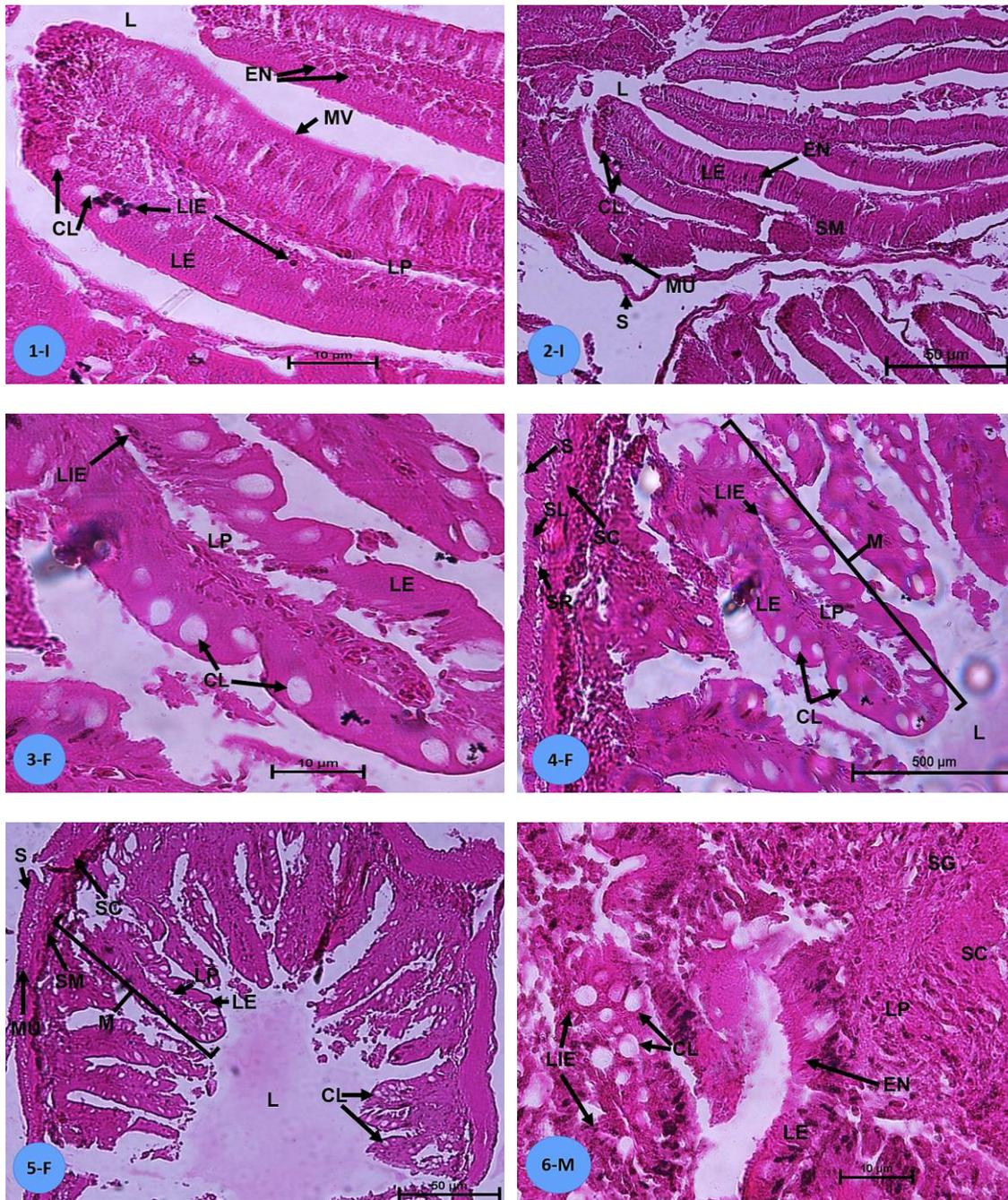


**Figura 8.** Cantidad de glucosa en suero sanguíneo de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con dietas a base de proteína vegetal. Medias de tres repeticiones  $\pm$  el error estándar. No se encontraron diferencias significativas a este nivel ( $p < 0.05$ ).

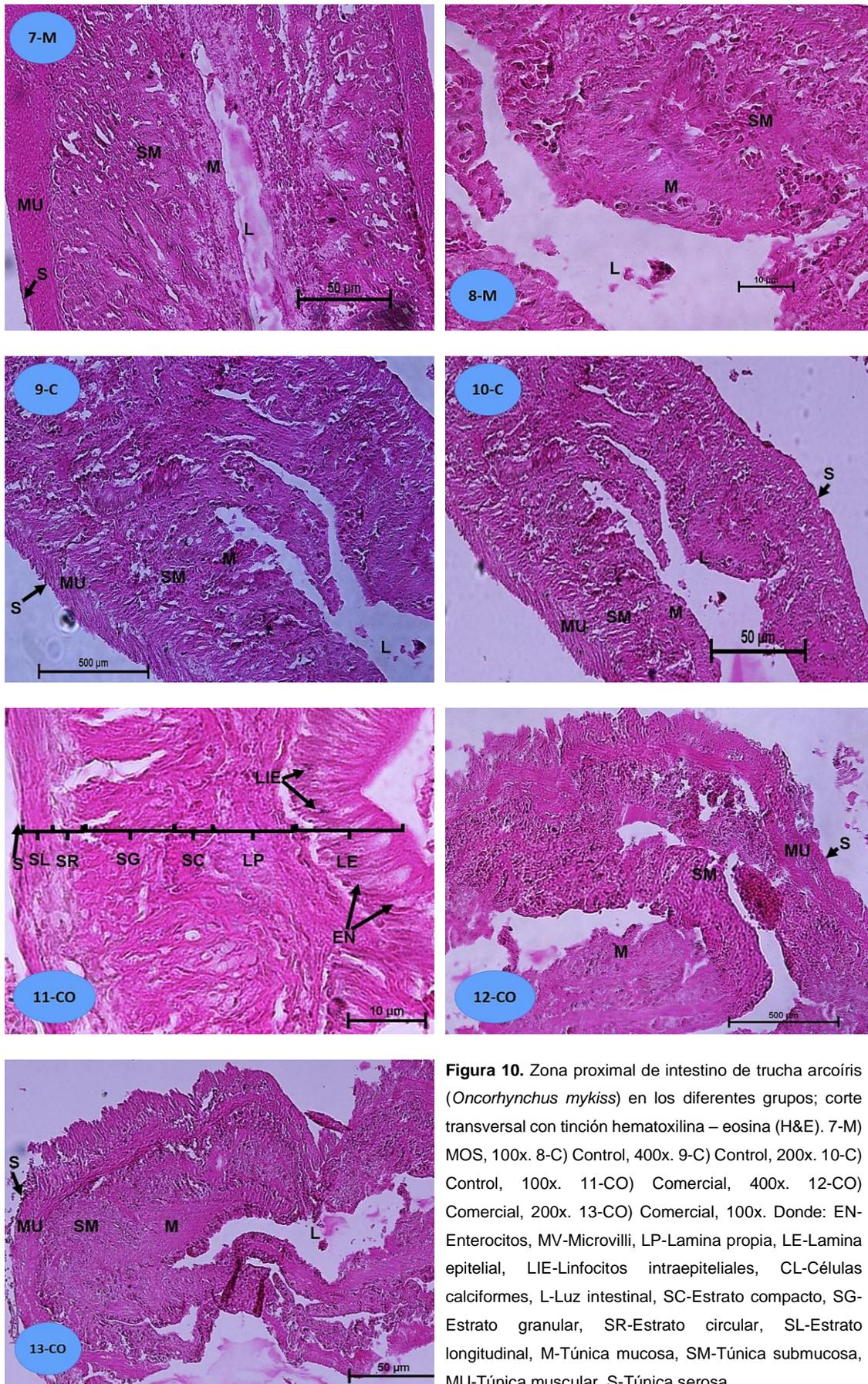
### **Análisis histológico.**

Los resultados de las observaciones histológicas en la zonas proximal y distal del intestino de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) mostraron que hay un aspecto normal de la estructura celular (Figuras 9 - 12); se observa la túnica mucosa (M) que está formada por la lámina epitelial (LE) (células epiteliales absorbentes y columnares de una sola capa) además de enterocitos (EN) con microvellosidades (MV) en la zona dirigida hacia la luz (L) del intestino lo cual aumenta la capacidad de absorción. También células calciformes (CL) (células secretoras de mucosa) y lámina propia (LP) la cual está conformada por tejido conectivo.

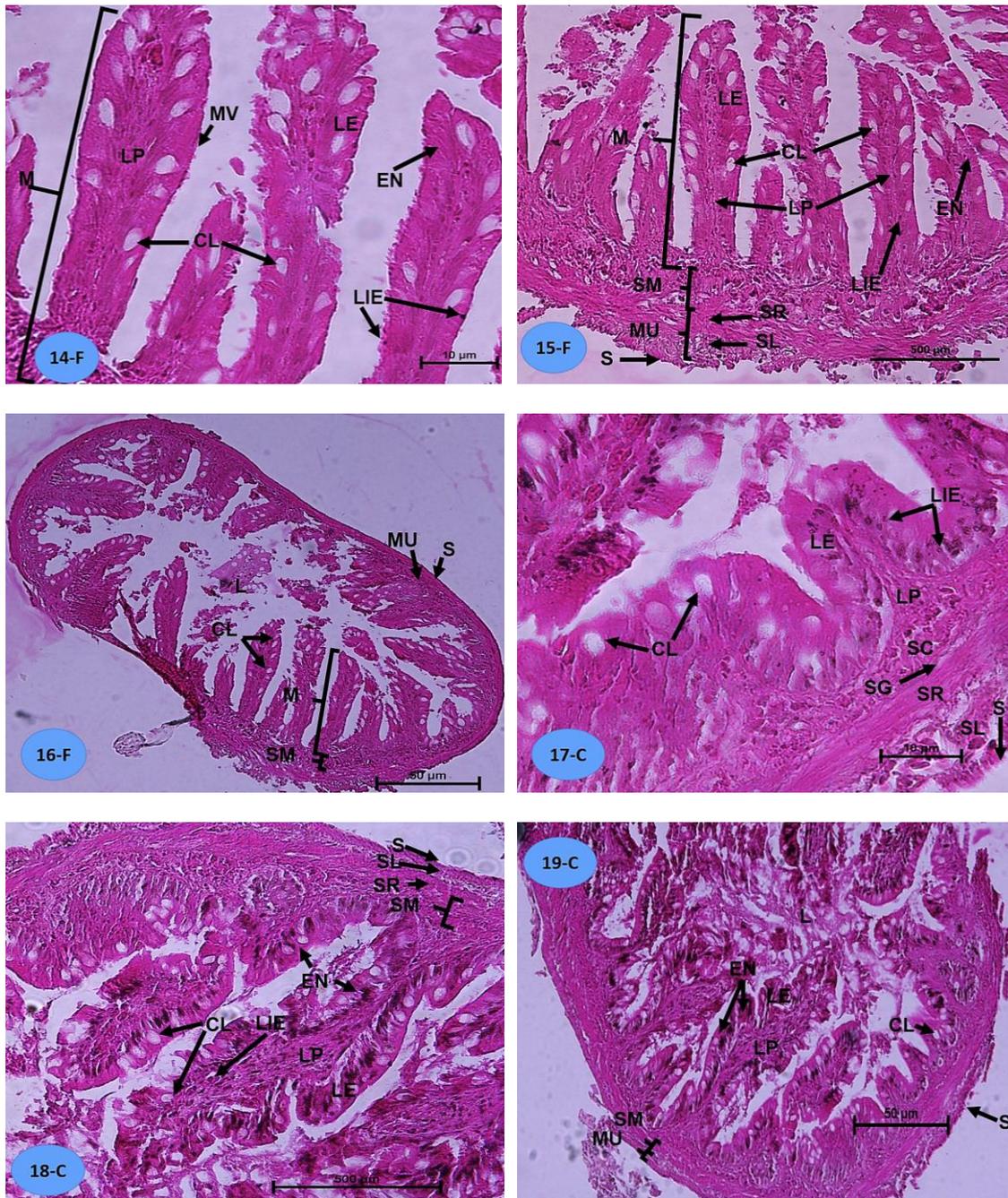
La túnica submucosa (SM) está conformada de doble capa: estrato compacto (SC) y estrato granuloso (SG); de igual forma fueron observadas sin alteraciones morfológicas la túnica muscular (MU), con las dos capas que la componen, el estrato circular (SR) y el estrato longitudinal (SL). La membrana serosa (S) conformada por tejido conjuntivo se encuentra recubriendo el tubo digestivo. Además se observan linfocitos intraepiteliales (LIE) que se intercalan con las células columnares del epitelio.



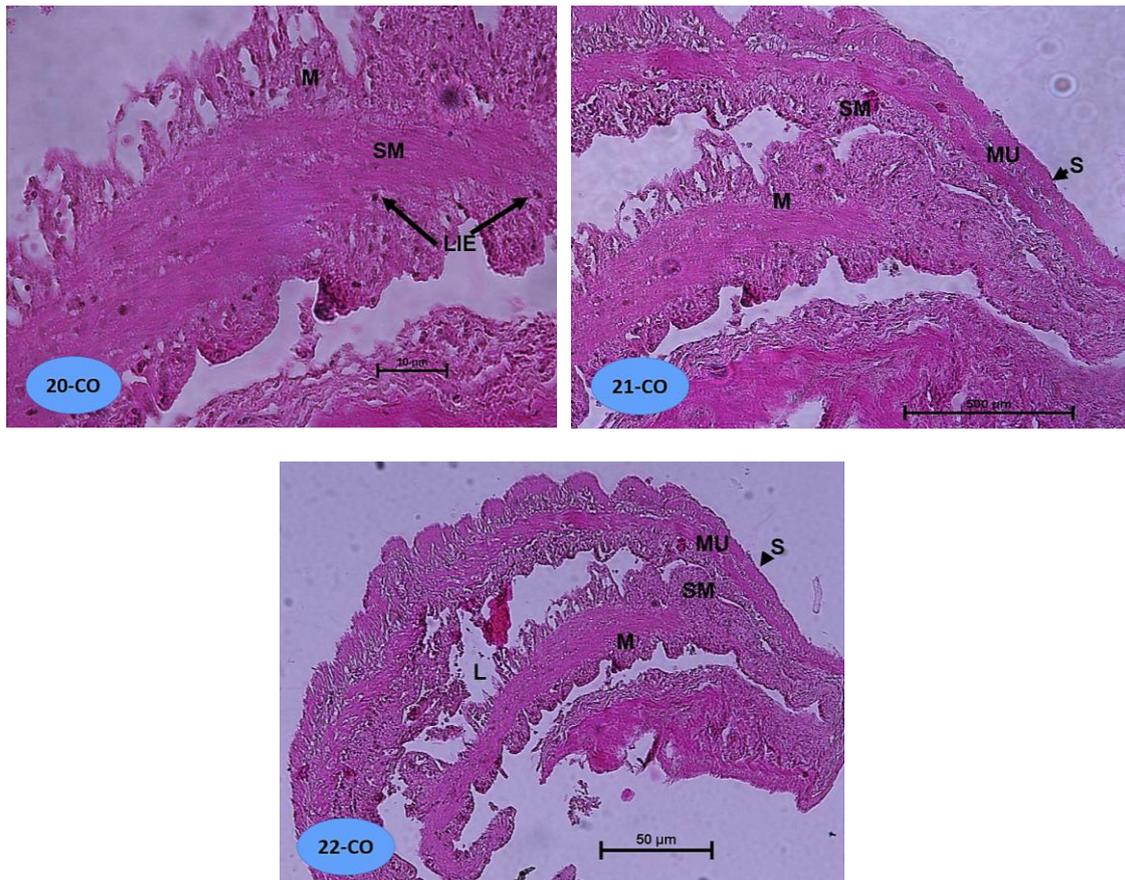
**Figura 9.** Estructura histológica de la zona proximal del intestino de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en los diferentes tratamientos; corte transversal con tinción hematoxilina – eosina (H&E). 1-I) Inicial, 400x. 2-I) Inicial, 100x. 3-F) FOS, 400x. 4-F) FOS, 200x. 5-F) FOS, 100x. 6-M) MOS, 400x. Donde: EN-Enterocitos, MV-Microvilli, LP-Lamina propia, LE-Lamina epitelial, LIE-Linfocitos intraepiteliales, CL-Células calciformes, L-Luz intestinal, SC-Estrato compacto, SG-Estrato granular, SR-Estrato circular, SL-Estrato longitudinal, M-Túnica mucosa, SM-Túnica submucosa, MU-Túnica muscular, S-Túnica serosa.



**Figura 10.** Zona proximal de intestino de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en los diferentes grupos; corte transversal con tinción hematoxilina – eosina (H&E). 7-M) MOS, 100x. 8-C) Control, 400x. 9-C) Control, 200x. 10-C) Control, 100x. 11-CO) Comercial, 400x. 12-CO) Comercial, 200x. 13-CO) Comercial, 100x. Donde: EN-Enterocitos, MV-Microvilli, LP-Lamina propia, LE-Lamina epitelial, LIE-Linfocitos intraepiteliales, CL-Células calciformes, L-Luz intestinal, SC-Estrato compacto, SG-Estrato granular, SR-Estrato circular, SL-Estrato longitudinal, M-Túnica mucosa, SM-Túnica submucosa, MU-Túnica muscular, S-Túnica serosa.



**Figura 11.** Histología en la parte distal del intestino de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en los diferentes tratamientos; corte transversal con tinción hematoxilina – eosina (H&E). 14-F) FOS, 400x. 15-F) FOS, 200x. 16-F) FOS, 100x. 17-C) Control, 400x. 18-C) Control, 200x. 19-C) Control, 100x. Donde: EN-Enterocitos, MV-Microvilli, LP-Lamina propia, LE-Lamina epitelial, LIE-Linfocitos intraepiteliales, CL-Células calciformes, L-Luz intestinal, SC-Estrato compacto, SG-Estrato granular, SR-Estrato circular, SL-Estrato longitudinal, M-Túnica mucosa, SM-Túnica submucosa, MU-Túnica muscular, S-Túnica serosa.



**Figura 12.** Estructura histológica de la zona distal del intestino de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el grupo comercial; corte transversal con tinción hematoxilina – eosina (H&E). 20-CO) Comercial, 400x. 21-CO) Comercial, 200x. 22-CO) Comercial, 100x. Donde: LIE-Linfocitos intraepiteliales, L-Luz intestinal, M-Túnica mucosa, SM-Túnica submucosa, MU-Túnica muscular, S-Túnica serosa.

## DISCUSIÓN

En la evaluación del efecto de dietas con concentrados de proteína vegetal los resultados muestran que el uso de estos concentrados en la alimentación de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) no tiene diferencias con respecto al pienso comercial en los parámetros de crecimiento, lo que indica que hubo un rendimiento similar en todos los tratamientos. Kaushik *et al.* (1995), reemplazaron la harina de pescado por proteína de soya hasta en un 100% y midieron su efecto sobre el crecimiento y la utilización de proteínas en trucha arcoíris; concluyendo que el reemplazo del 33 al 100% de harina de pescado por concentrado de proteína de soya no afectó el rendimiento del crecimiento ni la utilización de nutrientes de los organismos. Esto concuerda con los resultados de la presente investigación, lo que confirma que la harina de pescado puede ser sustituida por concentrado de proteína de soya en dietas para trucha arcoíris sin que se vea comprometido el rendimiento de crecimiento (Kaushik *et al.*, 1995; Glencross *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2012); ya que el concentrado de proteína de soya ofrece un alto contenido de péptidos, un contenido de aminoácidos favorable y una baja cantidad de antinutrientes (Yamamoto *et al.*, 2012).

Los prebióticos son consumidos por bifidobacterias y lactobacilos, ocasionando una competencia con respecto a especies patógenas lo que desempeña un papel en la mejora del crecimiento de especies acuáticas (Dimitroglou *et al.*, 2009), pero se han hecho numerosos estudios con resultados contradictorios debido a que hay muchos factores que influyen en el rendimiento, como la dieta basal, los ingredientes prebióticos y su cantidad, el sistema de crianza, las condiciones higiénicas y la especie bajo estudio (Ringø *et al.*, 2014; Mirzapour-Rezaee *et al.*, 2016; Amenyogbe *et al.*, 2020). Los MOS y FOS son los oligosacáridos más comunes que muestran diferentes propiedades, y muchas veces ha resultado en un mejor rendimiento de crecimiento (Ringø *et al.*, 2010). En el presente estudio la adición de FOS y MOS no tuvo diferencias entre las TCA, TCE, GP y TI en los diferentes tratamientos, aunque es de notar un ligero incremento en el valor obtenido para las dietas con FOS y MOS con respecto a la dieta comercial, no así en comparación a la dieta control. Esto significa que no hubo un efecto positivo o negativo en cuanto a los parámetros de crecimiento con la adición de los prebióticos. Estos resultados se contrastan con los obtenidos por Akrami *et al.*, (2015) quienes evaluaron los efectos del prebiótico A-Max (una mezcla de MOS, FOS y  $\beta$  glucano) en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), y encontraron que el peso final y la GP fueron

significativamente mayor en el tratamiento con prebióticos (1.5 g/kg) que en el control, y concluyeron que la mezcla prebiótica mejora el crecimiento y la eficiencia de la alimentación en los juveniles de trucha arcoíris; contrario a esto, Yilmaz *et al.* (2007) obtuvieron que la suplementación con 1.5% de MOS en dietas para trucha arcoíris tuvo un ligero efecto positivo en el crecimiento pero no fue significativo en comparación al control y la dieta 3%; de la misma forma se obtuvo un ligero incremento en el crecimiento de trucha arcoíris con dietas suplementadas con 1% de FOS (Řehulka *et al.*, 2014). Se ha encontrado que la suplementación con FOS o MOS en dietas de diversas especies acuícolas tiene efectos positivos en el crecimiento, aunque no siempre de manera significativa y con suplementaciones por debajo de 10 g/kg (Staykov *et al.*, 2007; Grisdale – Helland *et al.*, 2008; Řehulka *et al.*, 2014; Denji *et al.*, 2015); en cantidades altas de prebióticos se ha visto que el rendimiento de crecimiento de los organismos puede disminuir (Yilmaz *et al.*, 2007) ya que la microbiota intestinal es incapaz de fermentar prebióticos excesivos, lo que afecta de manera negativa al desarrollo del pez (Soleimani *et al.*, 2012). Por tanto se puede inferir que en el presente trabajo la suplementación del 3% de FOS y MOS en dietas con concentrado de proteína vegetal estuvo fuera del nivel óptimo de efectividad para trucha arcoíris.

Los efectos positivos de los prebióticos también se asocia con una mejor digestibilidad de los nutrientes como el almidón, los lípidos y las proteínas (Askarian *et al.* 2011), lo que podría ser el resultado de una promoción de las enzimas amilasa, lipasa y proteasa estimuladas por las bacterias del ácido láctico (Refstie *et al.*, 2006). En el presente estudio el valor del contenido de proteína en músculo fue ligeramente más bajo en los tratamientos con FOS o MOS y en la deposición de proteínas en hígado el tratamiento con la dieta comercial tuvo un valor más alto. Por lo que no hubo un efecto positivo en la deposición de proteínas en el cuerpo con la suplementación de los prebióticos. Ortiz *et al.* (2012) también detectaron una disminución en el contenido de proteína cruda ( $p = 0.009$ ) en el cuerpo de trucha arcoíris alimentadas con una dieta que incluía 5 y 10 g/kg de FOS. De igual forma, Grisdale-Helland *et al.* (2008) encontraron que al agregar 10 g/kg de FOS en dietas para salmónidos, se vio disminuida la concentración de proteínas en el cuerpo, lo que se atribuyó a una menor utilización de aminoácidos y digestibilidad de la dieta. Contrario a esto Yilmaz *et al.* (2007), observaron que los contenidos de proteína en el cuerpo aumentaron a medida que aumentaba la cantidad de MOS ( $p > 0.05$ ) hasta 4.5 g/kg en dietas para trucha arcoíris; por lo que el presente estudio contradice lo referido por este autor. Una posible explicación de que todos los tratamientos tuvieran un valor más bajo en contenido de proteína que el de la dieta

comercial es que las fuentes de proteína de soja en los alimentos para peces carnívoros pueden afectar la digestión o absorción de nutrientes (Francis *et al.*, 2001), y son deficientes en los aminoácidos esenciales, metionina y lisina, que son esenciales para el crecimiento y la salud normales de los peces (Lee, *et al.*, 2016), por lo que se ha sugerido la suplementación de estos aminoácidos en dietas sin harina de pescado (Rawles *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2012).

El estudio de la retención de lípidos en los tejidos de los peces es importante porque es un indicador de su salud e igualmente influye en la calidad nutricional en la dieta humana (Bou *et al.*, 2017). Los principales lugares de almacenamiento de lípidos en el pescado son el hígado, el tejido adiposo perivisceral y el músculo (Guillaume *et al.*, 2004). En el presente estudio la deposición de lípidos en músculo no se vio influenciada por la suplementación con FOS o MOS. Yilmaz *et al.* (2007) también observaron que la inclusión de MOS a razón de 4.5 g/kg en la dieta para trucha arcoíris no afectó el contenido de lípidos en todo el cuerpo; sin embargo, Ortiz *et al.* (2012) observaron los efectos de la inulina y los FOS en la composición corporal de trucha arcoíris y detectaron una tendencia a aumentar el contenido total de lípidos para los tratamientos con prebióticos, lo que indica claramente que la inulina y el FOS mejoraron la absorción intestinal; por lo que tales resultados son contrarios con lo reportado en este trabajo, ya que el contenido de lípidos en la dieta FOS estuvo por debajo del control. Esta discrepancia en las respuestas podría atribuirse a una serie de factores como la especie, edad, tamaño de los peces, composición y contenido de nutrientes de la dieta, fuente y calidad de los ingredientes de prueba, las condiciones experimentales y temperatura del agua. De hecho, estas enormes variaciones entre los estudios hacen que sea problemático comparar los resultados de diferentes trabajos (Lee *et al.*, 2016). Si bien las diferencias en la composición química del cuerpo y los tejidos de las especies acuáticas dependen de factores como los ya mencionados, la razón principal generalmente proviene de la dieta (Shearer, 1994; Güler y Yildiz 2011).

Con respecto al porcentaje de lípidos en hígado, este fue menor en los organismos iniciales y en los alimentados con una dieta comercial. Se observa un aumento en los tres tratamientos con la dieta a base de proteínas vegetales. Azari *et al.* (2011) por otro lado informaron que la cantidad de lípidos en el cuerpo de trucha Arcoíris fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) con la inclusión de altos niveles (15, 20, 25 y 30 g/kg) del prebiótico Growbionic. En tanto que algunos trabajos han reportado que no hay

diferencias en la deposición de lípidos en el cuerpo con la adición de MOS (Genc *et al.*, 2007, Yilmaz *et al.*, 2007). Además, se ha encontrado que el contenido de lípidos en el cuerpo de los peces alimentados con dietas vegetales puede no verse afectado, debido a que la cantidad de proteínas y lípidos en las dietas es similar con respecto al control (Rørå *et al.*, 2005; Ghosi Mobaraki *et al.*, 2020). Por lo que en el presente estudio la falta de cambios en la composición corporal puede deberse a la similitud en la composición proximal de las diferentes dietas.

Los parámetros hematológicos son importantes bioindicadores para monitorear el estado inmunológico y fisiológico de los peces (Yarahmadi *et al.*, 2016). Las proteínas totales séricas influyen en la función inmunológica innata y a menudo se conocen como indicadores de la salud (Magnadóttir, 2006). Los resultados del presente estudio mostraron que los organismos iniciales tuvieron el mayor valor en contenido de proteína en suero sanguíneo y hubo un incremento en el contenido en las dietas con prebióticos y la basal con respecto a la comercial; por lo que no hubo un efecto positivo en la inclusión de FOS o MOS en el contenido de proteína sérica. Denji *et al.* (2015) también investigaron los efectos de la suplementación con MOS en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y no obtuvieron diferencias significativas en los valores de proteína sérica entre los tratamientos (1, 2.5 y 4.0 g/kg) y el grupo control. No obstante, Soleimani *et al.* (2012) encontraron que la adición de FOS a 2% y 3% en alevines de rutilo (*Rutilus caspicus*) puede incrementar la respuesta inmune innata en comparación con el grupo suplementado con 1% de FOS y el control. Asimismo, el sistema inmunológico innato en trucha arcoíris se ha visto positivamente afectado en dietas con una suplementación de 0.2% de MOS (Staykov *et al.*, 2007) y se ha visto que la proteína sérica en peces tratados con diferentes inmunoestimulantes es más alta que las del grupo control (Mehrabi *et al.*, 2011). Esta variedad en las respuestas de los organismos puede deberse a que los parámetros hematológicos no solo se ven afectados por los inmunoestimulantes, como los prebióticos, sino que también por factores como el estrés, infecciones, nutrición, y las condiciones ambientales (Yarahmadi *et al.*, 2016).

En cuanto a la determinación de triglicéridos en suero sanguíneo, no hubo diferencias entre los tratamientos con FOS o MOS y la dieta basal. Estos resultados concuerdan con lo dicho por Denji *et al.* (2015) que investigaron los efectos de los MOS (activeMOS®) en los parámetros hematológicos y bioquímicos séricos en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); suplementaron las dietas con 1, 2.5 y 4.0 g/kg

de MOS y encontraron que no hubo diferencias significativas en los parámetros bioquímicos séricos, entre ellos los triglicéridos. Rehulka *et al.* (2014) también examinaron el efecto de los FOS en los parámetros bioquímicos de plasma sanguíneo en truchas arcoíris con una suplementación de 1 g/kg, y obtuvieron que no hubo diferencias en los parámetros hematológicos. Por otro lado, en el presente estudio también se observó que el nivel de triglicéridos fue significativamente mayor en los organismos alimentados con la dieta comercial con relación a las demás dietas; esto se relaciona con algunos estudios donde la cantidad de triglicéridos en suero sanguíneo se vio reducida con respecto al control, cuando se suplementaron las dietas con prebióticos (Ye *et al.*, 2011; Gelibolu *et al.*, 2018); esta tendencia a disminuir se puede explicar porque se ha visto que los prebióticos pueden reducir la lipogénesis hepática, lo que disminuye los niveles de colesterol y triglicéridos en suero sanguíneo (Guerreiro *et al.*, 2017).

Por otra parte, hay estudios que indican que los prebióticos pueden mejorar la tolerancia a la glucosa al reducir los niveles en el plasma sanguíneo y aumentar la sensibilidad a la insulina (Roberfroid *et al.*, 2010). En este trabajo la determinación de glucosa en suero no mostró diferencias entre los distintos tratamientos ni con los organismos iniciales, por lo que no hubo un efecto negativo o positivo de la adición de FOS o MOS en la cantidad de glucosa en suero. Akrami *et al.* (2015) evaluaron el prebiótico comercial A-Max (MOS, FOS y  $\beta$ -glucano), en los parámetros bioquímicos séricos de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y también concluyeron que la suplementación de 0.5, 1.0 y 1.5 g/kg no afecta en las concentraciones de glucosa sérica. Denji *et al.* (2015) también estudiaron los efectos de los MOS a concentraciones de 1, 2.5 y 4.0 g/kg en trucha arcoíris y observaron que no hubo diferencias significativas en la cantidad de glucosa en sangre. Además, Rehulka *et al.* (2014) observaron que suplementaciones de FOS para trucha arcoíris no tiene efectos en la química sanguínea. Resultados similares se han visto en otras especies, como en el esturión beluga (*Huso huso*) (Guerreiro *et al.*, 2015). Por lo anterior se puede decir que la inclusión de FOS o MOS no tiene efectos en la cantidad de glucosa en suero sanguíneo de trucha arcoíris, aunque no es un resultado contundente, pues se han observados variaciones y contradicciones en los efectos de los prebióticos bajo distintos factores, entre los que están las infecciones (Yarahmadi *et al.*, 2016) o la adición de simbioses (Cerezuela *et al.*, 2011).

Finalmente, se ha dicho que podría haber una mejora en la morfología intestinal de los peces alimentados con prebióticos, lo que beneficiaría la utilización del alimento y un epitelio mucoso sano e intacto puede ayudar a prevenir infecciones bacterianas oportunistas (Dimitroglou *et al.*, 2009). Esto se debe a que el aumento en la longitud de las microvellosidades puede brindar una mayor área de absorción (Wu *et al.*, 2013) y junto con la elevación de la producción de moco, los prebióticos aumentan las actividades bactericidas y de lisozimas (Torrecillas *et al.*, 2011). En el presente estudio las observaciones indican que no hubo diferencias en la histología del intestino distal o proximal en los diferentes tratamientos ni se observan síntomas de alguna patología, de igual forma no se observan síntomas de inflamación intestinal con la adición de FOS o MOS en las dietas ni tampoco con la sustitución de harina de pescado por concentrados de proteína vegetal. Escaffre *et al.* (2007) también investigaron los efectos de la sustitución completa de la harina de pescado por concentrado de proteína de soja en dietas para trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y observaron que en las zonas proximal y distal del intestino no se vieron afectados por la dieta la altura del pliegue, la longitud del epitelio y la proporción de estroma, además no hubo efecto en el número de células infiltradas entre los enterocitos ni en las características de sus núcleos, por lo que no hubo una reacción inflamatoria ni afección en la superficie del epitelio. Por otro lado, Dimitroglou *et al.* (2009) realizaron un estudio sobre el efecto de MOS en la morfología intestinal de juveniles y subadultos de trucha arcoíris. El control fue una dieta comercial estándar y el tratamiento fue una suplementación de MOS de 0.2%. La microscopía demostró que la suplementación con MOS mejoró la morfología intestinal en las regiones intestinales anterior y posterior de los subadultos, ya que aumentó la superficie de absorción al promover pliegues mucosos más largos. Sin embargo, no detectaron mejoras significativas en el grupo de juveniles y no encontraron una razón para esto. Zhou *et al.* (2010) también realizaron una prueba de alimentación con juveniles de corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) para evaluar cuatro prebióticos diferentes: FOS (inulina), GOS, MOS, y derivados de levadura. Determinaron que la altura del pliegue y de los enterocitos en el ciego pilórico y el intestino no se vieron afectados por la dieta, sin embargo, la altura de las microvellosidades aumentó significativamente con la suplementación con prebióticos. Contrario a esto, Torrecillas *et al.* (2007) demostraron que la administración dietética de MOS (0.2 o 0.4%) a la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) no afectó la longitud de las vellosidades. Genc *et al.* (2007) también observaron que en la Tilapia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) no hubo diferencias en morfología gastrointestinal con dietas suplementadas con MOS al 3%. De acuerdo con las observaciones anteriores y a los resultados de este estudio la suplementación dietética con prebióticos no siempre tiene un efecto beneficioso sobre

la morfología intestinal de los peces. Esta variedad en la respuesta entre distintos estudios puede atribuirse a las diferentes dosis empleadas, las especies implicadas en los ensayos, las distintas condiciones de cría o los enfoques metodológicos utilizados (Ferrara *et al.*, 2015). Aunque aún se desconoce con precisión los mecanismos de actuar de los prebióticos se sabe que las comunidades microbianas intestinales juegan un papel clave (Hoseinifar *et al.*, 2015), que entre otros efectos pueden promover el crecimiento de las microvellosidades en el borde epitelial del intestino (Dimitroglou *et al.*, 2009).

Es la primera vez que se reportan los efectos de incluir los prebióticos FOS y MOS al 3% en dietas para trucha arcoíris con una sustitución total de harina de pescado y los resultados muestran mucha similitud con estudios previos que han trabajado con dietas vegetales o estos prebióticos. No se muestran efectos negativos o adversos de la suplementación en conjunto de estos ingredientes, pero se sugiere que en futuros estudios se disminuya la cantidad de prebióticos suplementados debido a que se han observado efectos positivos a menores concentraciones.

## CONCLUSIONES

En este estudio se determinó que los concentrados de proteína vegetal y la adición del 3% de fructooligosacáridos o manano-oligosacáridos en dietas para juveniles de trucha arcoíris no tienen efectos adversos en su crecimiento.

Los resultados sobre los parámetros de crecimiento en este estudio revelaron que las dietas con concentrados de proteína vegetal junto con la adición de 3% de FOS o MOS no tuvieron efectos desfavorables sobre los parámetros de crecimiento en juveniles de trucha arcoíris.

Las dietas con concentrados de proteína vegetal y la inclusión de prebióticos no influyeron negativamente en la deposición de proteína en músculo de los peces. La dieta a base de proteína vegetal tuvo un efecto negativo en la deposición de proteína en hígado en todos los grupos experimentales. No hubo disminución en la deposición de lípidos en músculo e hígado de los organismos alimentados con dietas suplementadas con 3% de FOS o MOS.

En el estudio actual se determinó que las dietas con concentrados de proteína vegetal y la adición de fructooligosacáridos o manano-oligosacáridos no causaron cambios en los parámetros sanguíneos de trucha arcoíris, excepto en la cantidad de triglicéridos, que fue significativamente menor en los grupos experimentales con respecto al control.

El buen estado de salud de todos los grupos durante el proyecto correspondió con las observaciones en la morfología del intestino. Se determinó que las dietas con concentrados de proteína vegetal y la adición de 3% de FOS o MOS no tuvieron un impacto negativo en el epitelio de los organismos ni generaron signos de inflamación.

## REFERENCIAS

Akrami, R., Mansour, M. R., Chitsaz, H., Alamdar, O. G., & Denji, K. A. 2015. Prebiotic (A-Max) and Growth of Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Applied Aquaculture 27(1): 61–71.

Amenyogbe, E., Chen, G., Wang, Z., Huang, J., Huang, B., & Li, H. 2020. The exploitation of probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: present study, limitations and future directions: a review. Aquaculture International. Aquacult Int. 28: 1017–1041.

Askarian, F., Kousha, A., Salma, W. & Ringo, E. 2011. The effect of lactic acid bacteria administration on growth, digestive enzyme activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) fry. Aquacult. Nutr. 17: 488–497.

Azari, A., Hashim, R., Habibi, M., Sharifzadeh, M., Najafpour, S., Roohi, A. & Darvishi, M. 2011. The effects of commercial probiotic and prebiotic usage on growth performance, body composition and digestive enzyme activities in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). World Applied Science Journal. 14: 26–35.

Balcázar, J., Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D. & Múzquiz, J. 2006. The role of probiotics in aquaculture. Vet Microbiol. 114 (3-4): 173-186.

Bhagat, R. & Barat, S. 2015. Water quality parameters for the culture of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in the raceways of Kathmandu, Nepal. Our Nature. 13(1): 50-57.

Bligh, E. & Dyer, W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and physiolog. 37(8): 911–917.

Bou, M., Berge, G.M., Baeverfjord, G., Sigholt, T., Østbye, T.K., Romarheim, O.H., Hatlen, B., Leeuwis, R., Venegas, C. & Ruyter, B. 2017. Requirements of n-3 very long-chain PUFA in Atlantic salmon (*Salmo salar* L): effects of different dietary levels of EPA and DHA on fish performance and tissue composition and integrity. *Br. J. Nutr.* 117: 30–47.

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

Carbone, D. & Faggio, C. 2016. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology.* 54: 172–178.

Cerezuela, R., Meseguer, J. & Esteban, MA. 2011. Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture. A review. *J Aquacult Res Dev.* 1: 8.

Chang, C., Zimmermann, A. & Heckelei, T. 2016. The Expansion of Aquaculture and its Effects on Global Land use and Sustainability, 56th Annual Conference, Bonn, Germany, September 28-30, 244765, German Association of Agricultural Economists (GEWISOLA).

Collins, S., Desai, A., Mansfield, G., Hill, J., Van, A. & Drew, M. 2012. The effect of increasing inclusion rates of soybean, pea and canola meals and their protein concentrates on the growth of rainbow trout: Concepts in diet formulation and experimental design for ingredient evaluation. *Aquaculture.* 349: 90–99.

CONAPESCA. 2017. Anuario Estadístico de Pesca 2017. Mazatlán, México.

Cruz, C., Hernandez, H., Fernández, A., Ramírez, P. and Angeles, O. 2011. Effects of diets with soybean meal on the growth, digestibility, P and N excretion of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Hidrobiológica*. 21: 118–126.

Daniel, N. 2018. A review on replacing fish meal in aqua feeds using plant protein sources. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 6: 164-179.

De Silva, S. y Hasan, M. 2007. Feeds and fertilizers: the key to long-term sustainability of Asian aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper*. 497: 19-47.

Denji, A., Mansour, R., Akrami, R., Ghobadi, Sh., Jafarpour, S. and Mirbeygi S. 2015. Effect of Dietary Prebiotic Mannan Oligosaccharide (MOS) on Growth Performance, Intestinal Microflora, Body Composition, Haematological and Blood Serum Biochemical Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Juveniles. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 10: 255-265.

Dimitroglou, A., Merrifield, D., Moate, R., Davies, S., Spring, P., Sweetman, J., & Bradley, G. 2009. Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Animal Science*. 87(10): 3226–3234.

Escaffre, A.-M., Kaushik, S., & Mambrini, M. 2007. Morphometric evaluation of changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) due to fish meal replacement with soy protein concentrate. *Aquaculture*. 273(1): 127–138.

FAO. 2019. Programa de información de especies acuáticas, *Oncorhynchus mykiss*. Departamento de pesca y acuicultura. Consultado el 08 de noviembre de 2019, recuperado de [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus\\_mykiss/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/es)

Farzad, R., Kuhn, D., Smith, S., O'Keefe, S., Hines, I., Bushman, T. & Stevens, A. 2020. Effects of selenium-enriched prebiotic on the growth performance, innate immune

response, oxidative enzyme activity and microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 531: 735-980.

Ferrara, E., Gustinelli, A., Fioravanti, M. L., Restucci, B., Quaglio, F., Marono, S., & Piccolo, G. 2015. Histological and micro-/macro-morphological evaluation of intestine in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) fed soybean meal-based diets added with MOS and inulin as prebiotics. *Aquaculture International*. 23(6): 1525–1537.

Francis, G., Makkar, H.P.S. & Becker, K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*. 199: 197-227.

Fuentes, E., Safian, D., Valdés, J., & Molina, A. 2013. Isolation and selection of suitable reference genes for real-time PCR analyses in the skeletal muscle of the fine flounder in response to nutritional status: assessment and normalization of gene expression of growth-related genes. *Fish Physiol. Biochem.* 39: 765-777.

GAA. 2019. What Is Aquaculture and Why Do We Need It?: Global Aquaculture Alliance. Consultado el 08 de noviembre de 2019, recuperado de <https://www.aquaculturealliance.org/blog/what-is-aquaculture-why-do-we-need-it/>

Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu G., Kroghdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R. & Wurtele, E. 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquacult. Res.* 38: 551-579.

Gelibolu, S., Yanar, Y., Genc, M.A., & Genc, E. 2018. The Effect of Mannan-Oligosaccharide (MOS) as a Feed Supplement on Growth and Some Blood Parameters of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 18: 817-823.

Genc, M. A., Yilmaz, E., Genc, E., & Aktas, M. 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharides (MOS) on growth, body composition, and intestine and liver histology of the hybrid Tilapia. *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) Israel Journal of Aquaculture. 59: 10-16.

Ghosi Mobaraki, M.R., Abedian Kenari, A., Bahrami Gorji, S. & Esmaeili, M. 2020. Effect of dietary fish and vegetable oil on the growth performance, body composition, fatty acids profile, reproductive performance and larval resistance in pearl gourami (*Trichogaster leerii*). *Aquacult Nutr.* 26: 894–907.

Gjedrem, T., Robinson, N., & Rye, M. 2012. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. *Aquaculture.* 350-353: 117–129.

Glencross, B. D., Carter, C. G., Duijster, N., Evans, D. R., Dods, K., McCafferty, P. & Sipsas, S. 2004. A comparison of the digestibility of a range of lupin and soybean protein products when fed to either Atlantic salmon (*Salmo salar*) or rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 237(1-4): 333–346.

González, J., Arreguín, M. y Ramírez, O. 2016. Evaluación financiera de la producción de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*): Análisis del agronegocio SPR de RL “Pucato”. Producción, Comercialización y Medio Ambiente. Handbook T-I. - ©ECORFAN, Texcoco de Mora-México.

Grisdale-Helland, B., Helland, S. J., & Gatlin, D. M. 2008. The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture.* 283(1-4): 163–167.

Guerreiro, I., Oliva-Teles, A., & Enes, P. 2015. Improved glucose and lipid metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed short-chain fructooligosaccharides and xylooligosaccharides. *Aquaculture.* 441: 57–63.

Guerreiro, I., Oliva-Teles, A. & Enes, P. 2017. Prebiotics as functional ingredients: focus on Mediterranean fish aquaculture. *Rev Aquacult.* 10: 800-832.

Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., & Metailler, R. 2004. *Nutrición y alimentación de peces y crustaceos.* Mundi-Prensa.

Güler, M. & Yildiz, M. 2011. Effects of dietary fish oil replacement by cottonseed oil on growth performance and fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk J Vet Anim Sci.* 35(3): 157–167.

Hardy, R.W. 1996. Alternate protein sources for salmon and trout diets. *Anim. Feed Sci. Tech.* 59: 79-80.

Hardy, R.W. 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquacult. Res.* 41: 770-776.

Hasan M. & Halwart M. 2009. *Fish as Feed Inputs for Aquaculture: Practices, Sustainability and Implications.* Rome: FAO; FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 518.

Hoseinifar, S. H., Esteban, M. Á., Cuesta, A., & Sun, Y.-Z. 2015. Prebiotics and Fish Immune Response: A Review of Current Knowledge and Future Perspectives. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture.* 23(4): 315–328.

Kaushik, S. J., Cravedi, J. P., Lalles, J. P., Sumpter, J., Fauconneau, B., & Laroche, M. 1995. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture.* 133(3-4): 257–274.

Krogdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S. & Bakke, A.M. 2010. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent finding regarding responses in salmonids. *Aquacult. Res.* 41: 333-344.

Lee, S.-M., Mohammadi Azarm, H., & Chang, K. H. 2016. Effects of dietary inclusion of fermented soybean meal on growth, body composition, antioxidant enzyme activity and disease resistance of rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Aquaculture*. 459: 110–116.

Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*. 20: 137–151.

Mehrabi, Z., Firouzbakhsh, F., Jafarpour, A. 2011. Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 96: 474–481.

Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R., Bøggwald, L., Castex, M. & Ringø, E. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*. 302 (1–2): 1-18.

Mirzapour-Rezaee, S. S., Farhangi, M., & Rafiee, G. 2016. Combined effects of dietary mannan- and fructo-oligosaccharide on growth indices, body composition, intestinal bacterial flora and digestive enzymes activity of regal peacock (*Aulonocara stuartgranti*) . *Aquaculture Nutrition*. 23(3): 629–636.

Mosberian-Tanha, P., Landsverk, T., Press, C. M., Mydland, L. T., Schrama, J. W., & Øverland, M. 2017. Granulomatous enteritis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) associated with soya bean meal regardless of water dissolved oxygen level. *Journal of Fish Diseases*. 41(2): 269–280.

Nakano, T., Afonso, L., Beckman, B., Iwama, G., Devlin, R. 2013. Acute Physiological Stress Down-Regulates mRNA Expressions of Growth-Related Genes in *Coho Salmon*. *PLoS ONE*. 8(8): 1-7.

Olvera, M., martinez, C. y Real de León, E. 1993. Manual de Técnicas para Laboratorio de Nutrición de Peces y Crustáceos. México: FAO.

Ortiz, L., Rebolé, A., Velasco, S., Rodríguez, M., Treviño, J., Tejedor, J. & Alzueta, C. 2012. Effects of inulin and fructooligosaccharides on growth performance, body chemical composition and intestinal microbiota of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult Nutr.* 19: 475-482.

Rawles, S., Thompson, K., Brady, Y., Metts, L., Aksoy, M., Gannam, A., Twibell, R., Ostrand, S. & Webster, C. 2011. Effects of replacing fish meal with poultry by-product meal and soybean meal and reduced protein level on the performance and immune status of pond-grown sunshine bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). *Aquaculture Nutrition.* 17: 708-721.

Refstie S., Storebakken, T., Baeverfjord, G. and Roem, A. J. 2001. Long-term protein and lipid growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with partial replacement of fish meal by soy protein products at medium or high lipid level. *Aquaculture.* 193: 91-106.

Refstie, S., Bakke-McKellep, A.M., Penn, M.H., Sundby, A., Shearer, K.D. & Krogdahl, A. 2006. Capacity for digestive hydrolysis and amino acid absorption in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with soybean meal or inulin with or without addition of antibiotics. *Aquaculture.* 261: 392–406.

Řehulka, J., Minařík, B., Cink, D., & Žalák, J. 2014. Prebiotic effect of fructo-oligosaccharides on growth and physiological state of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis.* 59(5): 227-236.

Ringø, E., Olsen, R., GIFSTAD, T., Dalmo, R., Amlund, H., Hemre, Gro-Ingunn & Bakke, A. 2010. Prebiotics in aquaculture: A review. *Aquaculture Nutrition.* 16: 117-136.

Ringø, E., Dimitroglou, A., Hoseinifar, S.H. & Davies, S.J. 2014. Prebiotics in finfish: an update. In: Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics (Ringø, E. & Merrifield, D. eds.), pp. 360–400. Wiley-Blackwell, Oxford.

Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R. & Rowland, I. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*. 104: 1–63.

Rørå, A. M. B., Ruyter, B., Skorve, J., Berge, R. K., & Slinning, K.-E. 2005. Influence of high content of dietary soybean oil on quality of large fresh, smoked and frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture International*. 13(3): 217–231.

Sánchez, D., Arvizu, E., Hernández, L., Fernández, M. & Angeles, O. 2015. Addition of Yeast and/or Phytase to Diets with Soybean Meal as Main Protein Source: Effects on Growth, P Excretion and Lysozyme Activity in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). *Turk J Fish Aquat Sci*. 15: 215-222.

Shearer, K. D. 1994. Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture*. 119(1): 63–88.

Soleimani, N., Hoseinifar, S. H., Merrifield, D. L., Barati, M., & Abadi, Z. H. 2012. Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish & Shellfish Immunology*. 32(2): 316–321.

Staykov, Y., Spring, P., Denev, S. & Sweetman, J. 2007. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*. 15: 153-161.

Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Robaina, L., Real, F., Sweetman, J., Tort, L. & Izquierdo, M.S. 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shellfish Immunol*. 23: 969–981.

Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M. J., Montero, D., Ginés, R., Sweetman, J., & Izquierdo, M. 2011. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Aquaculture Nutrition*. 17(2): 223–233.

Troell, M., Kautsky, N., Beveridge, M., Henriksson, P., Primavera, J., Rönnbäck, P., & Folke, C. 2013. *Aquaculture*. Encyclopedia of Biodiversity. 189–201.

Verdín, S., Moreno, L., Rojo, N., García, A., Omaña, M., Meneses, A., & Nieto, O. 2013. *Histología e inmunohistoquímica: Manual de métodos*. México DF, México Universidad Nacional Autónoma de México.

Welker, T. L., Overturf, K., Abernathy, J., Barrows, F. T. & Gaylord, G. 2017. Optimization of Dietary Manganese for Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Fed a Plant-based Diet. *J World Aquacult Soc*. 49: 71-82.

Wu, Y., Liu, W.-B., Li, H.-Y., Xu, W.-N., He, J.-X., Li, X.-F. & Jiang, G.-Z. 2013. Effects of dietary supplementation of fructooligosaccharide on growth performance, body composition, intestinal enzymes activities and histology of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerlings. *Aquacult Nutr*. 19: 886-894.

Yamamoto, T., Matsunari, H., Sugita, T., Furuita, H., Masumoto, T., Iwashita, Y., & Suzuki, N. 2012. Optimization of the supplemental essential amino acids to a fish meal-free diet based on fermented soybean meal for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science*. 78: 359–366.

Yarahmadi, P., Ghafari Farsani, H., Khazaei, A., Khodadadi, M., Rashidiyan, G., & Jalali, M. A. 2016. Protective effects of the prebiotic on the immunological indicators of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. 54: 589–597.

Ye, J.D., K. Wang, F.D. Li & Y.Z. Sun. 2011. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *paralichthys olivaceus*. *Aquacult. Nutr.* 17: 902-911.

Yilmaz, E., Genc, M. A. & Genc, E. 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgeh.* 59: 182–188.

Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. NJ, USA: Prentice Hall. pp 663.

Zhang, Y., Øverland, M., Shearer, K. D., Sørensen, M., Mydland, L. T., & Storebakken, T. 2012. Optimizing plant protein combinations in fish meal-free diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a mixture model. *Aquaculture.* 360-361: 25–36.

Zhou, Q.-C., Buentello, J. A., & Gatlin, D. M. 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture.* 309(1-4): 253–257.

Zhou, Z., Ringø, E., Olsen, R.E. and Song, S.K. 2017. Dietary effects of soybean products on gut microbiota and immunity of aquatic animals: A review. *Aquacult Nutr.* 24: 644–665.

## ANEXOS

### Anexo 1. Información de la especie.

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Salmoniformes

Familia: Salmonidae

Subfamilia: Salmoninae

Género: *Oncorhynchus*

Especie: *O. mykiss* Walbaum, 1792

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es un pez resistente y fácil de desovar, con cuerpo fusiforme, presentando una aleta adiposa, coloración azul a verde oliva sobre una banda rosada a lo largo de la línea lateral y plateada por debajo de ella. El lomo, costados, cabeza y aletas están cubiertas con pequeños puntos negros. La trucha arcoíris es considerada de crecimiento rápido teniendo una amplia gama de tolerancia de ambientes y manipulaciones; que abarcan desde un ciclo de vida anádromo hasta habitar de manera permanente en lagos. Los juveniles son iniciados fácilmente en la alimentación con una dieta artificial y alcanzan hasta 4.5 kg en un lapso de 3 años (FAO, 2019).

La especie puede soportar amplias gamas de temperatura (0 - 27 °C), aunque su temperatura óptima se encuentra entre los 10 - 18°C (Bhagat y Barat 2015). Por tanto se cultiva en altitudes mayores a 1300 msnm y con oxígeno en el agua cercano a la saturación y libre de contaminantes (FAO, 2019). Es nativa de las cuencas que drenan al Pacífico en Norte América, abarcando desde Alaska a México. Desde 1874 ha sido introducida en las aguas de todos los continentes excepto la Antártica.

## Anexo 2. Determinación del contenido de cenizas (Olvera *et al.*, 1993).

Materiales y equipo.

- Crisoles de porcelana.
- Mufla.
- Desecador.
- Procedimiento

Procedimiento.

1. Los crisoles de porcelana deben estar previamente limpiados y llevados a peso constante sin tapa.
2. Pesar la muestra seca y colocarla en los crisoles. Etiquetar.
3. Colocar los crisoles en una mufla a 100°C e ir subiendo la temperatura hasta calcinar a 550°C por 6 horas, dejar enfriar y pasarlos a un desecador.
4. Pesar nuevamente los crisoles y realizar los siguientes cálculos:

$$\text{Contenido de ceniza (\%)} = \frac{A-B}{C} \times 100$$

A = Peso del crisol (g)

B = Peso del crisol con ceniza (g)

C = Peso de la muestra (g)

### Anexo 3. Determinación del contenido de humedad (Olvera *et al.*, 1993).

Materiales y equipo.

- Crisoles.
- Horno de secado.
- Desecador.

Procedimiento.

1. Lavar los crisoles con jabón libre de fosfatos y alcohol.
2. Colocar los crisoles, en el horno de secado durante 2 horas, pasarlos al desecador para eliminar la humedad, pesar y registrar.
3. Poner nuevamente los crisoles en el horno de secado a 100°C durante 24 horas y pesar. Repetir este paso hasta que haya una diferencia menor a 0.001g en el peso de los crisoles.
4. Sacar los crisoles del horno y colocarlos en un desecador durante 1 hora.
5. Pesar la muestra y colocarla en los crisoles. Ponerles tapa.
6. Introducir la muestra en el horno a 80°C durante 12 horas.
7. Sacar la muestra del horno y colocarla en el desecador.
8. Pesar la muestra y realizar el siguiente cálculo:

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \frac{MH-MS}{MH} \times 100$$

Donde:

MH = Peso de la muestra inicial húmeda (g)

MS = Peso final de los crisoles con la muestra – peso de los crisoles (g)

## **Anexo 4. Cuantificación del contenido de lípidos por la técnica de Bligh y Dyer (1959).**

### Material y equipo.

- Homogeneizador
- Sonicador
- Vasos de precipitados
- Tubos de ensaye
- Embudo de separación
- Frascos Viales
- Bomba de vacío

### Reactivos.

- Cloroformo.
- Metanol.

### Procedimiento.

1. Se lavan los frascos viales y los tubos de ensaye con jabón libre de fosfatos en un sonicador durante 10 minutos. Se ponen a secar a 70°C durante 2 horas.
2. Se pesan las muestras en la balanza analítica y se colocan en los tubos de ensaye con tapa.
3. Se agregan 1.5 ml de cloroformo y 3 ml de metanol.
4. Cada tubo se homogeniza durante 2 minutos. \*A temperatura baja para evitar la evaporación de los solventes.
5. Colocar 1.5 ml de cloroformo en cada tubo para obtener una proporción 1:1 metanol-cloroformo y homogenizar por otros 2 minutos.
6. El contenido de cada tubo debe ser filtrado en una bomba de vacío con un filtro de membrana.
7. Luego se vierte la mezcla en un embudo de separación y se colocan 0.8 mL de agua destilada. Se agita hasta que se observe la separación (la parte de arriba queda transparente y la de abajo amarillenta).
8. Al separarse se vacía la parte de abajo en un frasco vial. Cada vez que se usa el embudo debe ser enjuagado con agua destilada. Los frascos viales deben ser previamente pesados.

9. Colocar los frascos viales en aireación constante durante 12 horas o hasta que el diluyente se evapore por completo.
10. Pesar los frascos viales y realizar el cálculo:

$$\% \text{ de lípidos} = \frac{Y_i - V_i}{M_i L} \times 100$$

Donde:

$Y_i$  = Peso final de las muestras.

$V_i$  = Peso inicial de los viales.

$M_i L$  = Peso inicial de las muestras.

## **Anexo 5. Obtención del contenido de proteínas totales por la técnica de Kjeldahl.**

Previamente se preparan las siguientes soluciones:

- Solución neutralizadora de ácidos: 2L NaOH 15% para el scrubber.
- Solución alkali: NaOH 40% que va en el bidón conectado al destilador.
- Solución indicadora: (0.22g Rojo de Metilo/ 100 mL de etanol) + (0.11g de verde de bromocresol/50 mL de Etanol).
- Solución de ácido bórico: (40g de  $H_3BO_3$ /700 mL agua) + 200mL etanol + 17 mL de solución indicadora. Aforar a 1L.
- Solución de Ácido Sulfúrico 0.1N para la titulación.
- Ácido sulfúrico concentrado (96%) 15mL/muestra.

Etapa de digestión:

1. Pesar de entre 1 a 2g de muestra seca y colocarla en los tubos de digestión, dejando uno de los tubos sin muestra (blanco).
2. Añadir 2 kjeltabs a cada tubo.
3. Antes de colocar los tubos en el digestor se debe de cambiar el agua destilada y la solución neutralizadora del scrubber.
4. A cada tubo se le agrega 10 mL de  $H_2O_2$  y 10 mL de  $H_2SO_4$ .
5. Colocar los tubos en el digestor, ponerles las tapas y prender el scrubber. Encender el digestor y configurarlo a 420°C.
6. Una vez alcanzada esta temperatura se dejan ahí los tubos durante 1 hora. NOTA: tener puesta la mascarilla anti-gas y prendida la campana de extracción en toda esta etapa.
7. Terminado el proceso se apaga el digestor y se dejan enfriar los tubos durante 1 hora.

Etapa de destilación:

1. En el Kjeltec colocar un tubo limpio con 150 mL de agua destilada y un matraz erlenmeyer de 250 mL para la purga inicial. Nota: Debe realizarse una purga por cada destilación.
2. Colocar en cada matraz erlenmeyer 25 mL de solución indicadora de ácido bórico.

3. En cada uno de los tubos de digestión se agregan 70 mL de agua destilada y se colocan en el Kjeltec, cada uno con un matraz que ya contiene solución indicadora.
4. En cada destilación, desechar el contenido del tubo digestor y conservar el matraz para titular.

Etapa de titulación:

Colocar en el matraz un agitador magnético y titular con ácido sulfúrico hasta que vire de color rosa a verde. Registrar los mL de titulación. Realizar el cálculo:

$$\%N = \frac{(MT - MB) * 140.07}{\text{mg de la muestra}}$$

Donde:

MT = Mililitros de titulante usado

MB = Mililitros del blanco

$$\% \text{ de proteína} = \%N * 6.25$$

## Anexo 6. Determinación del contenido de proteínas séricas.

Material y equipo:

- Kit de ensayo de proteína: Thermo Scientific™ Micro BCA™ Protein Assay Kit.
- Lector de placas
- Micropipetas
- Microplacas
- Agitador de microplacas

Procedimiento.

1. Primero se prepara el reactivo de trabajo. Volumen total del reactivo de trabajo (WR) = (# estándar + #desconocidos)(#replicas)(WR por cada muestra). NOTA: solo se requieren 150  $\mu$ L de WR para cada muestra.
2. Con el BSA que viene dentro del kit se prepara la curva patrón según la tabla 4.

**Tabla 4.** Curva patrón para la determinación del contenido de proteínas séricas.

Vial	Volumen de diluyente (mL)	Volumen y origen de BSA	Concentración final de BSA $\mu$ g/mL
A	4.5	0.5 mL	200
B	8.0	2.0 mL del vial A	40
C	4.0	4.0 mL del vial B	20
D	4.0	4.0 mL del vial C	10
E	4.0	4.0 mL del vial D	5
F	4.0	4.0 mL del vial E	2.5
G	4.8	3.2 mL del vial F	1
H	4.0	4.0 mL del vial G	0.5
I	8.0	0	0

3. Se pipetea 150  $\mu$ L de cada réplica estándar o de muestra desconocida en cada pocillo de microplaca.
4. Agregar 150  $\mu$ L de WR a cada pocillo y se mezcla en un agitador de placas durante 30 segundos.

5. Cubrir la placa para evitar afectar los resultados por la entrada de luz y poner a incubar a 37°C durante 2 horas.
6. Se deja enfriar la placa a temperatura ambiente.
7. Después se mide la absorbancia en o cerca de 562 nm en un lector de placas.
8. Se resta la lectura de absorbancia del blanco de la lectura de todas las demás muestras desconocidas.
9. Se hace una regresión lineal de la curva patrón para obtener las concentraciones de todas las muestras problema.

## Anexo 7. obtención del contenido de triglicéridos en suero sanguíneo.

Materiales y equipo.

- Kit de ensayo de triglicéridos (EnzyChrom™, Triglyceride Assay Kit).
- Lector de placas
- Micropipetas
- Microplacas
- Agitador de microplacas

Procedimiento.

1. Diluir el estándar en agua destilada de la siguiente manera (para curva patrón).

**Tabla 5.** Curva patrón para la obtención del contenido de triglicéridos en suero sanguíneo.

No.	Estándar ( $\mu\text{L}$ ) + agua ( $\mu\text{L}$ )	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Triglicéridos (mmol/L)
1	10 + 990	1000	1.0
2	6 + 994	1000	0.6
3	3 + 997	1000	0.3
4	0 + 1000	1000	0

2. Luego se transfiere 10  $\mu\text{L}$  de estándares diluidos a los pocillos de la placa para hacer la curva patrón.
3. Las muestras de suero se deben diluir 5 veces en  $\text{dH}_2\text{O}$  para analizarse directamente (10  $\mu\text{L}$  de muestra + 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$ ).
4. Prepare el reactivo de trabajo para cada pocillo, mezclando 100  $\mu\text{L}$  de buffer de ensayo, 2  $\mu\text{L}$  de mezcla enzimática, 5  $\mu\text{L}$  de lipasa, 1  $\mu\text{L}$  de ATP y 1  $\mu\text{L}$  de reactivo colorante en un tubo limpio. Transfiera 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de trabajo a los pocillos de muestras y estándares.
5. Mezclar los elementos en el agitador para microplacas durante un corto periodo de tiempo y tapar la microplaca.

6. Posteriormente dejar incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Leer la densidad óptica a 570 nm (550-585 nm) y calcular la concentración de triglicéridos según la formula siguiente:

$$[\text{Triglicéridos}] = \frac{\text{ODs} - \text{ODH}}{\text{Pendiente}} \times n \text{ (mmol/L)}$$

Donde: ODs = absorbancia de la muestra. ODH = Absorbancia del blanco. n = Factor de dilución.

## Anexo 8. Determinación del contenido de glucosa sérica.

Materiales y equipo.

- Kit de ensayo de glucosa: abcam®, Glucose Assay Kit.
- Lector de placas
- Micropipetas
- Microplacas
- Agitador de microplacas

Procedimiento.

1. Para la curva patrón se prepara 1 mL de estándar de glucosa 1 nmol/ $\mu$ L diluyendo 10  $\mu$ L de glucosa en 990  $\mu$ L de buffer de ensayo. Se pone en los pocillos de microplaca como se marca en la tabla 6.

**Tabla 6.** Preparación de la curva patrón para el contenido de glucosa sérica.

Estándar (#pocillo)	Volumen de glucosa estándar ( $\mu$ L)	Buffer de ensayo ( $\mu$ L)	Volumen final en el pocillo	glucosa final (nmol/pocillo)
1	0	150	50	0
2	6	144	50	2
3	12	138	50	4
4	15	132	50	6
5	24	126	50	8
6	30	120	50	10

2. Se toman 2  $\mu$ L de cada muestra problema y se colocan en los pocillos de la microplaca por triplicado. Cada pocillo se ajusta a 50  $\mu$ L con el buffer de ensayo.
3. Luego se prepara la mezcla de reacción: 46  $\mu$ L del buffer de glucosa, 2  $\mu$ L de glucosa sonda y 2  $\mu$ L de la mezcla de enzimas.
4. Se añaden 50  $\mu$ L de la mezcla de reacción a cada pocillo con muestras problema.
5. Se protege de la luz y se mezcla unos segundos en el agitador.
6. Se deja incubar durante 30 minutos a 37°C.

7. Luego se lee en un lector de placas a 570 nm.
8. Se resta la lectura del blanco de todas las lecturas problema, y se hace la regresión lineal de la curva patrón para obtener la cantidad de glucosa de cada pocillo.
9. Se calcula la concentración con la fórmula:

$$\text{Concentración de glucosa} = \frac{SA}{SV} * D$$

Donde:

SA = cantidad de glucosa en la muestra bien calculada a partir de la curva estándar (nmol).

SV = volumen de muestra añadido al pocillo de reacción ( $\mu\text{L}$ ).

D = factor de dilución de la muestra.

## **Anexo 9. Técnica histológica de hematoxilina-eosina (HE).**

### Materiales y equipo.

- Parrilla con agitación magnética
- Horno de secado
- Microtomo
- Porta y cubreobjetos

### Reactivos.

- Formol 4%
- Etanol (70%, 80%, 90%, 96% y 100%)
- Xilol
- Parafina (paraplast)
- Ruyter
- Hematoxilina y eosina

### Procedimiento.

#### Fijación.

1. Previamente se cortan muestras intestino no mayores a 6mm.
2. Las muestras de tejido son puestas en formol durante 48 horas. La preparación del formol es: 100 mL de formol, 900 mL de agua destilada, 4 g de sodio monobásico y 6 g de fosfato de sodio dibásico anhidrido.

#### Inclusión.

1. Se enjuaga el tejido con agua destilada en una parrilla a 400 rpm durante 2 horas, para retirar todo rastro de formol.
2. Las muestras se deshidratan con etanol en una serie ascendente de alcoholes (70%, 80%, 90%, 96% y 100%). La duración en cada alcohol es de 1 hora.
3. Posteriormente las muestras se sumergen en Xilol durante 5 minutos.
4. Las muestras se colocan en parafina previamente derretida y se meten al horno a 56°C (punto de fusión de la parafina) durante 1 hora.

5. Se dejan las muestras a temperatura ambiente aproximadamente 24 hora para dejarlas secar.
6. Las muestras son de nuevo incluidas para favorecer la completa sustitución del líquido intermediario.
7. Se hace una tercera inclusión en paraplast, esta vez se hace con un molde para hacer bloques y se asegura que el tejido esté correctamente alineado de acuerdo con las intenciones del corte.
8. Los bloques de parafina son retallados hasta hacer una pirámide truncada. Se debe considerar el lado al que se le quieren hacer los cortes.

#### Corte.

1. Con un microtomo para parafina se hacen cortes de 5  $\mu\text{m}$ .
2. Son colocados 7 cortes continuos por triplicado en cada portaobjetos.
3. Se colocan un par de gotas de Ruyter para extender y pegar los cortes,
4. Los portaobjetos se ponen sobre una parrilla a 55°C durante 45 minutos.

#### Tinción.

1. Los portaobjetos se envuelven con aluminio y se colocan en un horno a 56°C para desparafinar.
2. Después los cortes se rehidratan con agua destilada.
3. Se coloca un par de gotas de hematoxilina, hasta que todos los cortes de cada portaobjetos quede cubierto.
4. Se enjuagan los portaobjetos con agua del grifo y luego con agua destilada.
5. Se tiñen esta vez con algunas gotas de eosina, hasta cubrir todas las muestras.
6. Se enjuaga con etanol al 96% hasta que no queden manchas del pigmento y se ponen unas gotas de xileno durante 10 minutos.
7. Se coloca el medio de montaje y finalmente se cubre con un cubreobjetos.

NOTA: Todos los portaobjetos deben ser debidamente etiquetados.