

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Programa de Posgrado en Ciencias
en Acuicultura**

**Efecto del suplemento del prebiótico GroBiotic[®]-A en la dieta
sobre el crecimiento, la capacidad digestiva y la respuesta
inmune no específica de juveniles de jurel (*Seriola lalandi*)**

Tesis

Para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Denisse Selene Chávez García

Ensenada, Baja California, México

2016

Tesis defendida por

Denisse Selene Chávez García

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Director de Tesis

Dr. Oscar Basilio Del Río Zaragoza

Dra. Mónica Hernández Rodríguez

Dr. Roger Sean Cudney Bueno



Dr. Benjamín Barón Sevilla

Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez

Directora de Estudios de Posgrado

Denisse Selene Chávez García © 2016

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y del director.

Resumen de la tesis que presenta **Denisse Selene Chávez García** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Efecto del suplemento del prebiótico GroBiotic®-A en la dieta sobre el crecimiento, la capacidad digestiva y la respuesta inmune no específica de juveniles de jurel (*Seriola lalandi*)

Resumen aprobado por:

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Director de Tesis

El jurel cola amarilla (*Seriola lalandi*), es una especie nativa del Pacífico mexicano, conocida por su alto valor comercial debido a la calidad de su carne. Dada su naturaleza carnívora, su requerimiento proteico es alto y por lo tanto las dietas para jurel tienen un precio elevado que cualquier intento por disminuir el costo del alimento, en la sustitución de la harina de pescado por fuentes de proteína alternativa (p.ej., la harina de soya) tendrá un impacto positivo en la producción de esta especie. Asimismo, el uso de prebióticos en diferentes especies ha demostrado un potencial para mejorar el rendimiento en los cultivos, aunado a que su uso propone un manejo preventivo en relación a la salud y a la resistencia de los peces a las enfermedades. Por lo anterior, se llevó a cabo un bioensayo de alimentación para evaluar el efecto de un prebiótico comercial GroBiotic®-A así como la sustitución parcial de harina de pescado (25%) por harina de soya en la dieta de juveniles de jurel (*Seriola lalandi*), sobre parámetros del crecimiento, la capacidad digestiva y la respuesta inmune no específica. El bioensayo tuvo una duración de 8 semanas en un sistema de recirculación compuesto por 12 tanques de 500L. Se formularon cuatro dietas experimentales isoproteicas (45%) e isolipídicas (18%). Cada tratamiento se realizó por triplicado. La primera dieta estuvo constituida por harina de pescado como fuente principal de proteína sin inclusión de prebiótico (HPSP); la segunda dieta fue de harina de pescado con la inclusión del 2% de GroBiotic®-A (HPCP); la tercera dieta fue de harina de pescado con sustitución parcial del 25% con harina de soya sin prebiótico (HSSP) y la cuarta dieta, de harina de pescado con sustitución parcial del 25% con harina de soya con el 2% de GroBiotic®-A (HSCP). GroBiotic®-A 2% incrementó significativamente ($P < 0.05$) tanto el peso ganado (124.9-165.6 g), el porcentaje de peso ganado (127.9-168.1%), el coeficiente de crecimiento en unidades termales (0.11-0.14) y la tasa de conversión alimenticia (1.33-1.53). La actividad específica de la lipasa ($U\ mg^{-1}P$) incrementó en los tratamientos de harina de pescado con harina de soya, así como en los de la inclusión del prebiótico. No hubo diferencias significativas en la concentración de proteínas totales en suero entre los tratamientos. Para el día 56, la inclusión de GroBiotic®-A en la dieta disminuyó significativamente el recuento total de leucocitos en los peces. Al día 15, se observó un aumento significativo en los valores del estallido respiratorio en el tratamiento HPSP en comparación con el tratamiento HPCP que resultó con valores

similares a los iniciales, asimismo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de HS. Al día 45, los valores del estallido respiratorio de los dos tratamientos de harina de pescado con harina de soya disminuyeron significativamente. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que una sustitución parcial del 25 % de harina de pescado por harina de soya, no afecta el desempeño del crecimiento en el jurel cola amarilla del Pacífico. Por otra parte, la inclusión de GroBiotic®-A al 2% mejora significativamente el crecimiento de esta especie bajo condiciones de cultivo. Así mismo, los resultados indican que la sustitución parcial de harina de pescado por harina de soya con la inclusión de GroBiotic®-A al 2% incrementa la actividad específica de la lipasa. Finalmente, en la respuesta del sistema inmune, ni la sustitución parcial de harina de pescado con harina de soya, ni la adición del prebiótico tuvieron un efecto significativo. Se recomienda la inclusión de GroBiotic®-A al 2% en las dietas para juveniles de jurel cola amarilla del Pacífico para mejorar las tasas de crecimiento y la capacidad digestiva así como la sustitución parcial (hasta un 25%) de harina de pescado por harina de soya para disminuir los costos de producción.

Palabras clave: Jurel, *Seriola lalandi*, prebiótico, capacidad digestiva, sistema inmune, sustitución de harina de pescado.

Abstract of the thesis presented by **Denisse Selene Chávez García** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Effect of prebiotic supplement GroBiotic®-A in the diet on growth, digestive capacity and non-specific immune response of juvenile yellowtail (*Seriola lalandi*)

Abstract approved by:

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Thesis Director

The California yellowtail (*Seriola lalandi*) is a native species of the Mexican Pacific, which is known for its high commercial value and excellent meat quality. Given its carnivorous nature, protein requirement is high and therefore diets for this species have high protein content and have high prices. Any effort to reduce the cost of feeding, either by replacing fishmeal with alternative protein sources (i.e., soybean meal) or improving feed efficiency would have a positive impact on the production of this species. The use of prebiotics in different species has shown potential for improving the production efficiency, additionally their use is a putative preventive management tool to improve health condition and fish resistance. Therefore, a feeding trial was conducted to evaluate the effect of including a commercial prebiotic, GroBiotic®-A, and the replacement of fishmeal (i.e., 25%) with soybean meal in juvenile California yellowtail (*Seriola lalandi*) on growth performance, digestive capacity and non-specific immune response. An 8-week feeding trial was performed in a recirculating system composed of twelve 500L circular tanks. Each treatment was evaluated in triplicate. Four isoproteic (45 %) and isolipidic (18 %) experimental diets were formulated. The first diet consisted of fish meal as the main protein source without the inclusion of prebiotic (HPSP); the second diet was formulated with fish meal as the main protein source with the inclusion of 2% GroBiotic®-A (HPCP); the third diet included fish meal with a partial replacement of 25% soybean meal without prebiotic (HSSP) and the fourth diet, fishmeal with partial replacement of 25% soybean meal and the inclusion of 2% of GroBiotic®-A (HSCP). The inclusion of GroBiotic® -A 2% in the diets of yellowtail significantly increased weight gain, percent weight gain, thermal-unit growth coefficient and feed conversion ratio. Additionally, lipase specific activity was significantly increased with the inclusion of the prebiotic. There were no significant differences in total serum protein concentration among treatments. On day 56 of the feeding trial, GroBiotic®-A significantly decreased total white blood cell count in both treatments that included the prebiotic. Respiratory burst values significantly increased on day 15 in fish feed the diets with fishmeal without prebiotic treatment compared with fishmeal with prebiotic treatment and there were no significant differences between the fish feed diets that included soybean meal. However, by day 45, the former treatments had decreased significantly. The results from this study suggest that a partial replacement of 25% fishmeal with soybean meal, does not affect

growth performance in the Pacific yellowtail. Moreover, the inclusion of 2% GroBiotic® -A significantly enhances growth. Results also indicate that partial replacement of fishmeal with soybean meal and the inclusion of 2% GroBiotic® -A significantly increases lipase specific activity. Finally, there was no effect in the immune system response of partial replacement of fishmeal with soybean meal or the inclusion of prebiotic in the diets. It is recommend to include 2% GroBiotic® -A in the diets for juvenile yellowtail to improve growth and digestive capacity and to partially replace (up to 25%) fishmeal with soybean meal to reduce production costs without affecting growth.

Keywords: Yellowtail kingfish, *Seriola lalandi*, digestive capacity, immune system, fish meal replacement

Dedicatoria

A ti, mi querido Tío Trino que aunque acabas de partir y ya no alcanzaste a ver culminado mi trabajo, agradezco infinitamente todas tus enseñanzas, todos tus consejos, todo tu amor y tu apoyo incondicional. Gracias por ser otro padre para mí. Siempre te amaré y siempre te recordaré.

Dondequiera que te encuentres, esto es para ti con todo mi amor.

D.E.P.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca que permitió el desarrollo del presente trabajo.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Departamento de Acuicultura, por aceptarme en su programa de maestría y permitirme llevar a cabo mi trabajo de tesis.

A mi Director de Tesis, Dr. Juan Pablo Lazo Corvera por aceptarme como estudiante en su equipo de trabajo, por guiar mis pasos durante el desarrollo de mi tesis, por su apoyo, por su paciencia, por cada consejo y por cada reto impuesto, porque de cada dificultad se aprenden nuevas cosas y se mejora como persona, infinitamente ¡gracias!.

A mis sinodales: Dra. Mónica Hernández Rodríguez, Dr. Oscar Basilio Del Rio Zaragoza, Dr. Roger Sean Cudney Bueno, por su valioso apoyo, por sus consejos, por las recomendaciones que enriquecieron este trabajo.

A la empresa Ocean Baja Labs, S. de R.L. de C.V. por donar los juveniles de jurel que se utilizaron en el experimento del presente trabajo de tesis.

A todo el personal técnico del Departamento de Acuicultura, en especial a Uvinaí Salgado, a Yaneth Guerrero y M.C. José Espinoza, por su valioso apoyo para el desarrollo de mi trabajo experimental.

Al personal administrativo, Dalila, Amparo, Bibiana y Cecy, por facilitar todos y cada uno de los trámites durante la maestría.

A todo el personal de seguridad, en especial a Don Mario Reynoso, por su valiosa ayuda.

A los investigadores del Departamento de Acuicultura que tuve como catedráticos: Miguel Ángel del Río, Dra. Marysabel Báez, Dra. Claudia Farfán, Dr. Oscar Basilio Del Rio Zaragoza, Dra. Fabiola Lafarga, Dr. Juan Pablo Lazo Corvera, Dra. Beatriz Cordero Esquivel, Dr. Manuel Segovia, Dra. Mónica Hernández, Dr. Jorge Cázares.

A los investigadores, Dr. Benjamín Barón, Dra. Pilar Sánchez, Dra. Carmen Paniagua, quienes me brindaron su apoyo, consejos y enseñanzas, así como facilitaron material, equipo y laboratorios para la realización de las pruebas experimentales.

A la Dra. María Teresa Viana, investigadora en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas IIO, por facilitar las instalaciones para la elaboración de las dietas experimentales.

A Fernando Barreto, estudiante de Doctorado del Instituto de Investigaciones Oceanológicas IIO, por toda su ayuda, enseñanzas compartidas y consejos durante la preparación de las dietas experimentales.

A mis compañeros de Generación: Sara Enciso, Fernando Meza, Carolina Romero, Ingrid Bautista, Stefanny Córdova, Humberto Madero, Constanza Ochoa, Lucía Suárez, Candy Armuelles, Yessica Hernández, Romy Martínez, Héctor Ávila, por todos y cada uno de los momentos que compartimos y todos aquellos recuerdos que se quedan conmigo.

A mis compañeros de Laboratorio: Pablo Fuentes, Jorge Madrid, Bernardo Méndez, Noemí Cota, por todo su apoyo, consejos y ayuda durante la realización del experimento y las pruebas de laboratorio; también por todos aquellos momentos de alegría, por cada cumpleaños, motivo de pastel.

A mis compañeros estudiantes de Doctorado, Raquel Escuredo, Rigoberto Delgado, Roberto Cruz Ceres Molina, por su ayuda, consejos y por los momentos agradables.

A mi querida amiga Clelia Macías, por su apoyo durante la fase experimental, por estar conmigo en las buenas y en las malas. ¡Muchas gracias!

A mi compañera y amiga Sara Enciso, por su valioso apoyo, quiero agradecerte enormemente tu ayuda, tu comprensión, tu compañía, gracias por todos los momentos inolvidables de risas, llanto, estrés, nervios, hambre, sueño, frío, calor, enojo, frustración, alegría, carcajadas, tristezas, cansancio, desayuno, comida, cena, por todo, te quiero mucho amiga, en verdad valoro tu AMISTAD, eres una mujer excepcional, te quiero, te admiro, ¡Mil gracias!

Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iv
Dedicatoria.....	vi
Agradecimientos	vii
Lista de figuras.....	xii
Lista de tablas	xiv
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Acuicultura.....	1
1.2 Biología y cultivo del jurel.....	2
1.3 Alimento	3
1.4 Fuentes de proteína	4
1.5 Suplementos dietarios.....	5
1.6 Mecanismo de acción de los prebióticos.....	7
1.7 GroBiotic®-A	8
1.8 Sistema inmune en peces.....	9
Capítulo 2. Justificación	11
Capítulo 3. Hipótesis.....	12
Capítulo 4. Objetivos.....	13
Objetivo General	13
Objetivos Particulares	13
Capítulo 5. Materiales y métodos.....	14
5.1 Formulación y elaboración de las dietas	14
5.2 Sistema de cultivo	15
5.3 Diseño experimental	17
5.4 Protocolo de alimentación	17
5.5 Colecta de muestras	17
5.6 Desempeño del crecimiento.....	19
5.6.1 Ganancia en peso.....	19

5.6.2 Porcentaje (%) de peso ganado	19
5.6.3 Coeficiente de Crecimiento en Unidades Termales (TGC)	19
5.7 Mortalidad	19
5.8 Eficiencia alimenticia	20
5.8.1 Alimento consumido	20
5.8.2 Tasa de conversión alimenticia aparente	20
5.8.3 Tasa de eficiencia proteica	20
5.8.4 Tasa de conversión proteica	20
5.9 Análisis de composición proximal	21
5.10 Capacidad digestiva	21
5.10.1 Preparación de extractos enzimáticos	21
5.10.2. Actividad de la Tripsina	22
5.10.3 Actividad de la Lipasa	22
5.10.4 Actividad de la Amilasa	23
5.10.5 Actividad Total y Actividad Específica	24
5.11 Respuesta inmune no específica	25
5.11.1 Estallido respiratorio	25
5.11.2 Proteínas Totales En Suero	25
5.11.3 Recuento Total De Leucocitos	26
5.12 Análisis Estadístico	27
Capítulo 6. Resultados	28
6.1 Crecimiento	28
6.2 Mortalidad	30
6.3 Eficiencia alimenticia	30
6.4 Composición proximal del músculo	32
6.5 Capacidad digestiva	34
6.5.1 Actividad de la tripsina	34
6.5.2 Actividad de la lipasa	34
6.5.3 Actividad de la amilasa	36
6.6 Respuesta inmune no específica	36
6.6.1 Estallido respiratorio	36
6.6.2 Proteínas totales en suero	37
6.6.3 Recuento total de leucocitos	38

Capítulo 7. Discusión	40
7.1 Crecimiento.....	40
7.2 Eficiencia alimenticia.....	43
7.3. Capacidad digestiva.....	46
7.3.1 Actividad de la tripsina.....	46
7.3.2 Actividad de la lipasa.....	47
7.3.3 Actividad de la amilasa.....	48
7.4 Respuesta inmune no específica.....	49
7.4.1 Estallido respiratorio.....	49
7.4.2 Proteínas totales en suero.....	51
7.4.3 Recuento total de leucocitos.....	52
Capítulo 8. Conclusiones	55
Capítulo 9. Recomendaciones	56
Referencias Bibliográficas	57

Lista de figuras

Figura	Página
1. Jurel (<i>Seriola lalandi</i>). Recuperada de https://www.igfa.org/species/271-yellowtail-california.aspx? CommonName=271-yellowtail-california.aspx	2
2. Sistema experimental, para el bioensayo de alimentación en juveniles de jurel (<i>Seriola lalandi</i>).	16
3. Colecta de muestras. a) extracción de sangre por la vena caudal; b) Colocación de la sangre en un tubo eppendorf sin anticoagulante (izquierda) y otro tubo con Heparina-Litio (derecha); c) Disección del pez; d) Ciegos pilóricos e intestino completo.....	18
4. Peso ganado (g/pez) de los juveniles de jurel (<i>Seriola lalandi</i>) obtenido a partir de las cuatro dietas experimentales. Donde HP SP: Harina de Pescado Sin Prebiótico; HP CP: Harina de Pescado Con Prebiótico; HS SP: Harina de Pescado y Soya Sin Prebiótico; HS CP: Harina de Pescado y Soya Con Prebiótico. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).	30
5. Porcentaje de peso ganado (%) de los juveniles de jurel (<i>Seriola lalandi</i>) obtenido a partir de las cuatro dietas experimentales. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).....	30
6. Coeficiente de crecimiento en unidades termales (TGC) de los juveniles de jurel (<i>Seriola lalandi</i>) obtenido a partir de las cuatro dietas experimentales. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).	31
7. Tasa de conversión alimenticia (TCA) de los juveniles de jurel (<i>Seriola lalandi</i>) alimentados a partir de las cuatro dietas experimentales. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).	33
8. Actividad específica (U mg ⁻¹ P) de la lipasa en juveniles de jurel (<i>Seriola lalandi</i>) alimentados con las cuadro dietas experimentales. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).	36
9. Estallido respiratorio (Abs) en juveniles de jurel (<i>Seriola lalandi</i>) observado a través del tiempo para los cuatros tratamientos experimentales. Los valores indican la media ± D.E. Letras distintas indican diferencia significativa (P<0.05).	38

10. Concentración de proteínas totales en suero (g/dl) en juveniles de jurel (*Seriola lalandi*) a través del tiempo. Letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0.05$)..... 39
11. Recuento total de leucocitos (No. cél/mm³) en juveniles de jurel (*Seriola lalandi*) como efecto de la inclusión del prebiótico observado a través del tiempo (días). Los valores indican la media \pm D.E. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$)..... 40

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Formulación de las dietas experimentales. Donde HP SP: Harina de Pescado Sin Prebiótico; HP CP: Harina de Pescado Con Prebiótico; HS SP: Harina de Pescado y Soya Sin Prebiótico; HS CP: Harina de Pescado y Soya Con Prebiótico. Los valores están expresados en porcentaje.....	15
2. Indicadores de crecimiento para cada uno de los tratamientos. Los valores indican la media \pm Desviación estándar (D.E). Superíndices distintos indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	29
3. Indicadores de eficiencia alimenticia para cada uno de los tratamientos. Los valores indican la media \pm D.E. Superíndices distintos indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	32
4. Composición proximal del músculo de juveniles jurel (<i>Seriola lalandi</i>) al inicio del experimento (día cero). Los valores indican la media \pm Desviación estándar.....	34
5. Composición proximal del músculo de juveniles de jurel (<i>Seriola lalandi</i>) alimentados durante 8 semanas con los cuatro tratamientos experimentales. Los valores indican la media \pm D.E. Superíndices distintos indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	34
6. Actividad de la tripsina expresada como Actividad Total (U/pez) y Actividad específica (U mg-1P) en juveniles de jurel (<i>Seriola lalandi</i>) alimentados con las cuatro dietas experimentales. Los valores indican la media \pm D.E.....	35
7. Actividad de la lipasa expresada como Actividad Total (U/pez) y Actividad específica (U mg-1P) en juveniles de jurel (<i>Seriola lalandi</i>) alimentados con las cuatro dietas experimentales. Los valores indican la media \pm D.E. Superíndices distintos indican diferencia significativa ($P < 0.05$).....	36
8. Actividad de la amilasa expresada como Actividad Total (U/pez) y Actividad específica (U mg-1P) en juveniles de jurel (<i>Seriola lalandi</i>) alimentados con las cuatro dietas experimentales. Los valores indican la media \pm D.E.....	37

Capítulo 1. Introducción

1.1 Acuicultura

La acuicultura se encuentra como uno de los sectores de producción de alimentos de más rápido crecimiento. En el año 2012, este sector alcanzó un máximo histórico de producción de 90.4 millones de toneladas (equivalentes en peso vivo) de los cuales 66.6 millones de toneladas pertenecieron a animales acuáticos (peces, crustáceos y moluscos, entre otros) destinados al consumo humano. De esta manera, la acuicultura contribuyó con un 42% del total de la producción mundial, casi la mitad de los productos destinados a la alimentación humana, por lo que se estima que para el año 2030, esta proporción incremente a un 62% (FAO, 2014).

Dentro de los principales grupos de especies producidas por la acuicultura tanto continental como marina en 2012, se encuentran los peces, los crustáceos y los moluscos. El grupo de peces aportó el 66.3% del volumen total de la producción, esto es, 44.2 millones de toneladas (38.6 millones de toneladas de peces de cultivos dulceacuícolas y 5.6 millones de toneladas procedentes del cultivo marino) y un 63.5% del valor total de la misma. El grupo de crustáceos aportó 9.7% del volumen total con casi 6.5 millones de toneladas, traducidas en un 22.4% del valor total de la producción. El grupo de los moluscos, a pesar de que aportó mayor volumen de producción (22.8%) comparado con el grupo de los crustáceos, el valor económico de dicha producción sólo significó un 11.5%. Finalmente, el resto del total de la producción acuícola (incluidas especies dulceacuícolas y marinas), representa sólo un 1.3% del volumen es decir, 2.5% del valor económico total de la producción. Destacando la producción del grupo de los peces por medio de la acuicultura, a pesar de que las especies marinas cultivadas solamente aportan el 12.6% del volumen de la producción total, su valor (23500 millones de USD) constituye el 26.9% del total de las especies de peces (FAO, 2014).

1.2 Biología y cultivo del jurel

El jurel cola amarilla del Pacífico, *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) es una especie que pertenece al orden Perciformes, de la familia Carangidae (Bycov, 1985). Es un pez pelágico marino que se distribuye globalmente en las aguas templadas y subtropicales (Abbink *et al.*, 2011); sus hábitos alimenticios incluyen principalmente macarela, anchoveta, sardina y calamar (Avilés-Quevedo y Castelló-Orvay, 2004).

El *Seriola lalandi* es conocido comúnmente como jurel, jurel de castilla, jurel cola amarilla del Pacífico, jurel de California, medregal amarillo o medregal cola amarilla (Figura 1).



Figura 1. Jurel (*Seriola lalandi*). Recuperada de <https://www.igfa.org/species/271-yellowtail-california.aspx?CommonName=271-yellowtail-california.aspx>

El cultivo del género *Seriola*, comenzó de forma artesanal en Japón en 1927, mientras que en México lleva menos de una década; a la fecha se encuentran vigentes cinco concesiones de acuicultura comercial en la península de Baja California, una en Baja California (BC) y cuatro en Baja California Sur (BCS), además de tres permisos para la acuicultura de fomento en los estados de Sonora, BCS y BC (SAGARPA, 2012).

En relación a la producción actual, de manera oficial no se cuenta con estadísticas, sin embargo, el jurel cola amarilla tiene gran potencial acuícola ya que son organismos de rápido crecimiento, se adaptan al confinamiento y al alimento formulado, además que su carne es de gran calidad y alto valor comercial; aunado a estas cualidades, esta especie se encuentra naturalmente en las aguas mexicanas, lo que permite la captura de juveniles silvestres para el inicio del cultivo (Avilés-Quevedo y Castelló-Orvay, 2004).

Por lo anterior, el cultivo de especies marinas en particular *Seriola lalandi*, representa una buena opción para aquellos productores que tienen como recurso limitado la fuente agua dulce o bien, que de forma natural, cuentan con las condiciones ambientales que permiten el desarrollo de la actividad acuícola para esta especie.

1.3 Alimento

Dentro del cultivo de peces marinos, uno de los principales aspectos que se debe considerar es la basta disponibilidad de los juveniles a cultivar y para ello, la supervivencia de las larvas bajo cultivo depende en gran parte de cumplir con los requerimientos nutricionales de la especie (Lazo, 2000). Es por tal motivo, que indudablemente uno de los puntos esenciales para el éxito de un cultivo (independientemente de la especie a cultivar) se centra en la alimentación y nutrición de los organismos lograda a través de la calidad de los nutrientes proporcionados en el alimento. Este mismo, determina la tasa de crecimiento, la calidad de la carne y el aprovechamiento de éste por parte del pez según el tipo de dieta (Avilés-Quevedo y Castello-Orvay, 2005).

Con relación a lo anterior, para la industria acuícola, dentro de los costos de producción, el concepto de los costos de alimentación constituyen hasta un 40%- 70% (Liao y Chao, 2007). Por lo antes mencionado, es de suma importancia considerar dentro del aspecto de la nutrición y alimentación de los organismos a cultivar, la elaboración de una dieta adecuada, es decir, que satisfaga sus requerimientos nutricionales. Asimismo, los alimentos de calidad y de más bajo costo tendrán una gran influencia en la competitividad de la industria acuícola (Knapp, 2008).

Dentro de los componentes esenciales en el alimento de los peces se incluyen las proteínas (aminoácidos), los lípidos (ácidos grasos), los carbohidratos (azúcares, almidón), vitaminas y minerales (Abowei y Ekubo, 2011). Las proteínas son el principal componente de los tejidos de los peces y constituyen alrededor del 65% al 75% del total en la base del peso seco. Los peces, tal como otros animales, no tienen un

requerimiento real por las proteínas, sino que requieren de una mezcla balanceada de aminoácidos esenciales y no esenciales (Wilson, 1989). Dentro de las proteínas, los aminoácidos esenciales son aquellos que no pueden ser sintetizados por los peces para satisfacer sus requerimientos, de esta manera, deben ser incorporados en la dieta (Abowei y Ekubo, 2011).

1.4 Fuentes de proteína

Una de las principales fuentes de proteína animal en alimentos comerciales para peces y crustáceos es la harina de pescado, la cual se obtiene fundamentalmente de anchoveta y arenque (Riddick, 2014). La harina de pescado es bien conocida por su excelente perfil de aminoácidos y una alta digestibilidad, pero tiene la desventaja de ser un recurso no renovable y tener un alto costo por su alta demanda (Abowei y Ekubo, 2011).

De acuerdo con datos de la FAO (2014), en la producción de harina de pescado se utilizan generalmente peces pelágicos pequeños, principalmente del grupo de las anchovetas. Sin embargo, a partir del año 2005 pese a fluctuaciones en la captura de anchoveta debidas al Fenómeno El Niño y a medidas de ordenación para la captura de ésta y otras especies utilizadas en la elaboración de harina, la producción de harina de pescado a partir de pescado entero ha descendido gradualmente. A pesar de ello, ha habido una compensación parcial por un aumento del porcentaje de la producción de harina de pescado obtenida de subproductos pesqueros. No obstante, la demanda de este producto siguió en aumento, lo que lo llevó a precios históricos en 2013, donde alcanzó los 1,919 dólares por tonelada.

Dado que la harina de pescado es la principal fuente de proteína utilizada en el alimento de peces carnívoros, su alta demanda, su incremento en costo, y su producción limitada ha vuelto esencial la búsqueda de alternativas de fuentes proteicas (Jirsa, Davis, Stuart, y Drawbridge, 2011). Una de las mejores fuentes de proteína vegetal es la harina de soya. Los productos derivados de la soya, se reconocen por ser económicos y

nutritivos, con un alto contenido de proteína y un balance del perfil de aminoácidos adecuado (con la deficiencia de algunos como la lisina y metionina). No obstante, ciertas características nutricionales y la presencia de anti-nutrientes requieren de un procesado especial que eleva sus costos de producción, por lo que estos productos no se han utilizado a gran escala en la producción de alimentos para peces carnívoros (Gatlin *et al.*, 2007); de esta forma, pensar en una sustitución parcial o total en la dieta de los peces, dependerá de la especie a cultivar.

1.5 Suplementos dietarios

Uno de los constantes objetivos en la acuicultura, es el de maximizar la eficiencia de la producción con la finalidad de mejorar la rentabilidad de esta actividad (Gatlin *et al.*, 2006). El rápido crecimiento de la acuicultura así como su intensificación han traído consigo crecientes problemas derivados de altas densidades, las deficiencias nutricionales y el manejo inadecuado de los organismos. Estos problemas crean condiciones de estrés físico y químico que traen como consecuencia que los organismos en cultivo sean más vulnerables a los diferentes agentes patógenos (Román, 2014).

Las infecciones bacterianas afectan frecuentemente a los organismos cultivados con un sistema inmune comprometido por condiciones de estrés, con ello, una las principales formas de atender dichas infecciones ha sido a través del uso de antibióticos. No obstante, esta estrategia ha sido fuertemente criticada por el potencial desarrollo de resistencia a los antibióticos y el deterioro del ambiente. Aunado a esto, ciertos antibióticos han demostrado suprimir el sistema inmune de los organismos cultivados volviéndolos potencialmente más susceptibles a infecciones virales o parasitarias, por lo que, en Europa se ha prohibido el uso de antibióticos, mientras que en Estados Unidos y otros países se han desarrollado regulaciones estrictas para sus uso. Tales políticas, que pueden llegar a afectar a la actividad acuícola, han impulsado el interés por el desarrollo de alternativas para el control de enfermedades (Gatlin *et al.*, 2006).

De acuerdo a Gatlin (2002, citado en Gatlin *et al.*, 2006), una buena dieta preparada no sólo provee los nutrientes esenciales que requiere un organismo cultivado para favorecer su crecimiento y desarrollo, sino que también puede convertirse en uno de los conductos más promisorios para influir en su estado de salud, resistencia frente a condiciones de estrés, así como de los potenciales agentes causantes de enfermedades.

En años recientes se ha trabajado en el desarrollo de estrategias para adicionar en la dieta compuestos que promueven la salud de los organismos (Gatlin *et al.*, 2006). Se ha encontrado que la suplementación de diversos aditivos, tales como los inmunoestimulantes, prebióticos y probióticos utilizados en pequeñas cantidades con el propósito de fortificar ciertos nutrientes han mejorado el estado inmunológico, la eficiencia alimenticia y el crecimiento de peces y crustáceos (Ganguly, Dora, Sarkar, y Chowdhury, 2012)

Un probiótico es definido como un suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta benéficamente al hospedero animal al mejorar su equilibrio intestinal (Fuller, 1989, citado por Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008)

Por otro lado, Gibson y Roberfroid (1995) definen a los prebióticos como ingredientes alimenticios no digeribles que afectan beneficiosamente al hospedero al estimular selectivamente el crecimiento y / o actividad de una o un número limitado de especies bacterianas ya residentes en el intestino. Estos autores proponen también el concepto de simbióticos, como la mezcla de probióticos y prebióticos, que afectan beneficiosamente y de manera sinérgica al hospedero al mejorar la supervivencia y el establecimiento de los microorganismos vivos en el tracto gastrointestinal.

De acuerdo a las características descritas por Gibson (1999, citado en Pérez-Conesa *et al.*, 2004) los carbohidratos no digeribles (oligosacáridos y polisacáridos), algunos péptidos y proteínas y ciertos lípidos (ésteres y éteres) pueden ser considerados prebióticos.

Por otra parte, los inmunoestimulantes son considerados componentes naturales o sintéticos que potencian los mecanismos de respuesta inmune del hospedero e

incrementan la resistencia de éste a las enfermedades infecciosas.(Rodríguez *et al.*, 2003 y Sahoo, 2007 citados en Vásquez-Piñeros, Rondón-Barragán, y Eslava-Mocha, 2012)

1.6 Mecanismo de acción de los prebióticos

Un prebiótico puede actuar de dos formas: primero como un prebiótico clásico, en donde es ingerido y se fermenta en el tracto gastrointestinal, de forma que promueve el cambio de la microbiota intestinal estimulando la flora benéfica, y así mejora la salud del hospedero; segundo, como inmunoestimulante, donde el prebiótico puede ser reconocido por receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP' s), es decir, su estructura química es reconocida como un agente infeccioso proveniente de hongos o bacterias potencialmente dañinas para el hospedero, de manera que estimula directamente el sistema inmune innato (por ejemplo la fagocitosis, y la actividad de la lisozima) y de igual forma que un prebiótico clásico, finalmente mejora la salud del hospedero al incrementar el tiempo de actividad de la respuesta inmune no específica de manera que funciona como un método profiláctico (Song *et al.*, 2014; Vásquez-Piñeros *et al.*, 2012).

Dentro de algunos oligosacáridos evaluados en el alimento para peces se encuentran los fructooligosacáridos (FOS), los mananoligosacáridos (MOS) y los galactooligosacáridos (GOS). Por otro lado dentro de los polisacáridos, algunos con los cuales se ha trabajado se encuentran la inulina y los β -glucanos (Song *et al.*, 2014).

Por ejemplo, Burr *et al.* (2008) evaluaron los efectos de la suplementación en dieta de diferentes prebióticos (GroBiotic®-A, MOS, GOS e Inulina), sobre la digestibilidad de dietas a base de soya en la corvina dorada (*Sciaenops ocellatus*) y concluyeron que de todos los prebióticos únicamente la inulina no tuvo efecto positivo en esa especie, mientras que el resto, incrementó los valores de digestibilidad de diferentes nutrientes evaluados, comparados con aquellas dietas que carecían del suplemento. Estos

resultados sugieren que para esta especie, el prebiótico incrementó el valor nutricional de una dieta que normalmente es menos digerible.

De igual manera, Buentello *et al.* (2010), evaluaron el efecto de los prebióticos (GroBiotic[®]-A, FOS, MOS y TOS) sobre parámetros de supervivencia, eficiencia alimenticia y respuesta inmune innata en la corvina roja (*Sciaenops ocellatus*). Los autores concluyeron que los prebióticos tuvieron un efecto positivo al incrementar estos parámetros.

1.7 GroBiotic[®]-A

GroBiotic[®]-A es un prebiótico comercial elaborado por International Ingredient (St. Louis, MO, USA), contiene una mezcla de levadura de cerveza parcialmente autolizada, componentes lácteos y productos secos de la fermentación (Zheng *et al.*, 2011). Los componentes que se cree que estimulan el sistema inmune incluyen oligosacáridos (MOS), betaglucanos y nucleótidos. Además que este prebiótico también contiene compuestos que estimulan la flora benéfica intestinal, como las bacterias del género *Lactobacilli* (Lochmann, Sink, Phillips y Chen, 2010).

GroBiotic[®]-A ha sido evaluado anteriormente en diversas especies como el híbrido de la lobina rayada *Morone chrysops x M. saxatilis* (Li y Gatlin , 2004), la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Sealey *et al.*, 2007), la corvina roja *Sciaenops ocellatus* (Burr *et al.*, 2008; Burr *et al.*, 2009; Buentello *et al.*, 2010), el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Li *et al.*, 2009), la carpa dorada *Notemigonus crysoleucas* (Lochmann *et al.*, 2010), la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (Zheng *et al.*, 2011), en donde se ha concluido, que GroBiotic[®]-A incrementa algunos de los parámetros de crecimiento, de la respuesta inmune, la supervivencia y resistencia ante desafío con bacterias y virus.

1.8 Sistema inmune en peces

A pesar de ciertas diferencias, el sistema inmune de los peces es fisiológicamente similar al de otros vertebrados superiores, sin embargo, se debe considerar que los peces son organismos de vida libre desde etapas embrionarias tempranas, por lo que su supervivencia depende del sistema inmune innato (Rombout *et al.*, 2005, citado en Uribe *et al.*, 2011). El sistema inmune innato o no específico de peces es considerado un componente esencial en el combate de patógenos debido a las limitaciones de su sistema inmune específico, es decir, por su naturaleza poiquiloterma, su limitado repertorio de anticuerpos y la baja proliferación, maduración y memoria de los linfocitos (Magnadóttir, 2006).

El sistema inmune no específico se divide comúnmente en tres componentes: 1) barreras físicas (escamas, piel, mucus, branquias); 2) factores humorales (inhibidores de crecimiento, lisozimas, inhibidores de proteasa), y 3) componentes celulares (células fagocíticas y células citotóxicas no específicas) (Magnadóttir, 2006; Uribe *et al.*, 2011). Las células fagocíticas (los neutrófilos y los macrófagos), llevan a cabo el proceso de fagocitosis (ingestión y digestión de material extraño), uno de los más importantes en los animales poiquiloterms ya que está menos influenciado por la temperatura (Blazer, 1991; Lange y Magnadóttir, 2003; Magnadóttir *et al.*, 2005, citados en Uribe *et al.*, 2011). Cuando la fagocitosis inicia, hay un incremento violento de la demanda de oxígeno, lo que se conoce como estallido respiratorio o estallido oxidativo. El oxígeno es convertido a especies reactivas que actúan como poderosos agentes microbicidas (Abreu *et al.*, 2009)

De los parámetros de la química sanguínea, las proteínas totales en suero pueden ser utilizadas para evaluar el estado fisiológico del pez (De Pedro *et al.*, 2005, citado en Del Río-Zaragoza *et al.*, 2011). Por ejemplo, Wedemeyer y McLeay, (1981, citado en Del Río-Zaragoza *et al.*, 2011) sugieren que altas concentraciones de proteínas totales en el suero indican una alta concentración en la sangre asociado a un buen estado de salud, mientras que una disminución en la concentración de proteínas se atribuye a

debilidad, daño al hígado, mala absorción de nutrientes, deficiencia nutricional, hambre y enfermedades infecciosas.

Otro parámetro hematológico que es utilizado como indicador del sistema inmune de peces es el conteo total de leucocitos. Por ejemplo, (Donaldson 1981; Wedemeyer *et al.* 1990, citado en Valenzuela *et al.*, 2003) sugieren que los cambios en este parámetro derivados de estrés crónico pueden producir disminución en el número de leucocitos, lo que a su vez afecta la fórmula leucocitaria, es decir, hay un decremento en el número de monocitos y linfocitos, mientras que aumentan los neutrófilos.

La inmunidad específica o adquirida, ocurre a través de mecanismos que envuelven una red compleja de células especializadas, proteínas, genes y mensajes bioquímicos para que el organismo responda a antígenos específicos por medio de la producción de anticuerpos y células efectoras (linfocitos T y B) con alta especificidad y afinidad (Uribe *et al.*, 2011).

Por último, el estudio de los mecanismos de acción de los prebióticos se han centrado en dos procesos: 1) el estímulo directo de la fermentación en el tracto gastrointestinal de forma que promuevan cambios en la flora intestinal que estimula específicamente la proliferación de bacterias benéficas que mejoran la salud del hospedero y su capacidad digestiva, y 2) el reconocimiento de los prebiótico por receptores de patrones moleculares asociados a patógenos, de manera que se estimula directamente el sistema inmune innato del pez (por ejemplo la fagocitosis, producción de leucocitos) y por lo tanto la capacidad de respuesta a enfermedades. Es por esto que para lograr elucidar los mecanismos de acción de los prebióticos se deben caracterizar los cambios en la capacidad digestiva (la actividad de las enzimas digestivas; como la tripsina, lipasa y amilasa), la digestibilidad y el sistema inmune innato de los peces (fagocitosis, actividad de las lisozimas, estallido respiratorio, leucocitos, etc.). Es importante mencionar que la capacidad digestiva en el presente estudio se evaluará mediante la actividad de las enzimas digestivas (i.e., proteasas, lipasas y carbohidrasas).

Capítulo 2. Justificación

El jurel cola amarilla del Pacífico (*Seriola lalandi*) es una especie nativa de nuestros mares, que se destaca por sus altas tasas de crecimiento y por la calidad de su carne con un alto valor comercial. Esto último ha convertido al jurel en una especie de interés con alto potencial de cultivo en el Noroeste de México, debido a la gran demanda que posee en el mercado internacional, por lo que es necesario, conocer mejor sus requerimientos nutricionales y condiciones de cultivo que pudieran mejorar el desarrollo de esta industria.

Una de las características de este organismo es que al ser un pez carnívoro, su requerimiento proteico es alto, lo que a su vez implica alimento formulado alto en costos. Por lo anterior, cualquier intento por disminuir el costo del alimento, ya sea sustituyendo la harina de pescado por fuentes de proteína alternativa (p.ej. la harina de soya) tendría un impacto positivo en la rentabilidad de la producción de esta especie.

Por otra parte, a pesar de haber diversos trabajos relativos al uso de aditivos en la dieta de peces tales como los prebióticos, los cuales pueden mejorar la salud de los organismos, incrementar el crecimiento así como la resistencia a enfermedades, en esta especie en particular aun no se tienen reportes, por lo tanto, es necesario fortalecer y aportar el conocimiento en el área nutricional y proponer prebióticos que hayan demostrado anteriormente un buen desempeño en otras especies y que pudieran potenciar un mejor rendimiento en los cultivos de jurel.

Aunado a lo anterior, el uso de prebióticos en el cultivo de peces propone un manejo preventivo al mejorar la salud y resistencia de los peces ante agentes causantes de enfermedades, por lo que puede resultar beneficioso desde el punto de vista económico y ecológico al reducir el uso de tratamientos tales como los antibióticos que se suman en la cuenta de los gastos de producción y que además ocasionan graves daños a la flora y fauna que rodea los sitios de cultivo.

Capítulo 3. Hipótesis

Hipótesis General

El suplemento del prebiótico GroBiotic®-A al 2% en la dieta de juveniles de jurel (*Seriola lalandi*) incrementa el crecimiento, la capacidad digestiva y la respuesta inmune no específica.

Capítulo 4. Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto del suplemento del prebiótico GroBiotic®-A al 2% en la dieta sobre el crecimiento, la capacidad digestiva y la respuesta inmune no específica de juveniles de jurel (*Seriola lalandi*).

Objetivos Particulares

- Evaluar el efecto de GroBiotic®-A (2%) sobre la ganancia en peso, el porcentaje de ganancia en peso, el coeficiente de crecimiento, el alimento consumido, la tasa de conversión alimenticia, la tasa de eficiencia proteica, la tasa de conversión proteica y la mortalidad.
- Evaluar el efecto de GroBiotic®-A (2%) sobre la actividad de las enzimas digestivas (tripsina, lipasa y amilasa).
- Evaluar el efecto de GroBiotic® -A (2%) sobre el estallido respiratorio, las proteínas totales y el conteo de leucocitos totales.

Capítulo 5. Materiales y métodos

El trabajo experimental se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos del Departamento de Acuicultura del CICESE y se utilizaron juveniles de jurel (*Seriola lalandi*), donados por la empresa Ocean Baja Labs, S. de R.L. de C.V. localizada en el Ejido Eréndira, Ensenada, B.C., México.

5.1 Formulación y elaboración de las dietas

Se formularon cuatro dietas isoproteicas (45%) e isolipídicas (18%) con base en los requerimientos nutricionales del jurel cola amarilla y acorde a lo reportado por Booth *et al.* (2010) y Jirsa *et al.* (2011). Dos de la dietas se formularon con harina de pescado como fuente principal de proteína con y sin el prebiótico al 2% (recomendado por la casa comercial). En las otras dos dietas se evaluó la sustitución parcial de la harina de pescado, por harina de soya (25%) y el efecto de la presencia o ausencia del prebiótico al 2% (Tabla 1).

La elaboración de las dietas se realizó en el Laboratorio de Investigaciones y Desarrollo de Alimentos para la Acuicultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Se pesaron cada uno de los componentes de las dietas en una balanza (modelo EQ-10/20, marca TOR-REY) y enseguida se mezclaron en una trituradora comercial (Robot-Coupe, USA, modelo R60). Luego del proceso de mezcla, se utilizó un molino de carne (Marca TOR-REY) acoplado a un dado con orificios de 5 mm de diámetro para la obtención de pellets. Enseguida, los pellets se dejaron enfriar para triturarlos en trozos cortos y se colocaron en un horno con flujo de aire (Hafo series 1600) para secar por 24 horas a 65°C. Después, se empacaron las dietas en bolsas de plástico para luego sellarse y almacenarse a -20°C hasta su posterior uso. Finalmente a las dietas elaboradas se les realizó un análisis de composición proximal (AOAC, 2011).

Tabla 1. Formulación de las dietas experimentales. Donde HP SP: Harina de Pescado Sin Prebiótico; HP CP: Harina de Pescado Con Prebiótico; HS SP: Harina de Pescado y Soya Sin Prebiótico; HS CP: Harina de Pescado y Soya Con Prebiótico. Los valores están expresados en porcentaje.

Ingredientes	Tratamiento			
	HP SP	HP CP	HS SP	HS CP
Harina de Soya	0	0	15	15
Harina de ave ^a	9	9	9	9
Harina de pescado ^b	55	55	45	45
Aceite de Pescado	11.3	11.9	13	13
Almidón	14	11.4	5.3	3.3
Gelatina	2	2	2	2
Rovimix ^c	5	5	5	5
Stay C ^d	1.5	1.5	1.5	1.5
Lecitina	1	1	1	1
Taurina	1	1	3	3
Benzoato de sodio	0.2	0.2	0.2	0.2
GroBiotic®-A ^e	0	2	0	2
BHT ^f	0.01	0.01	0.01	0.01
Total (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Análisis de composición proximal ^g				
Proteínas	45.4±1.2	47.0±0.5	48.8±0.5	49.6±0.5
Lípidos	18.6±0.4	19.5±0.3	20.1±0.3	21.2±0.6
Humedad	0.3±0.02	0.6±0.05	0.7±0.02	2.0±0.07
Cenizas	13.2±0.10	13.2±0.19	12.9±0.13	13.0±0.07

^a Protmagro premium; ^b Protmatgro; ^c Mezcla de vitaminas y minerales; ^d Vitamina C; ^e International Ingredient (St. Louis, MO, USA); ^f Butilhidroxitolueno (antioxidante); ^g Medias de tres análisis.

5.2 Sistema de cultivo

Los juveniles de jurel donados por la empresa Ocean Baja Labs, fueron transportados vía terrestre del Ejido Eréndira hacia las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos del Departamento de Acuicultura del CICESE en la ciudad de Ensenada, B.C.

Una vez en el laboratorio de Peces Marinos, los juveniles se mantuvieron en Raceways de 3m³ durante 17 días. Posteriormente los peces se transfirieron a un tanque de 9 m³ donde se mantuvieron durante 58 días hasta que alcanzaron una talla de 97.9 ± 8.5 g para el experimento.

Durante el período de mantenimiento y aclimatación, los organismos se alimentaron con alimento comercial para peces marinos marca Skretting (55% de Proteína y 15% de lípidos) hasta el día del inicio del experimento, donde se sustituyó por las dietas formuladas para el presente bioensayo.

Una vez alcanzada la talla mencionada con anterioridad, se tomaron aleatoriamente 180 peces y de éstos se colocaron 15 juveniles en cada uno de los 12 tanques del sistema experimental. Luego, los peces se mantuvieron durante 12 días en período de aclimatación al nuevo sistema.

El sistema experimental estuvo compuesto por un biofiltro dinámico por aireación de medio Kaldnes (volumen de 350L), un segundo biofiltro de cama compactada (cuentas plásticas color negro de alta densidad) de 350L de volumen, un tanque de compensación de 275L, un par de bombas de agua (Modelo Sweetwater High efficiency She 3.0 Aquatic Eco-Systems), una bomba de calor (marca Aqua Logic modelo 2TWB0018A1000AB) y 12 tanques circulares (3 tanques por tratamiento) de fibra de vidrio, con fondo plano y con una capacidad de 500 litros (Figura 2). El oxígeno disuelto se mantuvo entre los 5-7 mg/L, la temperatura a 23.5 ± 1 °C y el Nitrógeno Amoniacal Total (NAT) por debajo de los 0.05 mg/l.



Figura 2. Sistema experimental, para el bioensayo de alimentación de juveniles de jurel (*Seriola lalandi*).

5.3 Diseño experimental

El bioensayo consistió en cuatro tratamientos experimentales. En el primer tratamiento, los peces se alimentaron con la dieta de Harina de Pescado (como fuente principal de proteína) y sin la adición del prebiótico (HPSP); en el segundo grupo experimental, los juveniles se alimentaron con la dieta de Harina de Pescado (como fuente principal de proteína) con la adición del prebiótico GroBiotic®-A al 2% (HPCP); en el tercer grupo experimental, los organismos fueron alimentados con la dieta de 75% Harina de Pescado y 25% Harina de Soya (como fuente de proteína) sin la adición del prebiótico (HSSP); por último, en el cuarto grupo experimental, los peces fueron alimentados con la dieta de 75% Harina de Pescado y 25% Harina de Soya (como fuente de proteína) con la adición del prebiótico GroBiotic®-A al 2% (HSCP).

5.4 Protocolo de alimentación

Los peces se alimentaron con sus respectivas dietas, tres veces al día (8:00, 12:00 y 16:00 h), a saciedad aparente, los siete días de la semana. El bioensayo tuvo una duración de 8 semanas (56 días).

5.5 Colecta de muestras

La primera colecta de muestras se realizó de 12 peces del tanque de 9m³ con la finalidad de registrar las condiciones iniciales de los organismos, se consideró a estas muestras como las del día 0. Posteriormente, se llevaron a cabo otros cuatro muestreos del sistema experimental, uno al día 14 del experimento (semana 2), a la mitad del experimento (día 28), otro al día 42 y al finalizar el bioensayo (semana 8). Se tomaron tres organismos por tanque, es decir, nueve peces por tratamiento en cada muestreo.

Para la toma de las muestras, se procedió a anestésiar a los peces por la técnica de inmersión en agua de mar con el anestésico Metano sulfonato de tricaína (MS-222) en una concentración de 90mg/L. Luego, los organismos se colocaron en un ictiómetro para el registro de la longitud (cm), mientras que el peso (g) se midió en una balanza (Rhino, modelo BAPO-10). Enseguida, se llevaron a una bandeja plástica con una esponja cubierta por una manta húmeda y se procedió a extraer de la vena caudal una muestra de sangre con una jeringa de 3 mL (

Figura 3). La sangre obtenida (aproximadamente 2 mL) fue depositada en dos tubos. En el primer tubo, un Microtainer PST™ con Heparina-Litio como anticoagulante en el cual se tuvo especial cuidado de girarlo mientras se depositaba la sangre; de esta muestra se llevó a cabo el recuento total de leucocitos y el estallido respiratorio. En el segundo tubo eppendorf sin anticoagulante, se obtuvo el suero por centrifugación en una microcentrífuga (marca Eppendorf 5417R) durante 10 minutos a 7000 RPM (5204 g) a una temperatura de 5°C, posteriormente se tomó el sobrenadante (suero) y se colocó en otro tubo eppendorf de 600µL protegido con papel parafilm, para guardarse durante 24 horas en el congelador a -20°C y después llevarse al ultracongelador a -80°C hasta su posterior uso en la determinación de las proteínas totales.

Una vez tomadas las muestras de sangre, los organismos fueron sacrificados a través de una punción cerebral, para posteriormente realizar una disección que permitió tomar muestra del tejido muscular (para el análisis de composición proximal) y el intestino completo (para el análisis de la actividad enzimática).

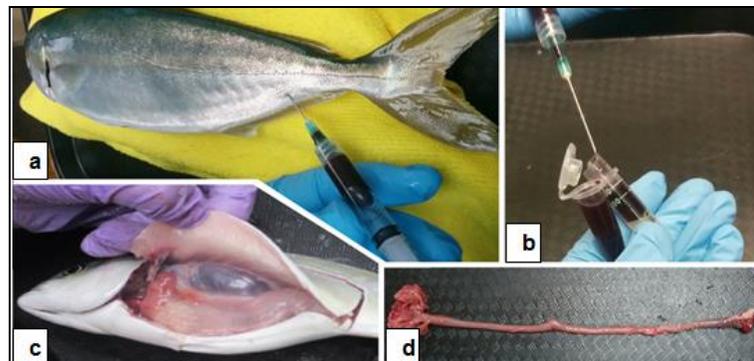


Figura 3. Colecta de muestras. a) extracción de sangre por la vena caudal; b) Colocación de la sangre en un tubo eppendorf sin anticoagulante (izquierda) y otro tubo con Heparina-Litio (derecha) como anticoagulante; c) Disección del pez; d) Ciegos pilóricos e intestino completo.

5.6 Desempeño del crecimiento

Para evaluar el crecimiento de los organismos, en cada muestreo se llevó a cabo una biometría donde se registró la biomasa completa de cada tanque experimental y al final se estimó el peso promedio por pez con los siguientes indicadores:

5.6.1 Ganancia en peso

$$\text{Peso ganado (g pez}^{-1}\text{)} = \text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)} \quad (1)$$

5.6.2 Porcentaje (%) de peso ganado

$$\% \text{ Peso ganado (g pez}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}}{\text{Peso inicial (g)}} \times 100 \quad (2)$$

5.6.3 Coeficiente de crecimiento en unidades termales (TGC)

$$\text{TGC} = [(\text{PF}^{1/3} - \text{PI}^{1/3}) / (\text{T}^\circ \times \text{D})] * 100 \quad (3)$$

En donde:

PF= Peso final por pez (g)

PI= Peso inicial por pez (g)

T° = Temperatura (°C)

D= Número de días

5.7 Mortalidad

Se llevó el registro del número total de peces muertos durante las 8 semanas del experimento y se estimó el porcentaje de mortalidad con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Mortalidad} = (\text{No. de peces muertos} * 100) / \text{No. inicial de peces} \quad (4)$$

5.8 Eficiencia alimenticia

Se evaluaron el alimento consumido, la tasa de conversión alimenticia aparente (TCA), la tasa de eficiencia proteica (TEP) y la tasa de conversión proteica (TCP) calculadas con las siguientes fórmulas:

5.8.1 Alimento consumido

El protocolo de alimentación para el bioensayo fue de alimentar tres veces al día a saciedad aparente, por lo que se registró el total de alimento consumido cada 2 semanas y se dividió entre el número de peces (esto para cada tanque experimental) y al final de las 8 semanas se sumaron los cuatro registros del alimento utilizado para expresarlos en gramos de alimento consumido por pez.

5.8.2 Tasa de conversión alimenticia aparente

$$TCA = \frac{\text{Peso seco del alimento consumido por pez (g)}}{\text{Peso húmedo ganado por pez (g)}} \quad (4)$$

5.8.3 Tasa de eficiencia proteica

$$TEP = \frac{\text{Peso húmedo ganado por pez (g)}}{\text{Proteína consumida por pez (g)}} \quad (5)$$

5.8.4 Tasa de conversión proteica

$$TCP = \frac{\text{Proteína corporal final} - \text{proteína corporal inicial (g)}}{\text{Proteína consumida (g)}} \times 100 \quad (6)$$

5.9 Análisis de composición proximal

Para este análisis se evaluó tanto la composición proximal del tejido muscular de los juveniles de jurel (al final del experimento), así como de las diferentes dietas utilizadas en el bioensayo.

El análisis proximal de los componentes se realizó a través de la metodología descrita en el manual de métodos oficiales de análisis de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 2011 por sus siglas en inglés). La proteína cruda se estimó por el método micro-Kjeldahl.; los lípidos, por el método de Goldfish; la humedad de las dietas se calculó al secar las muestras durante 24 horas a 100°C, mientras que para el tejido muscular se requirieron 36 horas a 60°C; finalmente, las cenizas se estimaron mediante la incineración de la materia orgánica por 4 horas a 550°C en una mufla (marca Lindeberg/Blue M, modelo BF51842PBFMC-1).

5.10 Capacidad digestiva

Para evaluar el efecto del prebiótico sobre la capacidad digestiva de los juveniles de jurel, se estimó la actividad enzimática de las principales enzimas digestivas (tripsina, lipasa y amilasa) del intestino.

5.10.1 Preparación de extractos enzimáticos

Para obtener el homogenizado enzimático fue necesario preparar el buffer trizma de acuerdo con la metodología de Erlanger *et al.* (1961); con el intestino de cada pez muestreado después de su disección, se procedió a pesar cada intestino en una balanza (Precisa 92SM-202A) para luego colocarlo dentro de un tubo cónico (marca Corning) para centrifuga de capacidad de 50 ml y homogenizar el órgano completo en el buffer con el homogenizador (marca Polytron, Kinematica AG, System PT1200C)

durante un minuto, el tubo se mantuvo sumergido en hielo durante todo el proceso. La cantidad de buffer necesario, para homogenizar cada intestino se definió de acuerdo al peso (g) del órgano y se tomó como referencia una relación de 1:10 (intestino:buffer). El tiempo de centrifugación fue de 30 minutos a 16000 g y a temperatura de 4°C en una centrifuga marca Eppendorf 5810R. Una vez transcurrido el tiempo de centrifugación, se tomaron alícuotas de 1 mL del sobrenadante y se cubrieron con papel parafilm para su posterior resguardo en el ultra congelador a -80°C.

5.10.2. Actividad de la tripsina

Para evaluar la actividad de la tripsina, ésta se cuantificó a través de una técnica espectrofotométrica, de acuerdo al método sugerido por Erlanger *et al.* (1961). En este método se utilizó como sustrato N α -Benzoil-dl-Arginina-P-nitroanilida (BAPNA) a 0.001M disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) en una solución amortiguadora pH 8.2 de Tris-HCl a 0.05 M, con CaCl₂ a 0.02M. La técnica fue ajustada para ser leída en un lector de microplacas (marca Thermo Scientific VarioskanFlash versión 4.00.53). Para esto, se utilizaron 10 μ L de extracto enzimático (homogenizado), 25 μ L de agua destilada y 150 μ L de sustrato, cada muestra se realizó por triplicado. Asimismo, se colocaron triplicados de un blanco (35 μ L agua destilada + 150 μ L de sustrato) y triplicados de un control negativo (10 μ L muestra + 30 μ L ácido acético al 30% + 25 μ L agua destilada + 150 μ L de sustrato, siguiendo este orden). Las muestras se dejaron incubar en un lector de microplaca durante 10 minutos a 25°C, a diferencia de lo que propone Erlanger *et al.* (1961) en relación a la temperatura de incubación para mamíferos que son 37°C. Posteriormente la reacción se detuvo con 30 μ L de ácido acético al 30% dejando actuar durante 15 minutos más. Finalmente, se registró la lectura de la absorbancia a 410 nm.

5.10.3 Actividad de la lipasa

Para evaluar la actividad de la lipasa dependiente de sales biliares se utilizó una técnica espectrofotométrica, de acuerdo al método descrito por Gjellesvik *et al.* (1992) se

empleó como sustrato 4-nitrofenil-miristato (4-NPM) a 0.56mM en una solución amortiguadora pH 8.5 de Tris-HCl a 0.15 M y taurocolato de sodio a 15 mM. El método consistió en agregar 20 μ L de muestra de extracto enzimático en celdas para espectrofotómetro de 2.5 ml que previamente fueron colocadas en baño maría a 37°C. Enseguida se agregaron 700 μ L de la solución amortiguadora y se dejó equilibrar la reacción durante tres minutos exactos. Se realizó la lectura de la absorbancia a 405 nm en el espectrofotómetro de celdas (marca Hach, modelo DR-5000) y ese dato se registró como la lectura al tiempo 0. Las celdas se dejaron incubar en el baño maría y se realizaron lecturas a los 10, 20 y 30 minutos. De forma similar, se corrió un blanco con agua destilada en lugar de extracto enzimático y un control comercial de lipasa pancreática porcina (1mg/ml). Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

5.10.4 Actividad de la amilasa

Para evaluar la actividad de la amilasa, se utilizó una técnica espectrofotométrica, de acuerdo al método descrito en el manual de enzimas de Worthington (Worthington, K., and Worthington, V., Eds., 1993). En este método se empleó como sustrato almidón al 1%, en solución amortiguadora fosfato de sodio a 0.02 M, pH 6.9 con 0.006 M de Cloruro de sodio así como ácido dinitrosalicílico como reactivo color. La técnica consistió en colocar 100 μ L de extracto enzimático en tubos de cristal de 4 mL, se dejaron incubar en baño maría a 25°C por 4 minutos para llevar a la temperatura de equilibrio. Enseguida, se agregaron 100 μ L de solución de almidón 1% a cada uno de los tubos teniendo especial cuidado de tomar intervalos de tiempo para controlar que cada uno se incubara durante tres minutos exactos. Inmediatamente después, se agregaron 200 μ L de ácido dinitrosalicílico y se incubaron en baño maría a una temperatura de 100° por cinco minutos. Posteriormente, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 10 mL de agua destilada y se agitó. De cada tubo se tomaron 2 mL y se depositaron en celdas para espectrofotómetro, finalmente las lecturas de la absorbancia se realizaron a 540nm. Todos los ensayos se efectuaron por

triplicado y con un respectivo blanco que usó agua destilada en lugar de extracto enzimático.

5.10.5 Actividad total y actividad específica

La actividad de las enzimas digestivas, la tripsina, la amilasa y la lipasa, se reportó como Actividad Total ($U\text{ pez}^{-1}$) y Actividad Específica ($U\text{ mg}^{-1}\text{ Proteína}$), donde una U de actividad enzimática se definió como el incremento de 1.0 unidades de absorbancia por minuto.

Por lo anterior la actividad total se calculó de la siguiente manera:

$$U\text{ pez}^{-1} = (\Delta\text{Abs}/\text{TI}) * (\text{Vol. TH} / \text{Vol. M}) * (\text{Vol. T.R.} / \text{Vol. M}) * (1 / \text{Coef. Ext}) \quad (8)$$

Donde:

ΔAbs = Incremento en absorbancia

TI= Tiempo de incubación (minutos)

Vol. T.H.= Volumen total de homogenizado o extracto enzimático (ml)

Vol. M. = Volumen de la muestra (ml)

Vol. T. R.= Volumen total de la reacción (ml)

Coef. Ext.= 1.0 Unidades de absorbancia por minuto

Por otra parte, para calcular la actividad específica de cada una de las tres enzimas, fue necesario cuantificar previamente la concentración de proteína soluble del extracto enzimático. Dicha proteína se cuantificó de acuerdo al método de Bradford con un kit comercial Quick Star™ Bradford Protein Assay con albúmina bovina como estándar. Una vez que se obtuvo el dato de la proteína soluble, la actividad específica se calculó

dividiendo el valor de la actividad total entre la proteína soluble y se expresó como U mg⁻¹ de proteína.

5.11 Respuesta inmune no específica

5.11.1 Estallido respiratorio

Para evaluar el estallido respiratorio, se empleó el método descrito por Ibrahim *et al.* (2010) en donde se utilizó como sustrato Nitroazul de tetrazolio (NBT, por sus siglas en inglés, Sigma-Aldrich, CAS 298-83-9). En una microplaca de titulación, se colocaron 100µL de NBT a 0.2% en cada pozo y enseguida se agregaron 100µL de cada una de las muestras de sangre con anticoagulante (tubos heparinizados). La mezcla se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se tomó una alícuota de 50µL de esta solución de sangre y NBT que se colocó dentro de un tubo eppendorf para luego agregarle 1mL de N,N-dimetilformamida. Posteriormente cada tubo se llevó a la centrifuga (marca Eppendorf 5417R) durante 5 minutos a 3000 rpm y a una temperatura de 25°C. Finalmente se tomaron 600µL del sobrenadante y se depositaron en celdas de cuarzo para su lectura en un espectrofotómetro (marca Hach, modelo DR 6000) a 620 nm.

5.11.2 Proteínas totales en suero

Las proteínas solubles totales en suero se evaluaron cuantitativamente *in vitro* con un kit comercial de la marca RANDOX basado en el método de Biuret. El fundamento de este método consiste en que los iones cúpricos, en un medio alcalino, interactúan con los enlaces peptídicos de las proteínas solubles para formar un complejo coloreado. De acuerdo con el procedimiento descrito en el kit comercial, se utilizaron 20 µL de suero, los cuales se depositaron en celdas plásticas de 1.5 mL y enseguida se agregaron 1000µL de Reactivo Biuret (R1: hidróxido sódico, tartrato sodio-potasio, yoduro potásico

y sulfato cúprico) y se mezcló. Se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente (entre 20-25°C) y al final se llevaron las celdas a su lectura en el espectrofotómetro (marca Hach, modelo DR5000) a 546 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado y tal como lo indica el kit, se trabajó al mismo tiempo con una muestra de proteína patrón. De esta manera, la concentración de proteínas totales se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Conc. de Prot. Tot.} = (\text{Abs}_{\text{muestra}} / \text{Abs}_{\text{patrón}}) \times \text{Conc. Patrón}^* \quad (9)$$

*El dato de la concentración de la proteína patrón fue proporcionado por el kit comercial, el cual está expresado en g/dl.

5.11.3 Recuento total de leucocitos

Para el recuento de leucocitos totales, se siguió el método de tinción de Natt-Herrick con la muestra de sangre. Esta técnica requirió la preparación de una dilución 1:200 de la muestra inicial. Por lo tanto, se colocaron 20µL de la muestra de sangre con anticoagulante en 4mL del colorante Natt-Herrick depositado previamente en un frasco de vidrio con rosca de 6 mL de capacidad; se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente durante cinco minutos. Posteriormente, con una pipeta Pasteur se agregó una gota a cada lado del hematocitómetro y se dejó sedimentar la muestra por otros cinco minutos para finalmente proceder a realizar el recuento en un microscopio compuesto (marca Leica DMSL). El recuento se realizó en ambas zonas de la cámara y en los ocho cuadros más grandes de los extremos superior e inferior de la cámara (Natt-Herrick, 1952, citado por Del Río-Zaragoza, 2004). De esta manera el número de leucocitos se calculó de la siguiente manera:

$$\text{No. de leucocitos } \mu\text{l}^{-1} = \frac{\text{Total de No. de leucocitos contados}}{8} \times 200 \quad (10)$$

5.12 Análisis Estadístico

Inicialmente se llevó a cabo la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de los datos. Cuando no se cumplió la normalidad, entonces se realizó la transformación logarítmica de los mismos. De igual manera, los datos expresados en porcentaje se transformaron desde un inicio con la función arcoseno (Steel y Torrie 1988). Para los datos de crecimiento y enzimas, a partir del Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) Bifactorial 2x2, se realizó un Análisis de Varianza ANOVA de dos vías, con una significancia estadística $P \leq 0.05$; mientras que para los datos de respuesta inmune no específica se realizó un ANOVA factorial (2x2x5) con una significancia estadística $P \leq 0.05$.

En aquellos casos donde se detectó interacción entre los factores, se ignoraron los efectos independientes de cada factor y se realizaron comparaciones múltiples al utilizar la prueba post hoc de mínima diferencia significativa (LSD, por sus siglas en inglés) con una significancia estadística $P \leq 0.05$, para observar la relación de dependencia entre los factores. En caso de no haber interacción entre los factores, pero sí se detectaron diferencias entre los efectos principales, éstos se consideraron y se realizó una prueba post hoc de Tukey con una significancia estadística $P \leq 0.05$. Se comprobaron los supuestos de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene (Bowyer *et al.*, 2013).

Los análisis antes mencionados se llevaron a cabo utilizando el programa STATISTICA® versión 8.0.

Capítulo 6. Resultados

6.1 Crecimiento

Como se puede observar en la (Tabla 2) no se encontraron diferencias significativas en el peso final (g/pez) entre los peces de los diferentes tratamientos. No obstante, en el peso ganado (Figura 4) y el porcentaje de peso ganado (Figura 5) se encontraron diferencias significativas como resultado del efecto del prebiótico. De igual manera, es posible observar en la Figura 6 que el TGC (Coeficiente de crecimiento en unidades termales) también resultó con diferencias significativas entre los tratamientos como efecto de la inclusión del prebiótico. En ninguno de los indicadores hubo efecto de la interacción entre ambos factores (Harina * Prebiótico).

Tabla 2. Indicadores de crecimiento para cada uno de los tratamientos. Los valores indican la media \pm Desviación estándar (D.E.).

	Tratamiento				P ANOVA		
	HPSP	HPCP	HSSP	HSCP	H	P	H x P
Peso Inicial (g/pez)	97.5 \pm 3.5	96.0 \pm 1.5	99.6 \pm 1.3	98.5 \pm 0.8	ns	ns	ns
Peso Final (g/pez)	222.4 \pm 21.3	257.4 \pm 35.1	239.8 \pm 7.6	264.1 \pm 11.5	ns	ns	ns
Peso Ganado (g/pez)	124.9 \pm 18.5	161.4 \pm 33.6	140.2 \pm 6.4	165.6 \pm 10.7	ns	*	ns
Peso Ganado (%)	127.9 \pm 15.9	167.9 \pm 32.3	140.7 \pm 4.7	168.1 \pm 9.4	ns	*	ns
TGC	0.11 \pm 0.01	0.13 \pm 0.02	0.12 \pm 0.00	0.14 \pm 0.01	ns	*	ns
% Mortalidad	6.7	13.3	6.7	6.7	ns	ns	ns

HP SP: Harina de Pescado Sin Prebiótico; HP CP: Harina de Pescado Con Prebiótico; HS SP: Harina de Pescado y Soya Sin Prebiótico; HS CP: Harina de Pescado y Soya Con Prebiótico; TGC: Coeficiente de Crecimiento en Unidades Termales.

H: Harina; P: Prebiótico; H x P: interacción Harina x Prebiótico.

Nivel de significancia (α): * P<0.05; ns= no significativo

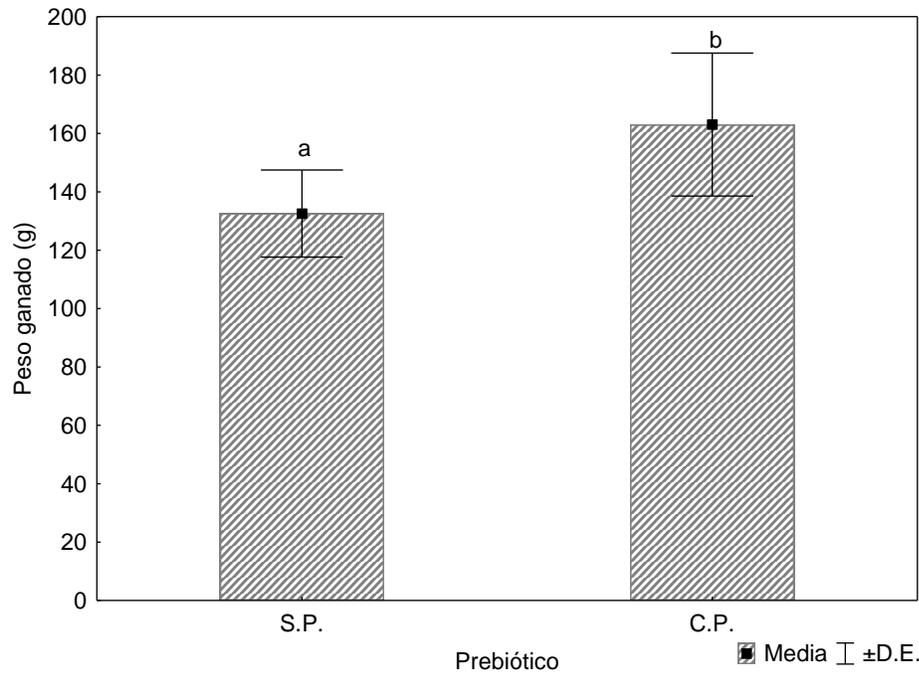


Figura 4. Peso ganado (g/pez) de los juveniles de jurel (*Seriola lalandi*) obtenido como efecto de la inclusión del prebiótico en la dieta. Donde SP: sin prebiótico y CP: con prebiótico. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

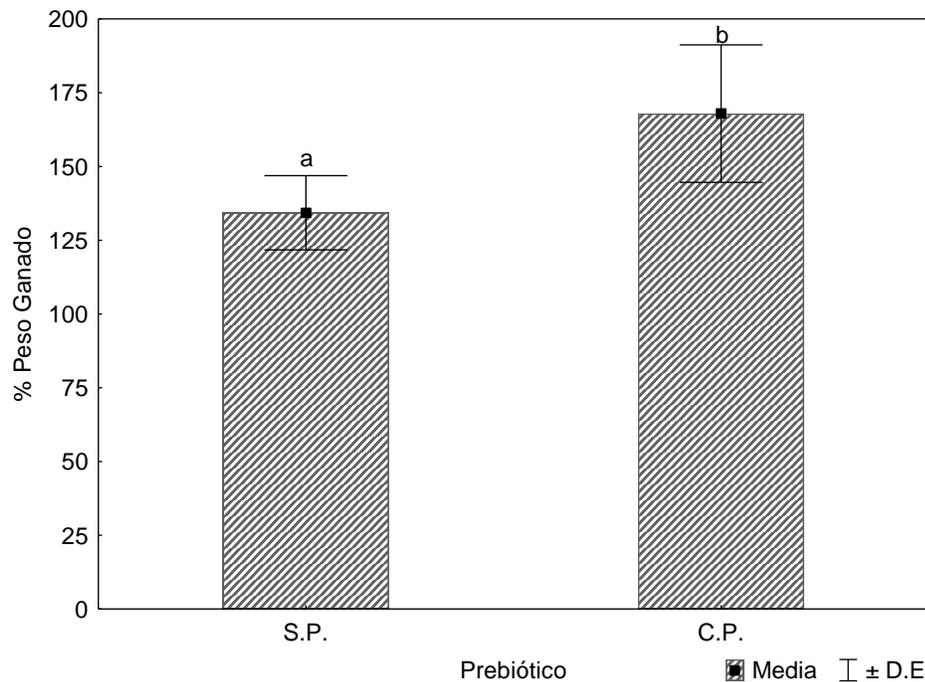


Figura 5. Porcentaje de peso ganado (%) de los juveniles de jurel (*Seriola lalandi*) obtenido como efecto la inclusión del prebiótico en la dieta. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

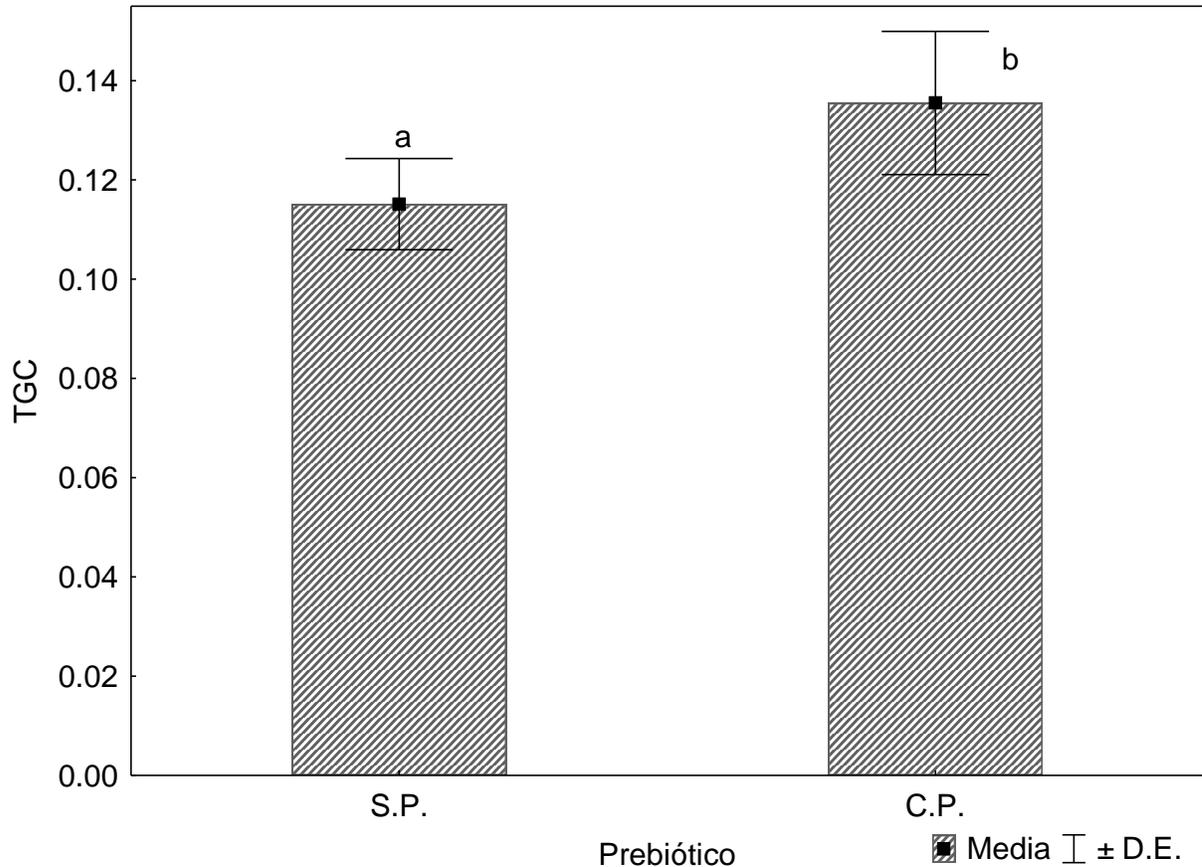


Figura 6. Coeficiente de crecimiento en unidades termales (TGC) de los juveniles de jurel (*Seriola lalandi*) obtenido como efecto de la inclusión del prebiótico en la dietas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

6.2 Mortalidad

No resultaron diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad entre los cuatro tratamientos. Al final del experimento, el porcentaje de mortalidad fue de 13.3% para el tratamiento de HPCP, mientras que para el resto de los tratamientos fue de 6.7% (Tabla 2).

6.3 Eficiencia alimenticia

Con relación a la cantidad de alimento consumido por pez, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 3). Sin embargo, como se percibe

en la Figura 7, la tasa de conversión alimenticia (TCA) resultó con diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, en donde se observó un efecto del prebiótico, es decir, las dietas con inclusión de prebiótico tuvieron tasas de conversión más bajas en comparación con las que no lo incluyeron. En contraste, para los indicadores de la utilización de la proteína, es decir, tasa de eficiencia proteica (TEP) y tasa de conversión proteica (%TCP) no se presentaron diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, sin embargo, en la TEP se puede observar una tendencia más alta en las dietas con prebiótico.

Tabla 3. Indicadores de eficiencia alimenticia para cada uno de los tratamientos. Los valores indican la media \pm D.E. Superíndices distintos indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

	Tratamiento				P ANOVA		
	HPSP	HPCP	HSSP	HSCP	H	P	H x P
Alimento consumido (g)/pez	189.3 \pm 15.9	218.0 \pm 32.9	208.0 \pm 9.3	220.4 \pm 17.9	ns	ns	ns
TCA	1.53 \pm 0.12	1.36 \pm 0.13	1.49 \pm 0.08	1.33 \pm 0.02	ns	*	ns
TEP	1.45 \pm 0.11	1.57 \pm 0.14	1.38 \pm 0.08	1.52 \pm 0.03	ns	ns	ns
% TCP	61.6 \pm 5.0	62.1 \pm 4.9	54.5 \pm 2.8	60.0 \pm 1.4	ns	ns	ns

TCA: Tasa de Conversión Alimenticia; TEP: Tasa de Eficiencia Proteica; % TCP: Tasa de Conversión Proteica.

H: Harina; P: Prebiótico; H x P: interacción Harina x Prebiótico.

Nivel de significancia (α): * $P < 0.05$; ns= no significativo

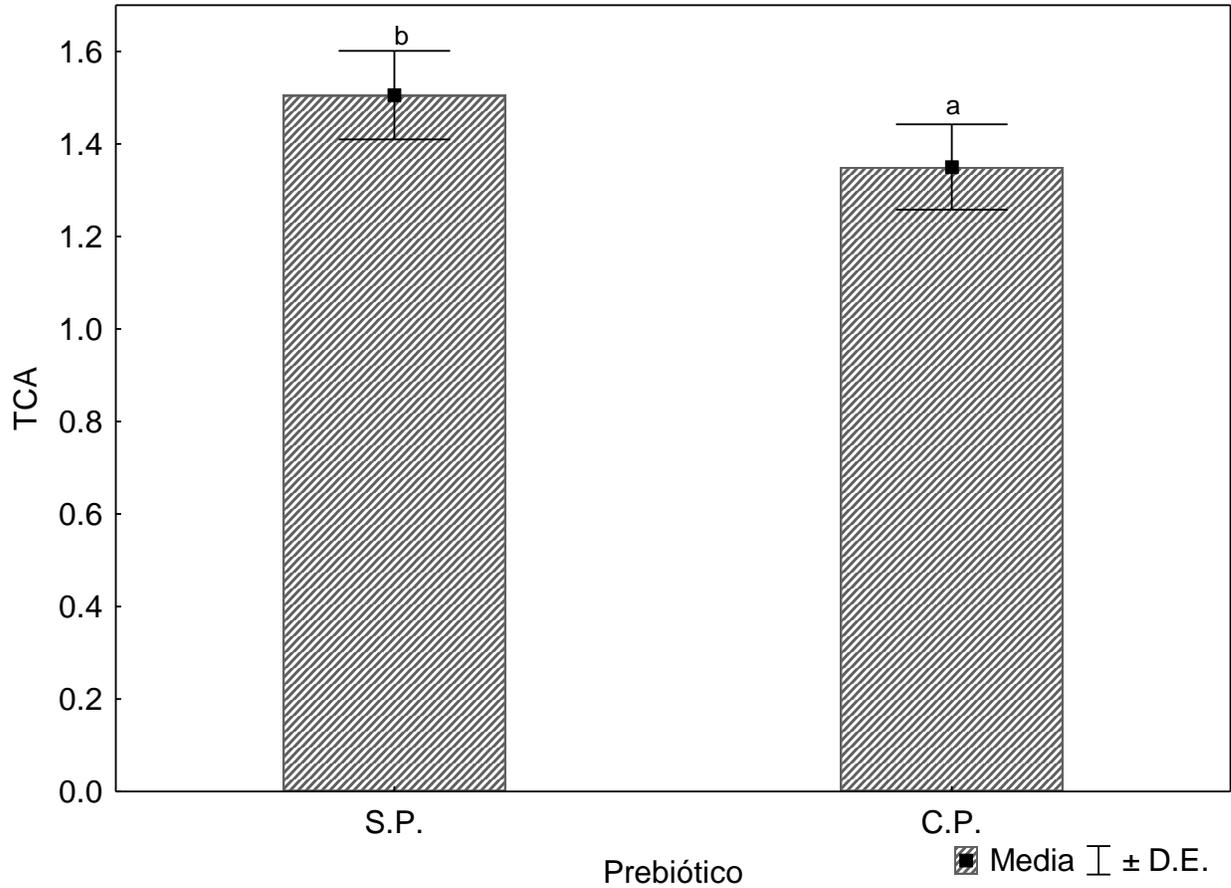


Figura 7. Tasa de conversión alimenticia aparente (TCA) de los juveniles de jurel (*Seriola lalandi*) obtenida como efecto de la inclusión del prebiótico en la dieta. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

6.4 Composición proximal del músculo

Para establecer un punto de referencia en cuanto a la composición proximal del músculo de juveniles de jurel (*Seriola lalandi*), se analizaron muestras de este tejido al inicio del experimento (Tabla 4).

Tabla 4. Composición proximal del músculo de juveniles jurel (*Seriola lalandi*) al inicio del experimento (día cero). Los valores indican la media \pm D.E.

% Proteínas	% Lípidos	% Humedad	% Cenizas
86.70 \pm 0.79	1.73 \pm 0.12	74.97 \pm 0.10	7.64 \pm 0.62

Las muestras analizadas del tejido muscular de los organismos al finalizar el experimento (Tabla 5) resultaron con diferencias significativas entre los tratamientos. Se encontró que el porcentaje de proteínas en músculo fue significativamente más alto en el tratamiento de Harina de Pescado sin prebiótico (HPSP) mientras que entre el resto de los tratamientos no hubo diferencias significativas. De igual manera, se presentaron diferencias muy significativas entre el contenido de cenizas en músculo, de manera que los tratamientos de Harina de Pescado y Soya (HSSP y HSCP) fueron más altos en comparación con los tratamientos de Harina de Pescado (HPSP y HPCP).

Tabla 5. Composición proximal del músculo de juveniles de jurel (*Seriola lalandi*) alimentados durante 8 semanas con los cuatros tratamientos experimentales. Los valores indican la media \pm D.E. Superíndices distintos indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

	Tratamiento				P ANOVA		
	HPSP	HPCP	HSSP	HSCP	H	P	H x P
% Proteínas *	89.9 \pm 1.0 ^a	86.8 \pm 0.4 ^b	86.2 \pm 0.8 ^b	86.3 \pm 0.4 ^b	**	*	*
% Lípidos	2.5 \pm 0.3	2.8 \pm 0.7	2.4 \pm 0.1	3.2 \pm 0.7	ns	ns	ns
% Humedad	73.8 \pm 0.2	73.4 \pm 0.1	73.5 \pm 0.5	73.2 \pm 0.2	ns	ns	ns
% Cenizas	8.1 \pm 0.5 ^a	7.3 \pm 0.2 ^a	8.9 \pm 0.7 ^b	9.2 \pm 0.7 ^b	**	ns	ns

H: Harina; P: Prebiótico; H x P: interacción Harina x Prebiótico.

Nivel de significancia (α): * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns= no significativo

(*) Los superíndices se establecieron como efecto de la interacción Harina x Prebiótico.

6.5 Capacidad digestiva

6.5.1 Actividad de la tripsina

Como se observa en la Tabla 6, al cuantificar la actividad de la tripsina, expresada en Actividad total (U/pez) y Actividad específica (U mg⁻¹P), no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 6. Actividad de la tripsina expresada como Actividad Total (U/pez) y Actividad específica (U mg⁻¹P) en juveniles de jurel (*Seriola lalandi*) alimentados con las cuadro dietas experimentales. Los valores indican la media \pm D.E.

Tripsina	Tratamiento				P ANOVA		
	HPSP	HPCP	HSSP	HSCP	H	P	H x P
Act. total (U/pez)	1040.0 \pm 117.2	443.5 \pm 183.6	610.4 \pm 583.2	1049.1 \pm 844.0	ns	ns	Ns
Act. específica (U mg ⁻¹ P)	20.0 \pm 3.9	7.4 \pm 4.4	14.0 \pm 15.7	16.9 \pm 10.2	ns	ns	ns

H: Harina; P: Prebiótico; H x P: interacción Harina x Prebiótico.
Nivel de significancia: ns= no significativo

6.5.2 Actividad de la lipasa

En relación a la actividad de la lipasa (Tabla 7) la actividad total (U/pez) no resultó en diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, sí se presentaron diferencias significativas con relación a la actividad específica (U mg⁻¹P) de esta enzima entre los diferentes tratamientos. Asimismo se encontró una interacción significativa entre el tipo de harina y el prebiótico, es decir, en las dietas de harina de pescado con adición del prebiótico se incrementó significativamente la actividad específica de la lipasa mientras que al incluir harina de soya no se observó efecto (Figura 8).

Tabla 7. Actividad de la lipasa expresada como Actividad Total (U/pez) y Actividad específica (U mg⁻¹P) en juveniles de jurel (*Seriola lalandi*) alimentados con las cuadro dietas experimentales. Los valores indican la media \pm D.E. Superíndices distintos indican diferencia significativa (P<0.05).

Lipasa	Tratamiento				P ANOVA		
	HPSP	HPCP	HSSP	HSCP	H	P	H x P
Act. total (U/pez)	1470.5 \pm 140.8	2504.7 \pm 727.8	2233.5 \pm 464.9	2308.5 \pm 417.4	ns	ns	ns
Act. específica (U mg ⁻¹ P) ^a	28.1 \pm 2.5 ^{a,x}	37.6 \pm 0.7 ^{a,y}	42.2 \pm 6.5 ^{b,z}	40.5 \pm 3.4 ^{b,z}	**	ns	*

H: Harina; P: Prebiótico; H x P: interacción Harina x Prebiótico.

Nivel de significancia (α): * P<0.05; **P<0.01; ns= no significativo

(*) La colocación de los superíndices considera únicamente el efecto de la interacción entre ambos factores.

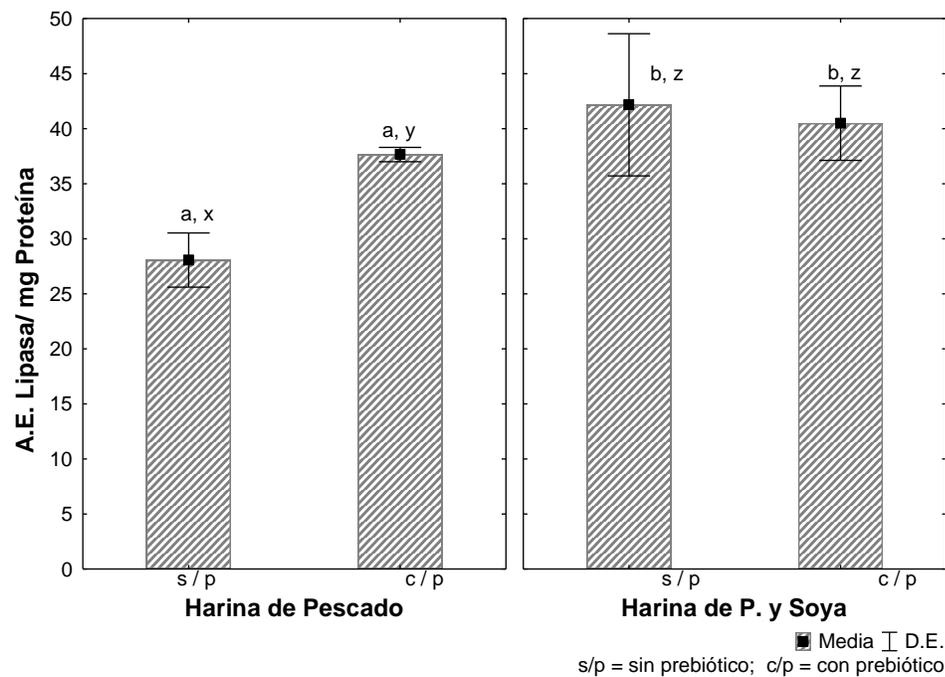


Figura 8. Actividad específica (U mg⁻¹P) de la lipasa en juveniles de jurel (*Seriola lalandi*) alimentados con las cuadro dietas experimentales. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

6.5.3 Actividad de la amilasa

Al igual que la actividad de la tripsina, la actividad de la amilasa no se vio afectada ni por el tipo de harina ni por el prebiótico, de forma tal que no se presentaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos tanto para la actividad total como para la actividad específica (Tabla 8).

Tabla 8. Actividad de la amilasa expresada como Actividad Total (U/pez) y Actividad específica (U mg⁻¹P) en juveniles de jurel (*Seriola lalandi*) alimentados con las cuatro dietas experimentales. Los valores indican la media \pm D.E.

Amilasa	Tratamiento				P ANOVA		
	HP SP	HP CP	HS SP	HS CP	H	P	H x P
Act. total (U/pez)	242.0 \pm 39.9	330.6 \pm 15.7	315.7 \pm 81.6	387.5 \pm 228.8	ns	ns	Ns
Act. específica (U mg ⁻¹ P)	4.7 \pm 1.0	5.2 \pm 1.1	5.9 \pm 0.6	7.0 \pm 2.2	ns	ns	Ns

H: Harina; P: Prebiótico; H x P: interacción Harina x Prebiótico.

Nivel de significancia: ns= no significativo **6.6 Respuesta inmune no específica**

6.6.1 Estallido respiratorio

En lo que corresponde al estallido respiratorio (Figura 9), al día 14 el tratamiento de HPSP (Harina de pescado sin prebiótico) los valores registrados incrementaron significativamente con respecto de la dieta de HPCP (Harina de pescado con prebiótico), mientras que las dietas de HS (Harina de pescado y soya) no presentaron diferencias con las anteriores. Sin embargo, al día 28 la tendencia de los valores de la respuesta del estallido respiratorio fue a disminuir ligeramente, pero esto no resultó en diferencias entre los cuatro tratamientos. No obstante al día 42, los tratamientos de HS descendieron significativamente en relación a los de HP. Finalmente en el último muestreo, al día 56 la tendencia de los valores fue a regresar a los valores cercanos al día cero.

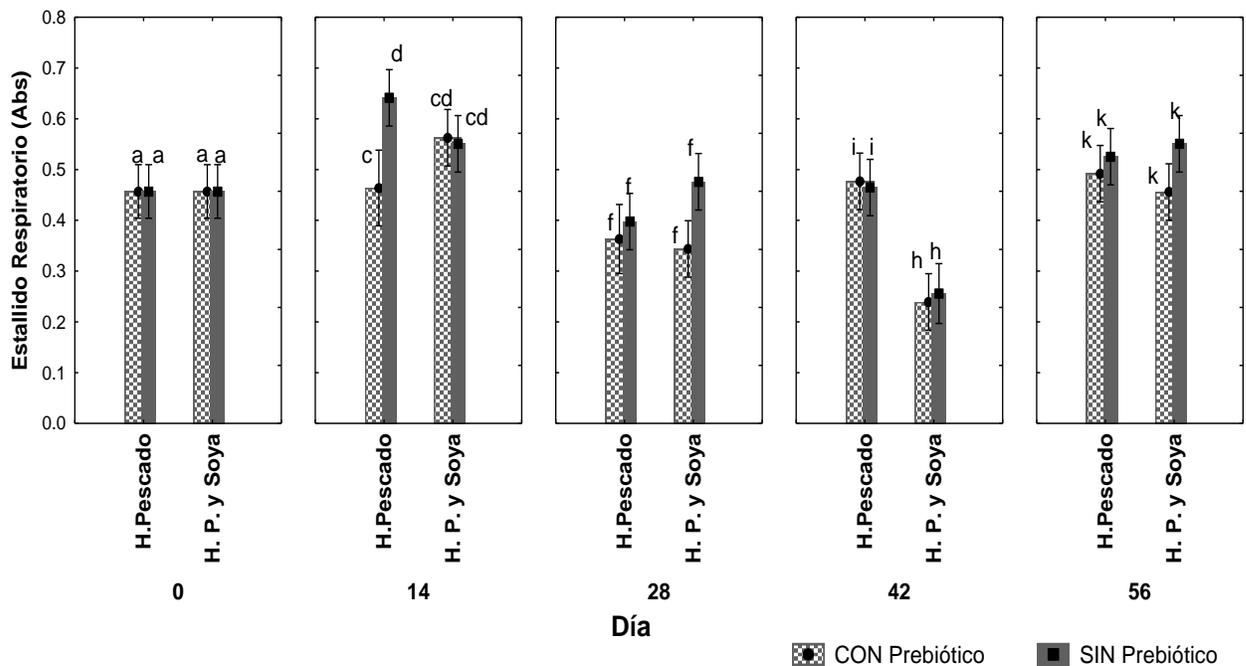


Figura 9. Estallido respiratorio (Abs) en juveniles de jurel (*Seriola lalandi*) observado a través del tiempo (días) para los cuatro tratamientos experimentales. Los valores indican la media \pm D.E. Letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0.05$)

6.6.2 Proteínas totales en suero

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas totales en suero entre los tratamientos con y sin prebióticos, así como con y sin harina de soya. La concentración de proteínas totales (Figura 10) presentó diferencias altamente significativas a través del tiempo, de forma que la tendencia fue a incrementar conforme transcurrían los días del bioensayo. Así mismo no se encontró una interacción entre las variables evaluadas. Tal y como se observa en la figura 7, en los muestreos del día 0 y día 14 la concentración fue de 3.7 ± 0.7 y 3.6 ± 0.5 g/dL respectivamente, mientras que en el muestreo final se presentó la concentración de 4.7 ± 0.8 g/dL más alta de proteínas totales en suero. A pesar de lo anterior, no hubo como tal un efecto ni del tipo de harina ni de la adición del prebiótico, ya que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos en cada uno de los muestreos.

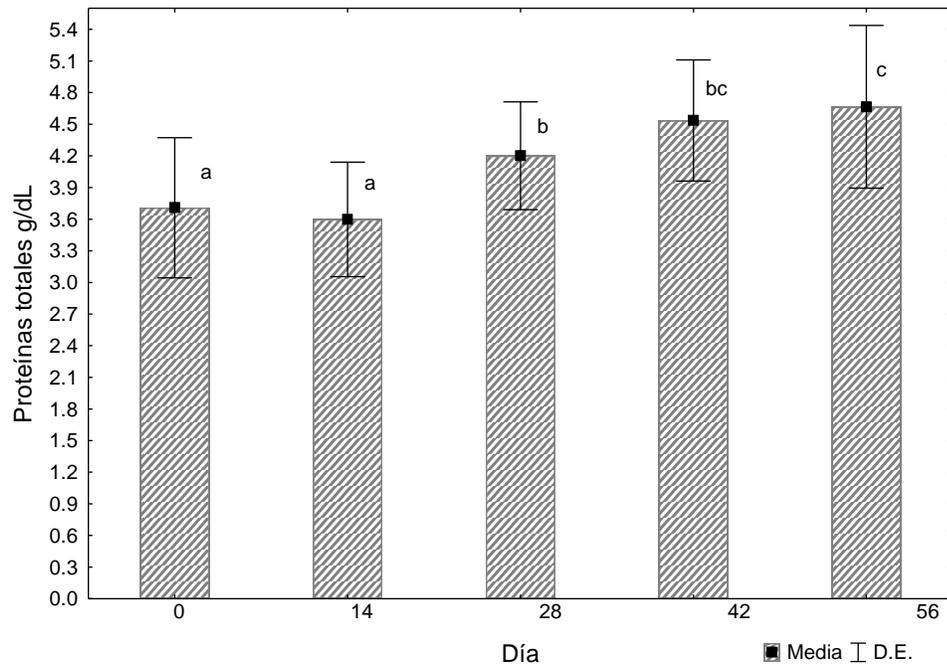


Figura 10. Concentración de proteínas totales en suero (g/dL) en juveniles de jurel (*Seriola lalandi*) a través del tiempo (días). Letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0.05$)

6.6.3 Recuento total de leucocitos

En lo referente al recuento total de leucocitos (Figura 11), a pesar de que al día 42 no hubo diferencias significativas entre los cuatro tratamientos, los valores obtenidos tendieron a incrementar significativamente con respecto a los valores del día cero, además de que este fue el muestreo con el mayor recuento de células blancas. Sin embargo, al finalizar el experimento, al día 56, el recuento descendió en todos los tratamientos y solamente los peces que recibieron la dieta sin prebiótico mantuvieron los valores similares a los del día 0, mientras que los tratamientos con prebiótico disminuyeron significativamente. Asimismo no se encontró una interacción entre las variables evaluadas.

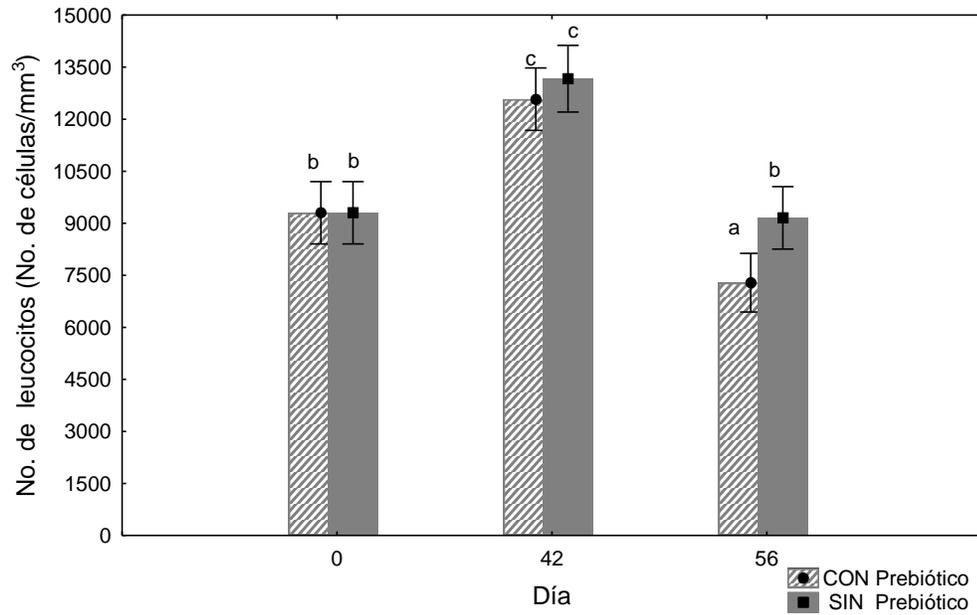


Figura 11. Recuento total de leucocitos (No. cél/mm³) en juveniles de jurel (*Seriola lalandi*) como efecto de la inclusión del prebiótico a través del tiempo (días). Los valores indican la media \pm D.E. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

Capítulo 7. Discusión

7.1 Crecimiento

En la búsqueda por mejorar el rendimiento de los cultivos acuícolas en diversos aspectos tanto del crecimiento, la eficiencia alimenticia y la resistencia a enfermedades, en los últimos años la investigación se ha enfocado a encontrar ingredientes que puedan sustituir a la harina de pescado y a evaluar ciertos aditivos alimenticios suplementados en la dieta tales como prebióticos, probióticos e inmunoestimulantes (Ganguly *et al.*, 2012).

Con base en lo anterior, en el presente estudio se formularon dietas isoproteicas e isolipídicas para juveniles de jurel (*Seriola lalandi*) en las cuales se evaluó la suplementación en dieta del prebiótico comercial GroBiotic®-A 2%, así como la sustitución parcial de harina de pescado por harina de soya (25%) sobre los parámetros de crecimiento, la capacidad digestiva y la respuesta inmune no específica.

Los resultados del presente estudio indican que la inclusión en la dieta del prebiótico comercial GroBiotic®-A al 2% incrementa significativamente la ganancia en peso y el coeficiente de crecimiento en unidades termales (TGC, por sus siglas en inglés) luego de 8 semanas de alimentación. Lo anterior, es consistente con lo reportado por Li y Gatlin (2005), quienes evaluaron el efecto de GroBiotic®-A al 2% sobre el crecimiento y la respuesta inmune no específica en subadultos del híbrido de la lobina rayada (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) con un peso promedio de 64g y expuestas a una infección crónica causada por *Mycobacterium marinum* luego de 16 semanas de alimentación. Finalmente, los autores mencionan que hubo un incremento significativo en la ganancia en peso en la dieta con probiótico a las 12 semanas del experimento en comparación con la dieta basal sin prebiótico.

Igualmente, en un estudio realizado en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) de un peso promedio de 18.0g, durante 8 semanas, Zheng *et al.* (2011) evaluaron dietas subóptimas con un contenido de proteína cruda PC de 29% (comparado con un contenido de 33% de la dieta de referencia) y suplementadas con tres niveles de

prebiótico (GroBiotic®-A al 0, 0.4, 0.8 y 1.2%). Los autores mencionan que en aquellas dietas suplementadas al 0.8 y 1.2%, la ganancia en peso a las 4 y 8 semanas incrementó significativamente ($P < 0.05$) comparado con la dieta sin prebiótico, no obstante, no hubo diferencias con respecto a la dieta de referencia (33% PC), lo que muestra cómo el prebiótico mejoró este parámetro en las dietas subóptimas en cuanto a contenido proteico.

En un bioensayo, Li y Gatlin 2004 evaluaron el efecto de GroBiotic®-A al 1 y 2% en combinación con levadura de cerveza en la dieta para el híbrido de lobina rayada (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) con un peso inicial promedio de 91g. En el primer experimento, el cual tuvo una duración de siete semanas evaluaron el crecimiento y la eficiencia alimenticia; y en el segundo, el cual tuvo una duración de cuatro semanas evaluaron además del crecimiento, los parámetros de la respuesta inmune no específica. En ambos experimentos no encontraron diferencias significativas en la ganancia en peso, sin embargo los autores señalan que en el primer experimento, los resultados tienden a ser mayores con el uso de prebiótico comparados con los otros tratamientos, por lo que destacan que los efectos del mismo se observan después de las siete semanas.

Asimismo, Buentello *et al.* (2010) trabajaron con juveniles de corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) con un peso inicial promedio de 10g, evaluaron por un período de 4 semanas el efecto de diferentes prebióticos (FOS, MOS, TOS y GroBiotic®-A al 1%) sobre el crecimiento, la respuesta inmune no específica y la eficiencia alimenticia. Los autores no encontraron diferencias significativas en la ganancia en peso. De manera similar, Rossi, Tomasso, y Gatlin (2015) en un estudio con juveniles avanzados de corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) con un peso promedio de 68g, cultivados en jaulas durante 15 semanas, evaluaron la sustitución de harina de pescado por harina de soya así como la adición de GroBiotic®-A al 2%, sin embargo, no encontraron diferencias significativas en la ganancia en peso entre los diferentes tratamientos.

Por otra parte, los resultados del presente trabajo indican que una sustitución del 25% de harina de pescado por harina de soya no compromete el crecimiento de los

organismos y por el contrario, tanto el peso ganado como el TGC tienen el mismo desempeño en las dietas con y sin harina de soya.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Buentello *et al.* (2015) quienes evaluaron en esta misma especie (*Seriola lalandi*) con peso inicial promedio de 4g, dos harinas de soya no modificadas genéticamente (una con alto contenido de proteína ACP y otra con contenido medio de proteína MCP), las cuales utilizaron para sustituir parcialmente a la harina de pescado (harina ACP en un 50, 60 y 70%; y harina MCP en un 40, 50 y 60% respectivamente) y las compararon con una dieta de referencia (de harina de pescado) y una de dieta control (dieta comercial). Luego de 10 semanas de alimentación, concluyen que la sustitución de harina de pescado por harina MCP en un 50 y 60% incrementó significativamente la ganancia en peso ($P < 0.01$) incluso más que las dietas de referencia y comercial; igualmente, la harina ACP en un 50% y la harina MCP en un 40% tuvieron el mismo rendimiento en ganancia en peso comparada con la dieta de referencia, incluso ligeramente mayor.

A pesar de que la harina de soya utilizada en este trabajo no fue tratada para eliminar anti-nutrientes y tenía un contenido proteico intermedio (47%), igualmente se obtuvieron buenos resultados, lo que sugiere que para esta especie se puede sustituir al menos un 25 % la harina de pescado sin afectar su crecimiento. Así mismo, es probable que conforme se retiren los anti-nutrientes de esta fuente de proteína vegetal, la proporción de harina de pescado puede ser sustituida aun más. Además, la adición del prebiótico a la dieta de referencia (100% harina de pescado como fuente de proteína) y a la dieta de reemplazo (Harina de pescado con harina de soya) potenció significativamente el efecto en el crecimiento, lo que podría indicar que el prebiótico tiene la capacidad de estimular la microflora intestinal benéfica, así como la digestibilidad de las dietas con harina de soya y aumentar la biodisponibilidad de sus componentes para que el organismo los aproveche mejor.

7.2 Eficiencia alimenticia

En torno a la tasa de conversión alimenticia (TCA), los resultados del presente estudio indican que la inclusión en la dieta del prebiótico comercial GroBiotic®-A al 2% mejora significativamente la TCA después de alimentar a los juveniles de jurel durante 8 semanas. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Zheng *et al.* (2011) quienes evaluaron dietas subóptimas con un contenido de proteína cruda PC de 29% (comparado con un contenido de 33% de la dieta de referencia) y suplementadas con tres niveles de prebiótico (GroBiotic®-A al 0, 0.4, 0.8 y 1.2%), en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) de peso de 18g, durante 8 semanas. Los autores señalan que en aquellas dietas suplementadas al 0.8 y 1.2% la TCA disminuyó (lo que es favorable) significativamente a las 4 semanas. Asimismo, a las 8 semanas reportaron una eficiencia alimenticia con el mismo efecto, lo anterior, comparado con la dieta sin prebiótico, aunque destacan que con respecto de a la dieta de referencia (33% PC) no hubo diferencias significativas, lo que demuestra cómo el prebiótico mejoró la TCA en las dietas subóptimas en cuanto a contenido proteico.

Resultados similares son reportados por Lochmann *et al.* (2011), quienes evaluaron el efecto de GroBiotic®-A al 2% así como de la dureza del agua sobre el crecimiento del piscardo de cabeza gorda (*Pimephales promelas*) con un peso inicial promedio de 0.34g, en un experimento que duró 8 semanas, donde reportan una disminución significativa de la TCA por efecto del prebiótico.

Por el contrario, Lochmann *et al.* (2010) evaluaron durante 7 semanas el efecto de GroBiotic®-A al 2% en la ganancia en peso y la conversión alimenticia de la carpita dorada (*Notemigonus crysoleucas*). Los autores reportan no haber encontrado diferencias significativas en la TCA de los tratamientos comparados con la dieta control que carecía del prebiótico.

De igual manera, Yousefian *et al.* (2012) en un bioensayo de 8 semanas con el rutilus (*Rutilus frisii kutum*) con un peso inicial promedio de 0.78g, evaluaron el efecto de GroBiotic®-A (1, 2 y 3%) sobre el crecimiento y parámetros bioquímicos del suero y

reportan que no hubo diferencias significativas en la TCA de los tratamientos comparados con el grupo control que no tuvo suplemento del prebiótico.

En relación al efecto de la sustitución parcial de harina de pescado por harina de soya en dietas para jurel, los resultados obtenidos de TCA difieren de lo reportado por Bowyer *et al.* (2013 a, 2013b) quienes evaluaron varias dietas con sustitución parcial de harina de pescado por concentrado de harina de soya y harina de soya extraída con solvente, en juveniles de jurel con peso inicial promedio de 22g. Los autores reportan valores de TCA menores que los obtenidos en este trabajo por lo que en dicho trabajo los juveniles requirieron menor cantidad de alimento para crecer. Asimismo, Buentello *et al.* (2015) evaluaron en juveniles de jurel con peso inicial promedio de 4g la sustitución de harina de pescado por harina de soya no modificada genéticamente y reportaron valores de TCA mayores que los de Bowyer *et al.*, (2013 a, 2013b) pero aun así menores que los del presente trabajo. En ambos estudios no hay diferencias significativas en la TCA comparada con la de la dieta control.

Una razón que pudiera ocasionar las diferencias en la TCA obtenidas en estos trabajos es la talla de los organismos, ya que a diferencia del presente estudio, los peces utilizados son juveniles más pequeños, por lo que su crecimiento es más rápido. Aunado a esto la calidad de la harina de soya también podría estar influyendo, ya que para este trabajo se utilizó harina de soya comercial, mientras que en el caso de Bowyer *et al.* (2013 a, 2013b) utilizan harina de soya extraída con solvente y concentrado de proteína de soya. A su vez Buentello *et al.*, (2015) utilizaron soya no modificada genéticamente y en ambos casos esas harinas de soya contienen menos anti-nutrientes que la soya comercial. Lo anterior, hace suponer que debido a la calidad de la fuente proteica, los organismos requirieron menos cantidad de alimento para alcanzar resultados similares a sus dietas control. No obstante, en este estudio, la TCA sí mejoró significativamente con respecto a las dietas sin el prebiótico.

En relación a la tasa de eficiencia proteica (TEP) y a la tasa de conversión proteica (TCP), los resultados de este trabajo muestran, que al no haber diferencias significativas entre los tratamientos, la sustitución parcial de harina de pescado (25%) por harina de soya, no afectó la utilización de la proteína, es decir, se produjeron

resultados similares en las dietas de harina de pescado comparadas con las dietas de harina de pescado y soya. Esto sugiere que la harina de soya comercial utilizada en el presente estudio es una fuente proteica alternativa para esta especie. Sin embargo, el prebiótico simplemente no tuvo efecto alguno en estos parámetros al sustituir las harinas.

Estos resultados coinciden con lo obtenido por Yousefian *et al.* (2012) en el bioensayo de 8 semanas con el rutilus (*Rutilus frisii kutum*) con un peso promedio inicial de 0.78g. Los autores evaluaron niveles de inclusión del prebiótico GroBiotic®-A (1, 2 y 3%) sobre el crecimiento y parámetros bioquímicos del suero y reportan que con respecto a la TEP, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos comparados contra la dieta control. De igual manera, Burr *et al.* (2009) evaluaron el efecto de los prebióticos GroBiotic®-A e inulina ambos al 1% sobre el crecimiento y la microbiota intestinal de la corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) con un peso inicial promedio de 15g. Los autores realizaron dos bioensayos, uno en donde la fuente de proteína fue de harina de pescado y otro donde hubo una sustitución parcial con harina de soya. En ambos bioensayos la suplementación de los prebióticos no alteró la ganancia en peso, la eficiencia alimenticia y la TEP, mientras que en el análisis de la microflora intestinal ésta tampoco mostró cambios debidos al prebiótico ya que en el análisis de electroforesis en gel, sólo se observó el dominio de un organismo y muy baja diversidad.

Contrario a lo obtenido en el presente estudio, Bowyer *et al.*, (2013 a, 2013b) en su trabajo en jurel (*Seriola lalandi*) con peso promedio inicial de 22g evaluaron dietas con sustitución parcial de harina de pescado por concentrado de harina de soya y harina de soya extraída con solvente, encontraron diferencias significativas en la tasa de eficiencia proteica (TEP) conforme incrementó el nivel de inclusión de soya. En el caso de la utilización de harina de soya extraída con solvente, una inclusión por encima del 10% redujo significativamente la TEP. De igual manera, en el caso de la utilización del concentrado de soya, una inclusión del 30% disminuyó significativamente la TEP. Los resultados del presente trabajo sugieren que los juveniles de jurel utilizaron eficientemente la proteína de las dietas con y sin el prebiótico, es decir, no se vio afectada por la sustitución de harina de pescado por harina de soya al 25%.

Asimismo, como es bien sabido, los peces carnívoros son incapaces de utilizar y digerir de forma efectiva muchos de los carbohidratos de la dieta y no toleran altos niveles de inclusión, por lo que los lípidos son la fuente principal de energía, lo que conlleva a que a mayores inclusiones de soya en la dieta, se empiecen a utilizar los lípidos y proteínas del cuerpo y finalmente esto afecta los índices de retención y eficiencia de la proteína y con ello los de crecimiento (Gatlin, et al., 2007).

7.3. Capacidad digestiva

7.3.1 Actividad de la tripsina

Los resultados del presente trabajo indican que la sustitución de la harina de pescado con harina de soya en un 25% no afecta el crecimiento del jurel y tampoco la actividad específica ($U\ mg^{-1}P$) de la tripsina. Por otra parte, la inclusión de GroBiotic[®]-A al 2%, en la dieta, no modificó la actividad de esta enzima.

Estos resultados son comparables con lo reportado por Anguiano *et al.* (2012) quienes evaluaron el efecto de varios prebióticos tales como FOS, MOS, TOS y GroBiotic[®]-A (1%) en la corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) con un peso inicial promedio de 10g, así como dos concentraciones de GroBiotic[®]-A (1 y 2%) en el híbrido de lobina rayada (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) con peso inicial promedio de 5g, sobre la actividad de enzimas digestivas luego de 8 semanas. En ese trabajo, los autores concluyen que al final del ensayo, tanto para la corvina roja como para el híbrido de la lobina rayada, no se encuentran diferencias significativas en la actividad específica de tripsina.

Asimismo, Xu, *et al.* (2009) en un estudio con carpa (*Carassius auratus gibelio*) con peso inicial promedio de 17g, evaluaron el efecto del prebiótico Xilooligosacárido a varias concentraciones (0.005, 0.01 y 0.02%) sobre el crecimiento y actividad de las enzimas digestivas luego de alimentar por 45 días. Finalmente, ellos reportan que la actividad de las proteasas en el intestino incrementaron significativamente por efecto del prebiótico en la concentración de 0.01%, mientras que las otras dos concentraciones no tuvieron efectos significativos con respecto a la dieta control.

Por otro lado, y contrario a lo observado en este trabajo, (Bowyer *et al.* 2013a) en un estudio con el jurel cola amarilla (*Seriola lalandi*) con peso inicial promedio de 22g, evaluaron el efecto de la sustitución parcial de harina de pescado por harina de soya extraída con solvente (SESBM, por sus siglas en inglés) en la dieta en un 10, 20 y 30%, sobre la actividad de las enzimas digestivas en diferentes regiones del tracto gastrointestinal. Después de 34 días de bioensayo de alimentación encontraron que en el intestino anterior/medio no se altera la actividad específica de la tripsina, sin embargo, en el intestino posterior, ésta misma se incrementa significativamente con un 20% de inclusión, mientras que a 10 y 30% se reduce con respecto a la de 20%. De manera similar Bowyer *et al.* (2013b) en un estudio con el jurel cola amarilla (*Seriola lalandi*) con peso promedio de 22g, evaluaron el efecto de la sustitución parcial de harina de pescado por concentrado de proteína de soya (SPC, por sus siglas en inglés) en dieta a un 20, 30 y 40% y cultivados a dos temperaturas (18 y 22°C), sobre la actividad de enzimas digestivas en diferentes regiones del tracto gastrointestinal. A los 34 días de bioensayo los autores encontraron que a una temperatura de cultivo de 22°C, la actividad de la tripsina en la región del intestino anterior se incrementó significativamente con la inclusión más alta de un 40% del concentrado de soya.

7.3.2 Actividad de la lipasa

Los resultados del presente trabajo indican que la combinación de sustituir harina de pescado con harina de soya en un 25% y la inclusión de GroBiotic®-A 2% incrementa significativamente la actividad específica (U mg⁻¹P) de la lipasa dependiente de sales biliares. Estos resultados son muy alentadores ya que se demostró un efecto positivo en la capacidad digestiva del jurel al incluir GroBiotic. Sin embargo, el presente estudio no fue diseñado para elucidar si este efecto positivo se debe a un estímulo directo de la fermentación en el tracto gastrointestinal de forma que se promuevan cambios en la flora intestinal que estimula específicamente la proliferación de bacterias benéficas que mejoren su capacidad digestiva. Se recomienda realizar estudios posteriores evaluando este último efecto.

Estos resultados no coinciden con lo reportado por Anguiano *et al.* (2012) quienes en el estudio descrito con anterioridad, señalan que al final del bioensayo, tanto en la corvina roja como en el híbrido de la lobina rayada, no se encontraron diferencias significativas en la actividad específica de lipasa.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente estudio son similares al trabajo de Bowyer *et al.*, (2013a) previamente descrito, quienes reportan que para la actividad de la lipasa, conforme aumentó el nivel de inclusión de la SESBM, también incrementó significativamente la actividad específica de esta enzima en la región del intestino posterior. De igual forma, Bowyer *et al.*, (2013b) reporta que para la actividad de la lipasa, conforme aumentó el nivel de inclusión del SPC, también incrementó significativamente la actividad específica de esta enzima pero en la región del intestino anterior.

7.3.3 Actividad de la amilasa

Los resultados del presente trabajo indican que la sustitución de harina de pescado con harina de soya en un 25% no afecta el crecimiento del jurel y no afecta la actividad específica ($U\ mg^{-1}P$) de la amilasa. Por otra parte, la inclusión de GroBiotic®-A 2%, no alteró la actividad de esta enzima. Al incluir la harina de soya en la dieta se elevan los niveles de carbohidratos en la dieta y esperaríamos ver un efecto sobre la actividad de las enzimas que digieren los carbohidratos, pero no se observó este efecto. Sin embargo lo interesante es que no afectó negativamente el crecimiento de esta especie.

Los resultados antes descritos son similares con lo reportado por Anguiano *et al.* (2012), en donde reportan que en la corvina roja no se encuentran diferencias significativas en la actividad específica de la amilasa; mientras que para el híbrido de lobina rayada, sí se presentaron diferencias significativas en ambas concentraciones de GroBiotic®-A (1 y 2%).

No obstante, en el caso de la amilasa, los estudios de Bowyer *et al.* (2013a,b) reportan que la actividad específica de esta enzima aumentó significativamente conforme

incrementó el nivel de inclusión tanto de SESBM y SPC, en la región del intestino anterior.

De igual manera, Xu *et al.* (2009) evaluaron en la carpa (*Carassius auratus gibelio*) el efecto del prebiótico Xilooligosacárido (0.005, 0.01 y 0.02%). Los autores reportan que la actividad específica de la amilasa en el intestino de los organismos incrementó significativamente como efecto de la adición de las tres concentraciones de los xilooligosacáridos.

Las diferencias encontradas en nuestro estudio comparadas con los estudios reportados en la literatura, pueden deberse a características propias de cada especie, entre ellas, la naturaleza de sus hábitos alimenticios, es decir, si son herbívoras, carnívoras u omnívoras (ya que las enzimas digestivas endógenas y exógenas varían), la talla/peso y edad (ya que dependiendo de la etapa, ciertas enzimas como por ejemplo por lo general la amilasa en los carnívoros se reduce conforme van creciendo), por mencionar algunas.

7.4 Respuesta inmune no específica

7.4.1 Estallido respiratorio

En lo que corresponde a los valores del estallido respiratorio, el tratamiento de HPSP (harina de pescado sin prebiótico) al día 14 incrementó significativamente esta respuesta comparado con el de HPCP (harina de pescado con prebiótico), pero no fueron significativamente más altos que los de HSSP y HSCP (harina de pescado y soya sin y con prebiótico respectivamente). Posteriormente, al día 42, los tratamientos de HS (harina de pescado y soya) con y sin prebiótico, HSCP y HSSP, disminuyeron significativamente en relación a los de HP (HPSP y HPCP). Finalmente al día 56 la respuesta de los cuatro tratamientos regresan a los valores similares a los iniciales, sin diferencias significativas entre éstos.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Li y Gatlin (2005), quienes evaluaron el efecto de GroBiotic®-A al 2% sobre el crecimiento y la respuesta inmune no

específica en sub-adultos del híbrido de lobina rayada (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) de un peso inicial promedio de 64g, expuestas a una infección crónica causada por *Mycobacterium marinum* después de 16 semanas de alimentación con las dietas experimentales. Los autores reportan que los valores del estallido respiratorio no resultaron en diferencias significativas entre los tratamientos comparados con el control. De manera similar, Sealey *et al.* (2007) en un estudio evaluando el efecto de GroBiotic®-A al 2% en la dieta sobre parámetros de la respuesta inmune no específica en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con un peso inicial promedio de 14g, alimentados durante 9 semanas, no encontraron diferencias significativas en este parámetro entre los tratamientos. Por su parte, Buentello *et al.* (2010) investigaron el efecto de diferentes prebióticos (FOS, MOS, TOS y GroBiotic®-A al 1%) sobre parámetros de la respuesta inmune no específica en juveniles de corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) de peso inicial promedio de 10g, después de 4 semanas reportan no haber observado diferencias significativas entre los valores del estallido respiratorio de los diferentes tratamientos después de 4 semanas.

De manera similar, Rossi *et al.* (2015) en su trabajo con juveniles de corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) de peso inicial promedio de 68g, cultivada en jaulas durante 15 semanas, evaluaron el efecto de la sustitución de harina de pescado por harina de soya, así como la adición de GroBiotic®-A al 2% en la dieta sobre la producción de radicales oxidativos de neutrófilos mediante la prueba de NBT y reportan no haber encontrado diferencias significativas entre los tratamientos.

Contrario a los resultados obtenidos en el presente estudio y los trabajos mencionados anteriormente, en un estudio realizado en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) de un peso promedio de 18.0g, durante 8 semanas, Zheng *et al.* (2011) evaluaron dietas sub-óptimas en cuanto al contenido de proteína cruda (PC de 29%; comparado con un contenido de 33% de la dieta de referencia) y suplementadas con tres niveles de prebiótico (GroBiotic®-A al 0.4, 0.8 y 1.2%) sobre la respuesta inmune del pez. Los autores reportan que el suplemento de los tres niveles del prebiótico incrementó significativamente la producción de radicales oxidativos de neutrófilos (prueba de NBT) en los tres tratamientos comparados con la dieta nutricionalmente sub-óptima y sin

prebiótico, de forma que los valores son similares a los de la dieta de referencia (óptima), por lo que los autores señalan que el prebiótico activó esta respuesta.

Al contrastar los resultados del presente trabajo con los trabajos publicados anteriormente resalta la importancia de cuantificar la respuesta inmune en varias ocasiones a través del tiempo durante el experimento y no sólo al inicio y al final. Para el parámetro del estallido respiratorio en los diferentes estudios anteriores se reporta únicamente los valores iniciales y finales de los experimentos (sólo el de Sealey *et al.* (2007) tuvo un muestreo a las 3 semanas), mientras que en el presente estudio se cuantificaron cada quince días y permitió observar el efecto ya sea temprano, intermedio o tardío del prebiótico. Es importante resaltar las diferencias obtenidas en los distintos días de muestreo (por ejemplo, 0 vs. 14, o el 14 vs. 42) en cuanto al efecto del prebiótico y/o la fuente de proteína. Las conclusiones a las que puede llegar una investigación son muy diferentes si sólo se consideran dos puntos, el inicial y el final. Todo esto destaca la importancia de muestrear a través del tiempo en este tipo de estudios y se recomienda hacerlo en más de dos ocasiones.

7.4.2 Proteínas totales en suero

En el presente trabajo, la cuantificación de la proteínas totales en suero indicó que la inclusión del prebiótico GroBiotic®-A al 2% y la sustitución parcial de harina de pescado por harina de soya, no resultaron en diferencias significativas entre los tratamientos. Sólo se observó el incremento significativo de la concentración de proteínas totales en suero a través del tiempo. Las proteínas totales en el suero están relacionadas con la regulación de la presión osmótica y la viscosidad de la sangre, entre otros procesos relacionados con la respuesta inmune.

Contrario a lo obtenido en el presente estudio, Yousefian *et al.* (2012) en un bioensayo de alimentación de 8 semanas con el rutilus (*Rutilus frisii kutum*) de un peso promedio inicial de 0.78g, evaluaron el efecto de GroBiotic®-A (1, 2 y 3%) en dieta sobre el crecimiento y parámetros bioquímicos del suero, los autores reportaron un incremento significativo en la concentración de las proteínas totales en los peces alimentados con

GroBiotic®-A al 3% con respecto a los peces alimentados con la dieta control. Sin embargo, los tratamientos con prebiótico al 1 y 2% no resultaron con diferencias significativas con respecto al control.

De manera similar, Reyes-Becerril *et al.*, (2014), evaluaron el efecto simple y combinado de *Lactobacillus sakei* e inulina (1%) como prebiótico en la dieta, sobre el crecimiento y la inmunidad no específica en juveniles de la cabrilla sardinera (*Mycteroperca rosacea*) de peso promedio inicial de 35g, durante 8 semanas de alimentación. En dicho trabajo, relativo a la concentración de proteínas totales en suero, reportan que a las cuatro semanas no encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, y que a la sexta semana se observó un ligero incremento no significativo. Si embargo, mencionan que a las 8 semanas de haber iniciado el bioensayo todos los tratamientos (entre ellos el prebiótico inulina al 1%) aumentaron los valores significativamente con respecto del control.

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio se sugiere que las proteínas totales en suero del jurel cola amarilla del Pacífico tienden a incrementar significativamente a través del tiempo, independientemente de la naturaleza de la dieta, es decir si contenía o no prebiótico o si la fuente de proteína fue exclusiva de harina de pescado o una sustitución parcial con soya. Asimismo, que en este parámetro en particular el prebiótico GroBiotic®-A incluido en la dieta al 2% no tienen un efecto significativo.

7.4.3 Recuento total de leucocitos

El recuento total de leucocitos es un parámetro hematológico que se utiliza como indicador del estado de salud del organismo y que además está implicado en la regulación de la función inmunológica del mismo. El incremento en este parámetro es el resultado de la respuesta protectora del cuerpo durante una condición de estrés o de la inmuoestimulación en los peces (Santhakumar, Balaji y Ramudu, 1999; Das, Ayyappan y Jena, 2006; Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que a los 42 días de alimentación con las dietas experimentales el número de leucocitos incrementó significativamente en todos los tratamientos con respecto a los valores iniciales del primer muestreo. Así mismo, al finalizar el experimento (día 56), los tratamientos con el prebiótico GroBiotic®-A al 2% tuvieron una disminución significativa del recuento total de leucocitos con respecto de las dietas sin adición del mismo y del valor inicial al día cero. Por su parte, la sustitución parcial de harina de pescado por harina de soya (25%), no alteró el recuento total de leucocitos.

Por su parte, Ahmadi *et al.* (2014), evaluaron el efecto del prebiótico comercial Immunogen® incluido al 2% en la dieta sobre la respuesta inmune innata de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de peso inicial de 81g, en un bioensayo de alimentación durante 45 días y concluyeron que la adición de Immunogen® 2% incrementó significativamente el recuento total de leucocitos, comparado con el control que carecía del mismo.

De igual manera, Del Río-Zaragoza *et al.*, (2011) en un estudio donde evaluaron el efecto del β -glucano incluido en la dieta al 0.05, 0.1 y 0.5%, sobre la inmunidad innata y resistencia del pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*) con peso inicial de 20g, reportan que después de alimentar por cinco semanas, el recuento total de leucocitos incremento significativamente en los tratamientos con 0.1 y 0.5% de β -glucano con respecto al control, mientras que el conteo más alto se obtuvo en los tratamientos 0.1 y 0.5% de β -glucano en la cuarta semana.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la adición de GroBiotic®-A al 2% en la dieta por más de 42 días tiene efectos negativos en el recuento total de leucocitos, lo que podría asociarse a un proceso de estrés ajeno a los factores experimentales que pudiera haber provocado un estrés crónico en los organismos, lo que a su vez conlleva a una leucopenia (Donaldson 1981; Wedemeyer *et al.*, 1990, citado en Valenzuela *et al.*, 2003). De manera similar, Das *et al.*, (2006) en un estudio que investigó los cambios hematológicos ocasionados por el pH alcalino y ácido del agua en tres especies de carpas. Los autores sugieren que el estrés causado por el pH del agua pudo debilitar el proceso de leucopoyesis, es decir, la producción de

leucocitos, ya que encontraron que al menos en dos especies de carpa investigadas se observó un decremento significativo en el recuento total de leucocitos conforme aumentó o disminuyó el pH del agua.

Con base en los resultados obtenidos, es importante mencionar que la ventaja del uso de este tipo de prebióticos y en particular de GroBiotic®-A al 2% en la dieta para *Seriola lalandi* puede traducirse en grandes ventajas productivas, ya que se comprobó que la sustitución parcial de la harina de pescado con harina de soya (25%) no afectó el rendimiento de los peces y la adición del prebiótico potenció aun más su desempeño en el crecimiento. Por lo anterior, la combinación de ambos factores, es una opción viable para los productores dadas las condiciones actuales, en donde la creciente demanda de la harina de pescado fuente principal de proteína en las dietas para peces marinos, es costosa y en los próximos años el uso de ésta en sus dietas será aún más limitada.

El uso de harinas alternativas a la harina de pescado en dietas para peces marinos, como la harina de soya, presenta una opción muy sustentable para el desarrollo de esta actividad acuícola y si los prebióticos ayudan a mejorar el desempeño de estas proteínas, como se observó en el presente estudio, se recomienda ampliamente el uso de éstos en dietas con este tipo de fuentes proteicas alternativas.

Capítulo 8. Conclusiones

- Los resultados indican que la inclusión del prebiótico GroBiotic®-A en un 2% mejorará significativamente el crecimiento de juveniles de jurel cola amarilla del Pacífico.
- La proteína de la harina de soya puede reemplazar hasta en un 25% a la harina de pescado en la dieta sin comprometer el crecimiento de los organismos.
- Los resultados del presente estudio demuestran que la inclusión de GroBiotic®-A al 2% en la dieta mejora la eficiencia alimenticia ya que reduce significativamente la tasa de conversión alimenticia (TCA) tanto en dietas de harina de pescado como en dietas con inclusión de harina de soya. Sin embargo, no se observó un efecto positivo en la eficiencia de la utilización de la proteína (TEP y TCP).
- La inclusión de harina de soya (25%) en las dietas incrementó significativamente la actividad específica de la lipasa. Sin embargo el uso del prebiótico GroBiotic®-A al 2% no tuvo un efecto significativo en esta enzima digestiva.
- La inclusión de GroBiotic®-A al 2% en la dieta con la harina de pescado como principal fuente proteica incrementó significativamente la actividad específica de la lipasa en los juveniles de jurel.
- Después de los 42 días, GroBiotic®-A al 2% en la dieta disminuyó significativamente el recuento total de leucocitos.

Capítulo 9. Recomendaciones

- Para el caso de los análisis de composición proximal del músculo se recomienda complementar el análisis con uno del pez completo para realizar comparaciones y cuantificar la tasa de conversión proteica de manera más precisa.
- Realizar un análisis de digestibilidad de la dieta, para comparar las dietas de 100% harina de pescado con las de sustitución parcial con harina de soya comercial y las que contienen prebiótico.
- Realizar este tipo de análisis en los estadios de juveniles tempranos para verificar si el rendimiento en crecimiento es similar a lo observado en el presente trabajo.
- Realizar un análisis a nivel histológico de la estructura de las microvellosidades del intestino para observar si hay cambios por efecto del prebiótico. Complementar este análisis con una descripción similar en organismos bajo condiciones silvestres para tener referencia sólida.
- Realizar análisis de la microbiota gastrointestinal del jurel antes y después de un bioensayo de alimentación con prebióticos para evaluar su efecto en la misma.
- Para evaluar el efecto de un prebiótico en la respuesta inmune no específica es de suma importancia considerar la realización de varios muestreos a través del bioensayo, ya que ello permitirá observar cambios importantes en la respuesta y a su vez indicará el tiempo adecuado para incluirlo en la dieta de los peces.

Referencias Bibliográficas

- Abbink, W., Blanco Garcia, A., Roques, J. a. C., Partridge, G. J., Kloet, K., y Schneider, O. (2011). The effect of temperature and pH on the growth and physiological response of juvenile yellowtail kingfish *Seriola lalandi* in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*, 330-333, 130–135.
- Abowei, J. F. N., y Ekubo, A. T. (2011). A Review of Conventional and Unconventional Feeds in Fish Nutrition. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2(4), 179–191.
- Abreu, J. S., Marzocchi-Machado, C. M., Urbaczek, a C., Fonseca, L. M., y Urbinati, E. C. (2009). Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Brazilian Journal of Biology*, 69(4), 1133–9.
- Ahmadi, P. Y., Farahmand, H., Miandare, H. K., Mirvaghefi, A., y Seyed, H. H. (2014). The effects of dietary Immunogen on innate immune response, immune related genes expression and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish y Shellfish Immunology*, 37(2), 209–14.
- Anguiano, M., Pohlenz, C., Buentello, A., y Gatlin, D. M. (2012). The effects of prebiotics on the digestive enzymes and gut histomorphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*) and hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *British Journal of Nutrition*, 1–7.
- Avilés-Quevedo, M.A. y Castelló-Orvay, F.C. (2004). Manual para el Cultivo de *Seriola lalandi* (Pisces: Carangidae) En Baja California Sur, México. Instituto Nacional de Pesca. Dirección General de Investigación en Acuicultura. Secretaría de Acuicultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 64 p.
- Avilés-Quevedo, M.A. y Castelló-Orvay, F.C. (2005). Desarrollo Biotecnológico del Cultivo de Jurel Cola Amarilla (*Seriola lalandi*). Hernández-Martínez, M., Rangel Dávalos, C., Garduño Dionate, M., y Mora Cervantes I. (Eds). Memorias de la Segunda Reunión Nacional de la Red de Cultivo de Peces Marinos. SAGARPA, 1-3 DIC 2005. 63-70.
- Booth, M. a., Allan, G. L., y Pirozzi, I. (2010). Estimation of digestible protein and energy requirements of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* using a factorial approach. *Aquaculture*, 307(3-4), 247–259.
- Bowyer, J. N., Qin, J. G., Smullen, R. P., Adams, L. R., Thomson, M. J. S., y Stone, D. a. J. (2013a). The use of a soy product in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola*

lalandi) feeds at different water temperatures: 1. Solvent extracted soybean meal. *Aquaculture*, 384-387, 35–45.

- Bowyer, J. N., Qin, J. G., Smullen, R. P., Adams, L. R., Thomson, M. J. S., y Stone, D. a. J. (2013b). The use of a soy product in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) feeds at different water temperatures: 2. Soy protein concentrate. *Aquaculture*, 410-411, 1–10.
- Buentello, A., Jirsa, D., Barrows, F. T., y Drawbridge, M. (2015). Minimizing fishmeal use in juvenile California yellowtail, *Seriola lalandi*, diets using non-GM soybeans selectively bred for aquafeeds. *Aquaculture*, 435, 403–411.
- Buentello, J. A., Neill, W. H., y Gatlin, III, D. M. (2010). Effects of dietary prebiotics on the growth, feed efficiency and non-specific immunity of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus* fed soybean-based diets. *Aquaculture Research*, 41(3), 411–418.
- Burr, G., Gatlin III, D., y Hume, M. (2009). Effects of the Prebiotics GroBiotic® -A and Inulin on the Intestinal Microbiota of Red Drum , *Sciaenops ocellatus*. *Journal Of The World Aquaculture Society*, 40(4), 440–449.
- Burr, G., Hume, M., Neill, W. H., y Gatlin III, D. M. (2008). Effects of prebiotics on nutrient digestibility of a soybean-meal-based diet by red drum *Sciaenops ocellatus* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 1680-1686
- Das, P. C., Ayyappan, S., y Jena, J. K. (2006). Haematological changes in the three Indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) exposed to acidic and alkaline water pH. *Aquaculture*, 256(1-4), 80–87.
- Del Río-Zaragoza, O. B., Fajer-Ávila, E. J., y Almazán-Rueda, P. (2011). Influence of beta-glucan on innate immunity and resistance of *Lutjanus guttatus* to an experimental infection of dactylogyrid monogeneans. *Parasite Immunology*, 33(9), 483–494.
- Erlanger, B. F., Cohen, W., y Kokowsky, N. (1961). The Preparation Chromogenic and Properties of Two New Substrates of Trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95, 271–278.
- FAO. (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. Roma. 253 págs.
- Ganguly, S., Dora, K. C., Sarkar, S., y Chowdhury, S. (2012). Supplementation of prebiotics in fish feed: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 23(2), 195–199.
- Gatlin, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W. y Wurtele, E. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, 38(6), 551–579.

- Gatlin, D. M., Li, P., Wang, X., Burr, G. S., Castille, F., y Lawrence, A. L. (2006). Potential Application of Prebiotics in Aquaculture (pp. 371–376).
- Gibson, G. R., y Roberfroid, M. B. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*, (August 1994).
- Gjellesvik, D. R., Lombardo, D., y Walther, B. T. (1992). Pancreatic Bile-Salt Dependent Lipase from Cod (*Gadus-Morhua*) - Purification and Properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1124(2), 123–134.
- Ibrahem, M. D., Fathi, M., Mesalhy, S., y Abd El-Aty, a M. (2010). Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish y Shellfish Immunology*, 29(2), 241–6.
- Jirsa, D., Davis, a., Stuart, K., y Drawbridge, M. (2011). Development of a practical soy-based diet for California yellowtail, *Seriola lalandi*. *Aquaculture Nutrition*, 17(4), e869–e874.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., y Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1), 1–14.
- Knapp, G. (2008). “Potential Economic Impacts of U.S. Offshore Aquaculture”. In: Rubino, M. (ed.). *Offshore Aquaculture in the United States: Economic Considerations, Implications & Opportunities*. 161-188. Department of Commerce.
- Lazo, J.P. (2000). Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.
- Li, P., y Gatlin III, D. M. (2004). Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic™AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture*, 231(1-4), 445–456.
- Li, P., y Gatlin, D. M. (2005). Evaluation of the prebiotic GroBiotic®-A and brewers yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. *Aquaculture*, 248(1-4), 197–205.
- Li, P., Wang, X., Murthy, S., Gatlin, D. M., Castille, F. L., y Lawrence, A. L. (2009). Effect of Dietary Supplementation of Brewer’s Yeast and GroBiotic®-A on Growth,

Immune Responses, and Low-Salinity Tolerance of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Cultured in Recirculating Systems. *Journal of Applied Aquaculture*, 21(2), 110–119.

- Liao, C. y Chao, N.H. (2007). "Taiwanese Aquaculture at the Crossroads". In: Leung P., Lee, C. y O'Bryen, P.J.(Eds) *Species and System Selection for sustainable aquaculture*. 161-178. Blackwell Publishing.
- Lochmann, R., Phillips, H., y Xie, L. (2011). Effects of a dairy–yeast prebiotic and water hardness on the growth performance, mineral composition and gut microflora of fathead minnow (*Pimephales promelas*) in recirculating systems. *Aquaculture*, 320(1-2), 76–81.
- Lochmann, R., Sink, T. D., Phillips, H., y Chen, R. (2010). Evaluation of a Dietary Dairy-Yeast Prebiotic in Juvenile Golden Shiners in Ponds.
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish y Shellfish Immunology*, 20(2), 137–51.
- Reyes-Becerril, M., Ascencio, F., Gracia-Lopez, V., Macias, M. E., Roa, M. C., y Esteban, M. Á. (2014). Single or combined effects of *Lactobacillus sakei* and inulin on growth, non-specific immunity and IgM expression in leopard grouper (*Mycteroperca rosacea*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(4), 1169–1180.
- Riddick, E. W. (2014). *Insect Protein as a Partial Replacement for Fishmeal in the Diets of Juvenile Fish and Crustaceans. Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens*. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-391453-8.00016-9>
- Román L., M. (2014). Alltech®: Bio-Mos® en acuicultura, la visión global de un desafío. *Panorama acuícola magazine*, 19 (2), 58-59.
- Rossi, W., Tomasso, J. R., y Gatlin, D. M. (2015). Production performance and non-specific immunity of cage-raised red drum, *Sciaenops ocellatus*, fed soybean-based diets. *Aquaculture*, 443, 84–89.
- SAGARPA. (2012). Carta Nacional Acuícola. México, 81-83 .
- Santhakumar, M., Balaji, M., y Ramudu, K. (1999). Effect of sublethal concentrations of monocrotophos on erythropoietic activity and certain hematological parameters of fish *Anabas testudineus* (Bloch). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63(3), 379–384.
- Sealey, W. M., Barrows, F. T., Johansen, K. A., Overturf, K., LaPatra, S. E., y Hardy, R. W. (2007). Evaluation of the ability of partially autolized yeast and GroBiotic-

A to improve Disease Resistance in Rainbow Trout. *North American Journal of Aquaculture*, 69, 400–406.

- Song, S. K., Beck, B. R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H. D., y Ringø, E. (2014). Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. *Fish y Shellfish Immunology*.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., y Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish : a review, 2011(10), 486–503.
- Valenzuela, A., Oyarzún, C., y Silva, V. (2003). Blood cells of the *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): the leukocytes (Elasmobranchii, Scyliorhinidae). *Gayana (Concepc.)*, 67(1), 130–136.
- Wilson, R. P. (1989). “Amino Acids and Proteins”. In: Halver J. E. (Ed). *Fish Nutrition*. 112-151. Academic Press, Inc.
- Xu, B., Wang, Y., Li, J., y Lin, Q. (2009). Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(3), 351–7.
- Yousefian, M., Hedayatifard, M., Fahimi, S., Shikholeslami, M., Irani, M., Amirinia, C., y Mousavi, S. E. (2012). Effect of Prebiotic Supplementation on Growth performance and Serum Biochemical Parameters of Kutum (*Rutilus frisii kutum*) Fries. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*.
- Zheng, Z. L., Wang, K. Y., Gatlin III, D. M., y Ye, J. M. (2011). Evaluation of the Ability of GroBiotic ® -A to Enhance Growth , Muscle Composition , Immune Responses , and Resistance Against *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia , *Oreochromis niloticus*, 42(4), 549–557.